

AUS DEM INSTITUT FÜR MOLEKULARE ONKOLOGIE  
GESCHÄFTSFÜHRENDER DIREKTOR: PROF. DR. THORSTEN STIEWE  
DES FACHBEREICHS MEDIZIN DER PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG

TITEL DER DISSERTATION:

---

*RNAi im Hochdurchsatzverfahren - Identifikation potentieller  
Angriffspunkte zur Überwindung der Toleranz gegenüber dem  
niedermolekularen Wirkstoff RITA in H460 NSCLC-Zellen*

---

INAUGURAL-DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER GESAMTEN  
HUMANMEDIZIN

DEM FACHBEREICH MEDIZIN DER PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG

VORGELEGT VON

MAGDALENA NOACK AUS MARBURG

MARBURG, 2023

ANGENOMMEN VOM FACHBEREICH MEDIZIN DER PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG AM: 03. MAI 2023

GEDRUCKT MIT GENEHMIGUNG DES FACHBEREICHS MEDIZIN

DEKAN/IN: PROF. DR. DENISE HILFIKER-KLEINER

REFERENT/IN: PD DR. MICHAEL WANZEL

1. KORREFERENT/IN: PROF. DR. BERND SCHMECK

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b><i>EINLEITUNG</i></b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Entstehung von Neoplasien - die „Mehr-Schritt-Tumorgenese“</b>	<b>2</b>
<b>1.2</b>	<b>Onkogene und Tumorsuppressorgene</b>	<b>4</b>
<b>1.3</b>	<b>p53 – Wächter über die zelluläre Integrität</b>	<b>7</b>
1.3.1	Die Tumorsuppressor-Funktion von p53	7
1.3.2	Wie wird p53 aktiviert?	7
1.3.3	p53-Aktivierung - Apoptose oder Zellzyklus-Arrest?	10
1.3.4	p53 als Angriffsziel in der Tumorthherapie	11
1.3.5	p53-Reaktivierung durch niedermolekulare Verbindungen	13
<b>1.4</b>	<b>RITA (reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis)</b>	<b>15</b>
1.4.1	Der niedermolekulare Wirkstoff RITA	15
1.4.2	Apoptose-Einleitung durch RITA	16
<b>1.5</b>	<b>RITA-Toleranz</b>	<b>18</b>
1.5.1	Vorarbeiten zu RITA	18
1.5.2	Arzneimittelresistenzen	20
1.5.3	RITA-Toleranz	21
<b>1.6</b>	<b>NSCLC-Zellen H460</b>	<b>23</b>
<b>1.7</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b><i>MATERIAL UND METHODEN</i></b>	<b>27</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>27</b>
2.1.1	Verwendete Zelllinien	27
2.1.2	Oligonukleotide	27
2.1.3	siRNAs	28
2.1.4	Vektoren	29
2.1.5	Kommerzielle Kits und Fertigreagenzien	30
2.1.6	Medien, Lösungen und Puffer	31
2.1.7	Antibiotika	31
2.1.8	RITA	32
2.1.9	Verbrauchsmaterialien	32

<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>33</b>
2.2.1	Kulturtechniken	33
2.2.2	RNA-Interferenz (RNAi)	35
2.2.3	Methoden zur Analyse des Zellüberlebens	40
2.2.4	RNA-basierte Methoden	41
2.2.5	Microarray-Analyse	45
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>Bestätigung der RITA-Toleranz der verwendeten Zellklone</b>	<b>48</b>
<b>3.2</b>	<b>Microarray</b>	<b>49</b>
3.2.1	Microarray Analyse – H460 und H460 <sub>T</sub> im Vergleich: Die Gene SOX2, INHBA und FST zeigen eine vermehrte Expression in H460 <sub>T</sub> im Vergleich zu H460	49
3.2.2	Ein Knockdown der Gene SOX2, INHBA und FST führt nicht zu einer Resensitivierung der H460 <sub>T</sub> -Zellen gegenüber RITA	50
<b>3.3</b>	<b>siRNA – Screen</b>	<b>53</b>
3.3.1	Screen-Etablierung	53
3.3.2	Daten-Erfassung, Qualitätssicherung und Analyse: Eine „Hitliste“ aus 57 Genen zur weiteren Validierung wird erstellt	55
3.3.3	Ein Knockdown der „Hits“ führt auch außerhalb des Screens zu einem reduzierten Zellüberleben der H460 <sub>T</sub> -Zellen; ein Effekt, der jedoch sowohl mit als auch ohne RITA-Behandlung auftritt	57
3.3.4	Identifikation von RAD18 im Screen-Nachtrag: Durch einen RAD18-Knockdown kann eine Resensitivierung von H460 <sub>T</sub> erreicht werden	58
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>64</b>
<b>4.1</b>	<b>siRNA-Screen: Die Resensitivierung der H460<sub>T</sub>-Zellen kann durch einen RAD18-Knockdown erreicht werden</b>	<b>64</b>
4.1.1	Die Überwindung der RITA-Toleranz durch RAD18 als ein Gen der DNA-Schadens-Antwort ist passend zur aktuellen Einordnung von RITA als primären DNA-Vernetzer	64
4.1.2	Rad18 spielt im Toleranzmechanismus in seiner Verbindung zum Fanconi-Anämie-Signalwegs eine Rolle	65
<b>4.2</b>	<b>RITA-tolerante und -sensitive Zellen im Vergleich: Eine Microarray-Analyse unterstreicht den Stammzellcharakter der H460<sub>T</sub>-Zellen</b>	<b>66</b>
4.2.1	SOX2	66
4.2.2	INHBA und FST	68

<b>4.3</b>	<b>Methodik: Herausforderung Hochdurchsatzverfahren</b>	<b>70</b>
4.3.1	Etablierung des siRNA-Screens – RNAi im Hochdurchsatzverfahren	70
4.3.2	Auswertung des Microarrays	74
<b>4.4</b>	<b>Die RITA-toleranten Zellen als DTPs (drug tolerant persisters)</b>	<b>76</b>
<b>4.5</b>	<b>Ausblick und Fragen</b>	<b>78</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG</b>	<b>88</b>
<b>6.1</b>	<b>Hitliste Microarray</b>	<b>88</b>
<b>6.2</b>	<b>Knockdown-Effizienzen siRNA</b>	<b>89</b>
6.2.1	Knockdown Effizienz SOX2	89
6.2.2	Knockdown Effizienz INHBA	90
6.2.3	Knockdown Effizienz FST	90
6.2.4	Knockdown Effizienz RAD18	91
<b>6.3</b>	<b>RAD18 Expression in H460<sub>T</sub>-Zellen</b>	<b>91</b>
<b>6.4</b>	<b>Knockdown-Effizienzen shRNA</b>	<b>92</b>
<b>7</b>	<b>VERZEICHNIS AKADEMISCHER LEHRER/-INNEN</b>	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>94</b>

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1 „Hallmarks of Cancer: The Next Generation“ .....	2
Abbildung 1.2 Die p53-MDM2-Interaktion .....	9
Abbildung 1.3 Dereguliertes MDM2 in malignen Neoplasien .....	11
Abbildung 1.4 Blockade der p53-MDM2-Interaktion durch MDM2-Inhibitoren .....	14
Abbildung 1.5 RITA - NSC 652287 – 2,5-bis(5-hydroxymethyl-2-thienyl)furan .....	16
Abbildung 1.6 Nachweis von vermehrten DNA-Schadens-Signalen nach RITA-Behandlung .....	19
Abbildung 1.7 Sphären-Bildung der RITA-resistenten Zellklone .....	20
Abbildung 1.8 RITA- resistente Zellklone der grundsätzlich RITA-sensitiven, p53-WT Zelllinie H460 ....	21
Abbildung 2.1 Verteilung der Proben im Rahmen des siRNA Screen .....	37
Abbildung 3.1 Nachweis der RITA-Toleranz der H460 <sub>T</sub> -Zellen .....	48
Abbildung 3.2 Vergleich der Genexpression H460 <sub>T</sub> - und H460-Zellen im Microarray mittels log <sub>2</sub> FC ...	49
Abbildung 3.3 Vermehrte relative Expression der Gene SOX2, INHBA und FST in den H460 <sub>T</sub> -Zellen im Vergleich zu den H460-Zellen .....	51
Abbildung 3.4 Persistierende RITA-Toleranz in den H460 <sub>T</sub> -Zellen nach Knockdown von SOX2, INHBA und FST .....	52
Abbildung 3.5 siRNA-Screen-Etablierung 96-Well Format .....	54
Abbildung 3.6 Testdurchlauf vor Screening-Start mit dem Pipettier-Roboter .....	55
Abbildung 3.7 Übersicht Zellüberleben der H460 <sub>T</sub> -Zellen im siRNA- Screen der DNA-Damage-Response-Bibliothek .....	56
Abbildung 3.8 „Hit-Screening“: Vermindertes relatives Zellüberleben der H460 <sub>T</sub> -Zellen nach Knockdown der „Hit“-Gene mit und ohne RITA-Behandlung .....	58
Abbildung 3.9 „Mini-Screen“: Relatives Zellüberleben der H460 <sub>T</sub> -Zellen nach Knockdown der Replikations-Stress Gene mit und ohne RITA .....	59
Abbildung 3.10 Nur gering reduziertes relatives Überleben der H460 <sub>T</sub> -Zellen nach RAD18 Knockdown und RITA-Behandlung im CellTiter-Glo-Assay .....	60
Abbildung 3.11 Reduziertes Überleben der toleranten H460 <sub>T</sub> -Zellen nach RAD18 Knockdown mittels siRNA und RITA-Behandlung im Colony Formation Assay .....	61
Abbildung 3.12 Reduziertes Überleben der toleranten H460 <sub>T</sub> -Zellen nach RAD18 Knockdown mittels shRNA und RITA-Behandlung im Colony Formation Assay .....	62
Abbildung 4.1 Ablaufschema des siRNA-Screens. ....	70
Abbildung 8.1 Knockdown Effizienz SOX2 .....	89
Abbildung 8.2 Knockdown Effizienz INHBA .....	90
Abbildung 8.3 Knockdown Effizienz FST .....	90

<i>Abbildung 8.4 Knockdown Effizienz RAD18 .....</i>	<i>91</i>
<i>Abbildung 8.5 RAD18 Protein in H460- und H460<sub>T</sub>-Zellen Western Blot.....</i>	<i>91</i>
<i>Abbildung 8.6 Knockdown Effizienz RAD18 shRNA .....</i>	<i>92</i>

# TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 2.1 Oligonukleotide</i> .....	27
<i>Tabelle 2.2 siRNA Kontrollen</i> .....	28
<i>Tabelle 2.3 siRNAs Zielgene</i> .....	29
<i>Tabelle 2.4 shRNAs</i> .....	30
<i>Tabelle 8.1 Microarray H460 im Vergleich H460r</i> .....	88



# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CDK	<i>Cyclin-abhängige Kinase</i>
DTP	<i>drug-tolerant persistor</i>
EGF-Rezeptor	<i>epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor</i>
FA-Signalweg	<i>Fanconi-Anämie-Signalweg</i>
H460r-Zellen	<i>RITA-tolerante H460-Zellen</i>
MRD	<i>minimal residual disease</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
Mut-p53	<i>mutiertes p53</i>
NSCLC	<i>non-small-cell-lung-cancer</i>
nsi	<i>non targeting siRNA</i>
PCR	<i>Polymerase-Ketten-Reaktion</i>
PLK	<i>PLK1 - Polo Like Kinase 1</i>
PoI	<i>POLD2 - DNA-Polymerase Delta 2</i>
PTK	<i>Protein-Tyrosin-Kinase</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative real time PCR</i>
RISC-Komplex	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RITA	<i>reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis</i>
RNAi	<i>RNA-Inferenz</i>
SCLC	<i>small-cell-lung-cancer</i>
shRNAs	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TLS	<i>Translasiions-DNA-Synthese</i>
WT	<i>Wildtyp</i>

## ZUSAMMENFASSUNG

Der niedermolekulare Wirkstoff RITA wurde 2004 erstmals als potenzielles Krebsmedikament beschrieben. Er wurde hier zunächst als p53-Wildtyp-Reaktivator, dessen Funktion eine Blockade der p53-MDM2-Interaktion zu Grunde liegt, charakterisiert. In den folgenden Jahren konnte jedoch ebenfalls eine Wirkung von RITA auf p53-mutierte Tumorzellen gezeigt werden und aktuellere Forschungsergebnisse legen letztendlich eher einen p53-unabhängigen Wirkungsmechanismus als DNA-Vernetzer nahe.

In der vorliegenden Arbeit wurden RITA-tolerante Zellklone einer WT-p53-tragenden, primär RITA-sensiblen NSCLC-Zelllinie (H460) mittels RNAi untersucht. Ziel war es, Gene zu finden, deren Knockdown zu einer Resensitivierung der toleranten Zellen gegenüber RITA führt.

Auf Grund der angenommenen genotoxischen Eigenschaften von RITA, wurde eine siRNA-Bibliothek von Genen der DNA-Schadens-Antwort getestet. Dabei konnte RAD18 als „Hit“ identifiziert werden. Sowohl mittels kurzfristigem siRNA-Knockdown, als auch im längerfristigen shRNA-Knockdown von RAD18 konnte eine Resensitivierung der toleranten H460-Zellen gegenüber RITA erreicht werden. Es konnte damit gezeigt werden, dass es sich um eine potenziell reversible Toleranz handelt. Dass es sich hierbei außerdem um ein Gen mit Funktionen in der DNA-Schadens-Toleranz handelt, unterstützt die Beschreibung von RITA als primären DNA-Vernetzer/Wirkstoff mit primär genotoxischer Aktivität. Daneben konnte Wanzel et al. (2016) zeigen, dass der Knockdown von FancD2 ebenso wie der von RAD18 zu einer Resensitivierung der toleranten Zellen gegenüber RITA führt. Eine Verbindung zwischen FancD2 (einem Gen des Fanconi-Anämie-Signalweges) und RAD18 wurden in der Literatur bereits diskutiert. Somit lässt sich vermuten, dass RAD18 für den Toleranzmechanismus in seiner Verbindung zum FA-Signalweg, in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen eine Rolle spielt.

Weiterhin wurde ein Microarray zum Vergleich der Genexpression von RITA-toleranten und parental H460-Zellen durchgeführt, um in den RITA toleranten Zellen vermehrt exprimierte Gene zu identifizieren. Hierbei konnten die Gene SOX2, INHBA und FST als in den toleranten Zellen als Heraufreguliert validiert werden. Durch einen Knockdown dieser Gene mittels RNAi durch siRNAs konnte jedoch keine eindeutige Resensitivierung gegenüber RITA erreicht werden. Die stark vermehrte Expression von SOX2 fügt den toleranten Zellen jedoch einen weiteren Stammzellmarker (neben bereits gezeigter Sphärenbildung und CD133-Positivität) hinzu.

Die Ergebnisse zeigen daher, dass es sich bei den RITA-toleranten Zellen um Subpopulationen von H460-Zellen mit Stammzellcharakteristika und potenziell überwindbarer RITA-Resistenz auf dem Boden einer veränderten DNA-Schadens-Antwort handelt, sodass hier der Vergleich zu den sogenannten DTPs (drug tolerant persisters) nahe liegt. Als DTPs werden Krebszellen bezeichnet, die sich in einem transienten Zustand der Apoptose-Resistenz sowie des „slow cyclings“ befinden und Tumorstammzellcharakteristika zeigen. Sie stehen klinisch in Verbindung mit Therapie-Resistenz und Rezidiven, sodass hier großes Interesse besteht diese Zellen anvisieren zu können. Mit RAD18 in Verbindung mit dem FA-Signalweg wurden hier potenzielle Angriffspunkte aufgezeigt.

## SUMMARY

The small-molecule compound RITA was first described as a potential anti-cancer drug in 2004. It was initially characterized as a p53 wild-type reactivator whose function is based on a blockade of the p53-MDM2 interaction. However, in subsequent years, RITA was also shown to act on p53-mutated cancer cells, and more recent research ultimately suggests that RITA works p53-independent as a DNA cross-linker.

In the present work, RITA-tolerant cell clones of a WT-p53-bearing, primarily RITA-sensitive NSCLC cell line (H460) were investigated by RNAi. The aim was to find genes whose knockdown can restore RITA sensitivity.

Due to the assumed genotoxic properties of RITA, a siRNA library of DNA damage response genes was tested. RAD18 was identified as the "hit". Resensitization of the tolerant H460 cells to RITA was achieved both by short-term siRNA and long-term shRNA knockdown of RAD18, which demonstrates a reversible mechanism of tolerance. The fact that RAD18 is a gene with functions in DNA damage response and tolerance also supports the description of RITA as a primary DNA cross-linker/substance with primarily genotoxic activity. In addition, Wanzel et al. (2016) were able to show that the knockdown of FancD2, like that of RAD18, leads to a resensitization of the tolerant cells to RITA. The literature has already discussed a connection between FancD2 (a gene of the Fanconi-Anemia-Pathway) and RAD18. Thus, it can be assumed that RAD18 plays a role in the tolerance mechanism via its connection to the FA-pathway in repairing DNA double-strand breaks.

Furthermore, a microarray-analysis was performed to compare the RITA-tolerant and parental H460 cells to identify genes with increased expression in the tolerant cells. The genes SOX2, INHBA and FST were validated as upregulated. However, no clear resensitization to RITA could be achieved by knockdown of these genes using RNAi with siRNAs. But the strongly increased expression of SOX2 adds another stem

cell marker to the characteristics of the tolerant cells (besides sphere formation and CD133 positivity, which have been shown already).

The results show that the RITA-tolerant cells are a subpopulation of the H460 cells, which exhibit stem cell characteristics and a potentially reversible RITA tolerance based on an altered DNA damage response. Here a comparison to the so-called DTPs (drug tolerant persisters) can be drawn. DTPs are cancer cells in a transient slow-cycling state, that show resistance to apoptosis and characteristics of tumour stem cell. They are clinically associated with therapy resistance and recurrence, so that there is a great interest in targeting these cells. RAD18, in connection with the FA-pathway, has been identified as a potential target here.

# 1 EINLEITUNG

Iwan Iljitsch Golowin, die Hauptfigur des Romans *„Der Tod des Iwan Iljitsch“* von L. Tolstoi (veröffentlicht 1886), ist vermutlich einer der berühmtesten Krebspatienten der Literaturgeschichte. *„Sie wissen doch selber, daß Sie mir nicht helfen können. Lassen Sie mich also in Ruhe!“* äußerte er gegenüber einem der vielen konsultierten Ärzte. Keiner konnte auch nur im Geringsten etwas gegen seine Magenkrebskrankung ausrichten. Seit Tolstoi diesen Roman im Jahr 1886 schrieb, hat sich viel verändert. In den medizinischen Wissenschaften gab es große, bedeutende Durchbrüche; so auch in der Krebs-Forschung. Mittlerweile ist sehr viel über die Entstehung von malignen Tumoren bekannt. So hilflos wie die Ärzte in Tolstois Roman stehen die Mediziner ihnen heute bei Weitem nicht mehr gegenüber. Doch noch hat der Krebs seinen Schrecken nicht verloren.

Laut der Weltgesundheitsorganisation rangieren Krebserkrankungen weltweit ganz oben in der Statistik der Haupttodesursachen. Die Inzidenz an Krebserkrankungen steigt dabei kontinuierlich an. Die Mortalitätsrate verringert sich jedoch aufgrund neuer Untersuchungs- und Behandlungsmöglichkeiten. Trotzdem starben 2012 weltweit 8,2 Millionen Menschen an Krebs (*IARC - Section of Cancer Surveillance 2014*).

Der Kampf gegen den Krebs stützt sich auf drei Pfeiler: die Prävention, die Früherkennung und die Therapie. Im letzten Kapitel seines Standardwerkes *„The Biology of Cancer“* (2007) diskutiert *Robert A. Weinberg*, dass insbesondere in der Therapie seit Mitte der 1970er Jahre keine erheblichen Fortschritte mehr gemacht worden seien. Die Basis für die meisten der heute gängigen Behandlungsmethoden sei vor 1975 gelegt worden, was im starken Kontrast zum massiven Zuwachs an Wissen über die Pathogenese von malignen Erkrankungen seit dieser Zeit stehe. Die Zukunft gehöre daher der weiteren Entwicklung der neuen, spezifischen Therapien, die auf dem heutigen Wissen über molekulare und zelluläre Mechanismen aufbauen, wie zum Beispiel monoklonale Antikörper, niedermolekulare Therapeutika oder die Gen-Therapie.

## 1.1 Entstehung von Neoplasien - die „Mehr-Schritt-Tumorgnese“

Maligne Neoplasien entstehen durch fortschreitende Veränderungen aus zuvor normalen Zellen aller Gewebe. Die Tumorprogression wird dabei durch das Auftreten einer bestimmten Abfolge von Mutationen der DNA und durch epigenetische Veränderungen, die mit den phänotypischen Eigenschaften maligner



Abbildung 1.1 „Hallmarks of Cancer: The Next Generation“

Nach Hannahan und Weinberg erwerben maligne Neoplasien zehn biologischen Eigenschaften, die für sie kennzeichnend sind und die die Tumorprogression vorantreiben (modifiziert nach *Hannahan and Weinberg 2011*).

Zellen assoziiert sind, vorangetrieben (*Weinberg 2007*). Nach *Vogelstein et al. (2013)* enthält ein typischer, epithelialer Tumor Mutationen in zwei bis acht

„Treiber-Genen“ (Driver Genes). Im Gegensatz zu diesen „Treiber-Mutationen“ stehen die vielen „Begleit-Mutationen“ (Passenger Mutations). Es handelt sich hierbei um präneoplastische Mutationen (auf Grund von Alterserscheinung und/oder als Resultat mutagener Noxen) oder um Mutationen, die aufgrund der Genom-Instabilität von Tumoren entstanden sind, die insgesamt aber keinen wesentlichen Effekt auf den neoplastischen Prozess haben. Für die „Treiber-Mutationen“ ist hingegen charakteristisch, dass sie einen Überlebensvorteil der Tumorzellen gegenüber den normalen Zellen erzeugen. Die erste oder auch „Torhüter-Mutation“ (Gate-Keeping Mutation) sorgt für einen selektiven Wachstumsvorteil der Zellen. In der weiteren Tumorprogression entstehen Mutationen in weiteren Genen. Die Tumorzellen erwerben weitere Überlebensvorteile und es folgt eine klonale Expansion mit folgender Invasion bis hin zur Metastasierung. Neben den „Treiber-Mutationen“ spielen in der Tumorentstehung auch Veränderungen in „Epi-Treiber-Genen“ (Epi-Driver-Genes) eine große Rolle. Diese Gene zeigen keine Mutation; sie sind allerdings in Tumoren über- oder unterexprimiert oder zeigen epigenetische Veränderungen (*Vogelstein et al. 2013*).

Die „Treiber-Gene“ sind mit ihren Funktionen an vielen Signalkaskaden beteiligt, die laut *Vogelstein et al. (2013)* drei zellulären Hauptprozessen zugeordnet werden können:

- dem Zell-Schicksal - Die präzise Balance zwischen Differenzierungsgrad und Teilungspotential einer Tumorzelle ist in Richtung der Entdifferenzierung und verstärkter Zellteilung verschoben.
- dem Zellwachstum - Tumorzellen erlangen die Fähigkeit unter limitierenden Bedingungen und ohne äußere Signale stark zu proliferieren.
- der genomischen Integrität - Tumorzellen können trotz Mutationen, DNA-Schäden und Chromosomenaberrationen überleben; weitere genomische Veränderungen werden begünstigt.



Nach *Hanahan und Weinberg (2011)* gibt es zehn biologische Eigenschaften, die für maligne Neoplasien kennzeichnend sind und während der „Multi-step“-Entwicklung der Tumorprogression erworben werden (Abbildung 1.1). Dazu zählen unter anderem die Fähigkeit zur eigenständigen Proliferation ohne externes Wachstumssignal, Apoptose-Resistenz, replikativen Unsterblichkeit oder Angiogenese-Induktion. Tumorzellen zeigen außerdem eine charakteristische Deregulierung des zellulären Energiehaushaltes (metabolischer „Switch“ vom physiologischen Stoffwechsel zur aeroben Glykolyse – Warburg Effekt). Eine weitere wichtige Eigenschaft ist die Fähigkeit, den Regulations- und Kontrollmechanismen der Zelle entgehen zu können. Bei den großen Gegenregulatoren der Zellproliferation handelt sich zum Beispiel um die Tumorsuppressorgene RB und TP53, deren Funktion im Verlauf der Entwicklung von einer normalen zu einer entarteten Zelle ausgeschaltet werden muss (*Hanahan und Weinberg 2011*).

## **1.2 Onkogene und Tumorsuppressorgene**

Maligne Neoplasien entstehen also, wenn das sensible Gleichgewicht zwischen pro- und anti-proliferativen beziehungsweise pro- und anti-apoptotischen Signalen gestört ist. Onko- und Tumorsuppressorgene stehen sich dabei als kritische Regulatoren dieser Signalwege gegenüber.

Generell versteht man unter Onkogenen in Neoplasien überaktive, die Zellproliferation bzw. das Zellüberleben fördernde Gene. Nach ihrer Aktivierung treiben sie die Zellteilung voran oder tragen zur Entwicklung anderer Schlüssel-Eigenschaften maligner Neoplasien bei: Aus Proto-Onkogenen werden durch Mutationen oder durch epigenetische Veränderungen, die zu einer Überexpression beziehungsweise Überaktivität führen, Onkogene (*Weinberg 2007*). Ein charakteristisches Beispiel ist das Ras-Onkogen, dessen GTPase Aktivität durch eine Punktmutation reduziert wird, was eine Überaktivität der Signaltransduktion, beispielsweise im MAPK-Signalweg, und somit letztendlich vermehrte Mitose-stimulierenden Signale innerhalb der Zelle zur Folge hat (*Lowy & Willumsen 1993*).

Andere Onkogene werden dereguliert, indem ihre Expression unter die Kontrolle eines viralen Transkriptionspromoters gebracht wird (*Weinberg 2007*). Davon abzugrenzen sind Retroviren oder auch einige DNA-Viren, die durch das Einbringen von viralen Onkogenen in das humane Genom zu einer Zelltransformation der infizierten Zelle führen (*Weinberg 2007*). Ein weiterer weitverbreiteter Mechanismus innerhalb der Tumorprogression ist die Amplifikation von Onkogenen (*Weinberg 2007*). Ein gut erforschtes Beispiel hierfür ist der ErbB2-Rezeptor, eine Protein-Tyrosin-Kinase (PTK), die zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGF-Rezeptoren) gehört und dessen verstärkte Rezeptoraktivierung (zum Beispiel durch eine Amplifikation) zu einer verstärkten Stimulation der nachfolgenden zytoplasmatischen Signalkaskade und somit zu verstärkter Proliferation und Hemmung von Apoptose führt (*Blume-Jensen & Hunter 2001*).

Im Gegensatz zu den Onkogenen stehen die Tumorsuppressorgene, die kontrollierend auf die Zellproliferation wirken. Ihre allgemeine Aufgabe besteht darin, eine verstärkte Zellvermehrung zu unterdrücken und die genomische Integrität zu überwachen (*Weinberg 2007*). Dabei sind die Tumorsuppressorgene an verschiedensten zellulären Aktivitäten beteiligt, wie Zellzyklus-Checkpoints, der Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden, der Protein-Ubiquitinierung und -Degradierung, an der Weiterleitung mitogener Signale oder an der Zelldifferenzierung oder -migration (*Weinberg 2007*) (*Sherr 2004*). Ihnen gemein ist, dass ihr Verlust zur neoplastischen Transformation der Zelle führt oder die Wahrscheinlichkeit dieses Prozesses zumindest deutlich erhöht. Der Funktionsverlust eines Tumorsuppressorgens kann durch genetische Mutation oder epigenetische Stilllegung entstehen. Häufig ist die andere Kopie des Gens durch Verlust dieser chromosomalen Region durch chromosomale Fehl-Segregation oder mitotische Rekombination verloren gegangen (Loss of Heterozygosity – Verlust der Heterozygotie) (*Weinberg 2007*).

Ein gut erforschtes Beispiel eines Tumorsuppressorgens ist das APC-Gen. Eine Keimbahn-Mutation des APC-Gens führt zur Entwicklung der familiären

adenomatösen Polyposis coli. In sporadischen kolorektalen Tumoren trägt das APC-Gen meist eine erworbene Mutation (*Fodde, Smits & Clevers 2001*).

Von herausragender Bedeutung sind RB und TP53. Sie waren die ersten Tumorsuppressoren, die kloniert wurden und sie sind in der Mehrzahl aller Neoplasien dereguliert (*Weinberg 2007*). Die vielen anderen seit der Entdeckung von RB und TP53 identifizierten Tumorsuppressorgene sind im Gegensatz dazu oft jeweils in der Pathogenese von umschriebenen Tumor-Untergruppen von Bedeutung oder spielen eine Rolle in familiären Tumor-assoziierten Syndromen (*Weinberg 2007*).

Das Rb-Protein kontrolliert die Zellzyklus-Progression von der G1 in die S-Phase. Es reguliert dabei unter anderem das Durchschreiten des kritischen R-Punkts (Restriktionspunkt), an dem sich entscheidet, ob die Zelle in der G1-Phase verbleibt und möglicherweise in die G0-Ruhephase eintritt oder im Zellzyklus voranschreiten darf und sich teilt. Es gibt verschiedene Wege, wie Krebszellen die hemmende Funktion des RB-Proteins auf die Zellzyklus-Progression überwinden, beispielsweise durch Mutationen des RB-Gen oder durch Bindung von pRb durch ein virales Onkoprotein, was jeweils zu einem Funktionsverlust führt (*Weinberg 2007*).

RB übermittelt Wachstums-inhibierende Signale, die vor allem von außerhalb der Zelle stammen. Im Gegensatz dazu gilt TP53 als „Erster Wächter“ über die Ordnung im Inneren der Zelle („*Master Guardian and Executioner*“ *R.A. Weinberg 2007*). Es integriert die zellinternen Informationen über Zellstress, gestörte Funktionen oder DNA-Schäden und kann den weiteren Zellzyklus-Progress bis zur Normalisierung aller Systeme stoppen, Seneszenz oder bei immensen Schäden Apoptose einleiten. Keimbahnmutationen einer TP53-Kopie führen zu einer frühen Entwicklung multipler Tumore (Li-Fraumeni-Syndrom); TP53 Knockout-Mäuse zeigen verschiedenste maligne Neoplasien mit hoher Penetranz (*Weinberg 2007*) (*Levine & Oren 2009*) (*Hanahan & Weinberg 2011*).

## 1.3 p53 – Wächter über die zelluläre Integrität

### 1.3.1 Die Tumorsuppressor-Funktion von p53

Das TP53-Gen liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom sieben und besteht aus 19200 Basenpaaren einschließlich 11 Exons. Es sind drei Promotorregionen bekannt und insgesamt zwölf p53 Isoformen wurden bisher beschrieben (*Pflaum, Schlosser & Müller 2014*). Die hervorstechendste Eigenschaft von p53 ist seine Rolle als Transkriptionsfaktor. In der DNA-Bindungs-Domäne, die in den meisten p53-Isoformen vorhanden ist, treten am häufigsten Mutationen auf. Mit der DNA-Bindungs-Domäne bindet p53 an seine Zielgene, von denen die meisten an Apoptose oder an der Zellzyklus-Kontrolle beteiligt sind. Das p53-Protein hat zusätzlich auch noch eine nicht-transkriptionelle Aktivität durch Interaktion mit anderen Proteinen in Zellkern und -plasma (*Pflaum, Schlosser & Müller 2014*) (*Levine & Oren 2009*). Die vielfältigen Funktionen von p53 werden über verschiedenste Effektorproteine gesteuert, die beispielsweise als negativer Regulator verschiedener Cyclin-abhängiger Kinasen (CDKs) sowohl die G1/S- als auch die G2/M-Progression blockieren oder auch als pro-apoptotischen Proteine anti-apoptotischen Proteine inhibieren (*Pflaum, Schlosser & Müller 2014*) (*Vogelstein, Lane & Levine 2000*). Neben der Einleitung von Apoptose oder Zellzyklus-Arrest hat p53 noch weitere wichtige Funktionen, beispielsweise im Rahmen der Angiogenese oder des Zell-Metabolismus. Dabei inhibiert es die Formation neuer Blutgefäße und antagonisiert den Warburg Effekt (*Vogelstein, Lane & Levine 2000*). Außerdem spielt p53 eine Rolle in der Zelldifferenzierung, Autophagie und bei der DNA-Reparatur (*Aylon & Oren 2011*).

### 1.3.2 Wie wird p53 aktiviert?

Bereits frühe Arbeiten zeigten, dass das p53-Level nach DNA-Schäden, z.B. DNA-Doppelstrangbrüchen nach radioaktiver Strahlung, rasch ansteigt. Diese p53-Aktivierung nach DNA-Schäden ist vor allem von der Kinase ATM abhängig (*Vogelstein, Lane & Levine 2000*). Unabhängig von DNA-Schäden kann p53 auch

durch zelleigene Onkogene aktiviert werden. Dieser Signalweg läuft über das Protein p14<sup>ARF</sup> (ARF), das auf dem dem sogenannten INK4/ARF-Lokus codiert ist und das nach Onkogenexpression vermehrt im Nukleus stabilisiert wird, ab (*Weber et al. 1999*) (*Vogelstein, Lane & Levine 2000*). Eine weitere Signalkaskade, die durch verschiedenste Stimuli wie Ultraviolette Strahlung oder Chemotherapeutika in Gang gesetzt wird, läuft über die Kinasen ATR und Casein-Kinase-II ab (*Vogelstein, Lane & Levine 2000*). Das Resultat dieser verschiedenen Signalkaskaden ist jeweils die Inhibition der Interaktion von p53 und einer E3-Ubiquitin-Protein-Ligase namens MDM2, welche p53 für den Export aus dem Zellkern und folgend zur proteasomalen Degradierung markiert sowie auch dessen Transaktivierungsdomäne blockiert. Unter stabilen Bedingungen wird die p53-Verfügbarkeit auf niedrigem Niveau gehalten, da MDM2 ein direktes Transkriptionsziel von p53 darstellt und so eine negative Rückkopplung entsteht (negativer „Feedback-Loop“). Nach DNA-Schaden, vermehrter Expression von Onkogenen, Strahlungsschäden oder allgemein zellulärem Stress wird daher die Interaktion von MDM2 und p53 unterbunden; als Resultat wird p53 in höherer Konzentration stabilisiert (*Vogelstein, Lane & Levine 2000*). Die MDM2-p53 Bindung kann über die Phosphorylierung von p53 am Amino-Terminus in der Nähe der MDM2-Bindestelle durch die oben genannten Kinasen gehemmt werden. ARF bindet hingegen MDM2, sorgt für dessen Degradierung und antagonisiert so dessen Funktion (Abbildung 1.2) (*Weber et al. 1999*) (*Zhang et al. 1998*) (*Vogelstein, Lane & Levine 2000*) (*Levine & Oren 2009*).

Neben der Veränderung des p53-Niveaus sind aber auch posttranslationale Modifikationen - wie das Anhängen oder Entfernen von Phosphat-, Acetyl-, Glycosyl-, Ribose-, Ubiquitin- oder 'Sumo'-Gruppe - für die p53-Funktion von Bedeutung. Ohne Modifikationen liegt der Carboxy-Terminus auf Grund sterischer Hinderung vor der DNA-Bindungs-Domäne. Durch die Acetylierung von Lysinresten oder der Phosphorylierung von Serinresten am Carboxyterminus und der folgenden Konformationsänderung wird die DNA-Bindungskapazität von p53 erhöht (*Vogelstein, Lane & Levine 2000*).

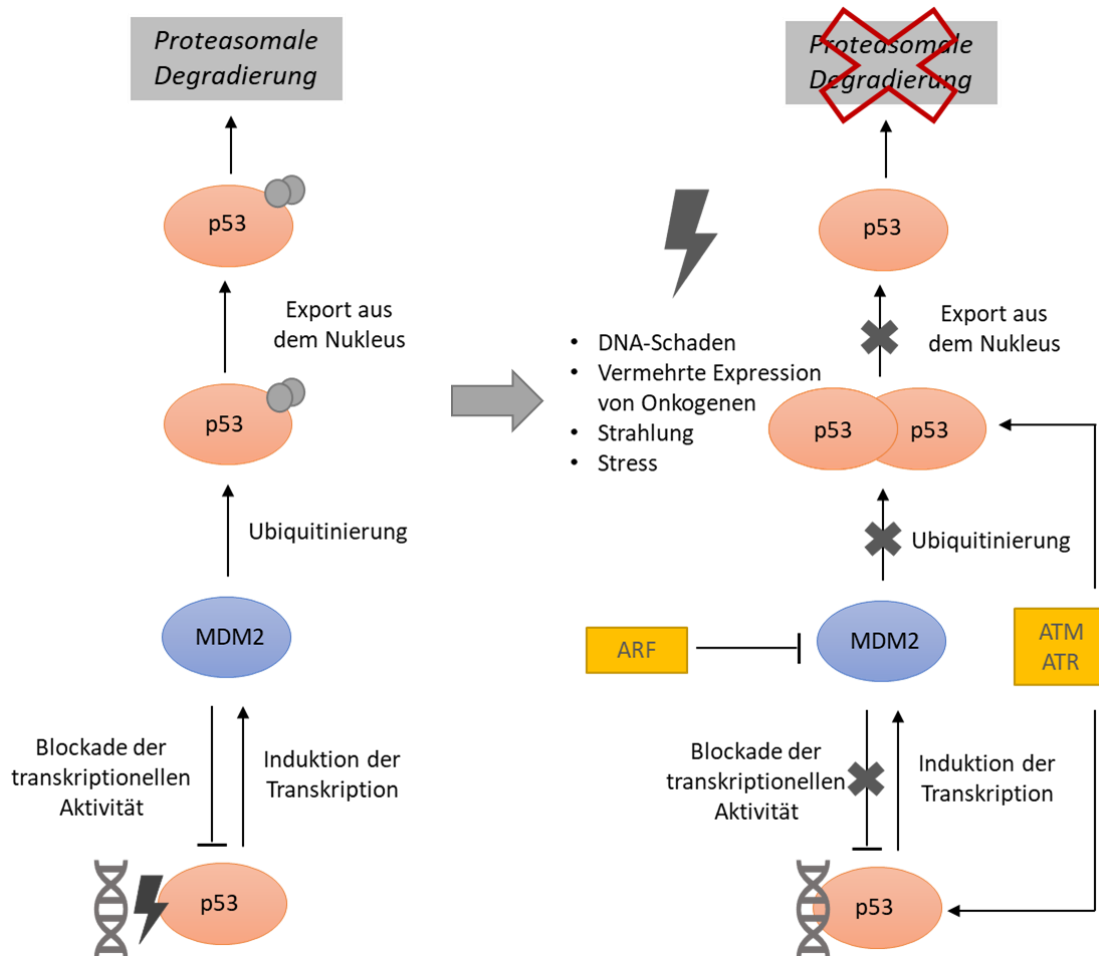


Abbildung 1.2 Die p53-MDM2-Interaktion

MDM2 ist der wesentliche Negativ-Regulator von p53, welcher durch direkte Protein-Protein-Interaktion dessen Funktion hemmt: Bei MDM2 handelt es sich um eine E3-Ligase, die p53 durch Ubiquitinierung zum nukleolären Export und proteasomalen Degradation markiert. Daneben bindet es die Transaktivierungsdomäne von p53 und blockiert so dessen transkriptionelle Aktivität. P53 wiederum induziert die Transkription von MDM2 (negativer „Feedback-Loop“), sodass unter normalen Bedingungen p53 nur in niedrigen Levels in der Zelle vorliegt (linke Seite der Abbildung). Unter DNA-Schaden, vermehrter Expression von Onkogenen, Strahlungsschäden oder allgemein zellulärem Stress kommt es unter anderem zu einer Aktivierung der Kinasen ATM und ATR sowie des Proteins ARF, wodurch die MDM2-p53-Interaktion unterbunden wird. ARF blockiert hierbei MDM2, während ATM und ATR P53 phosphorylieren und so dessen Bindung zu MDM2 verhindern. P53 wird dann vermehrt im Zellkern stabilisiert und kann seine vielfältigen (transkriptionellen) Funktionen ausüben (rechte Seite der Abbildung) (*basierend auf Vogelstein, Lane & Levine 2000 und Shangary und Wang 2009*).

Auch die Aktivität von MDM2 kann durch Modifikationen verändert werden. Phosphorylierungen durch die ATM-Kinase an Serin 395 führt zur Inaktivierung von MDM2, während Phosphorylierungen an Serin 166 und 186 ausgelöst durch mitogene Signale zu erhöhter Aktivität führen (*Meek & Knippschild 2004*).

Ein weiterer Negativ-Regulator von p53 ist MDMX (auch MDM4 genannt). Auch MDMX bindet p53 und verhindert so dessen Transaktivierungs-Aktivität. Außerdem kann MDMX die E3-Ligase-Aktivität von MDM2 erhöhen, besitzt selbst aber keine Ligase-Aktivität (*Levine & Oren 2009*) (*Shadfan et al. 2012*).

### **1.3.3 p53-Aktivierung - Apoptose oder Zellzyklus-Arrest?**

Trotz vieler Studien bleibt die Frage, welche Einflussgröße p53 in exakt welche Richtung der zellulären Antwort lenkt, noch offen. Inzwischen weiß man aber, dass das Zell-Schicksal nach einer p53-Aktivierung von mehreren Faktoren abhängig ist: verschiedenen post-translationalen Modifikationen, kooperativem Binden an die DNA, Niveau und Dauer der Aktivierung sowie der Bindung an Cofaktoren (*Khoo, Verma & Lane 2014*) (*Selivanova 2014*). Eine Phosphorylierung von p53 an Ser46 nach DNA-Schaden oder eine Acetylierung an Lys120 führen zum Beispiel zu einer bevorzugten Transkription pro-apoptotischer Gene. Weiterhin erfordert die Bindung von p53 an Apoptose-einleitende Gene ein Höchstmaß an kooperativen Bindungen. Co-Faktoren wie ASPP1 oder ASPP2 fördern die Bindung von p53 an die Promotor-Regionen pro-apoptotischer Gene wie BAX oder PIG3 und führen so zu einer Apoptose-Einleitung. Im Gegensatz dazu resultiert aus dem Zusammenwirken von p53 und Co-Faktoren wie hnRNP K, Hzf1 oder Brn3A Zellzyklus-Arrest. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sehr hohe Level von p53-Protein in der Zelle zu einer Apoptose-Einleitung, während niedrigere Level eher zu Zellzyklus-Arrest führen. Weiterhin scheint die transkriptionelle Repression wichtiger Proliferations-Faktoren, wie c-Myc oder Mcl1, durch p53 eine wichtige Rolle bei der Apoptose-Einleitung zu spielen. Dabei sind allerdings die Mechanismen der transkriptionellen Repression im Gegensatz zur Transaktivierungsfunktion von p53 insgesamt noch

nicht hinreichend verstanden (Enge *et al.* 2009) (Khoo, Verma & Lane 2014) (Selivanova 2014).

### 1.3.4 p53 als Angriffsziel in der Tumorthherapie

Das p53-Gen liegt in 50% aller humanen Tumore in mutierter Form vor. In den anderen 50%, den WT(Wildtyp)-p53 tragenden Tumoren, ist es meist dereguliert oder es finden sich gravierende Veränderungen in der p53-Signalkaskade (Vogelstein & Kinzler 1992) (Levine & Oren 2009).

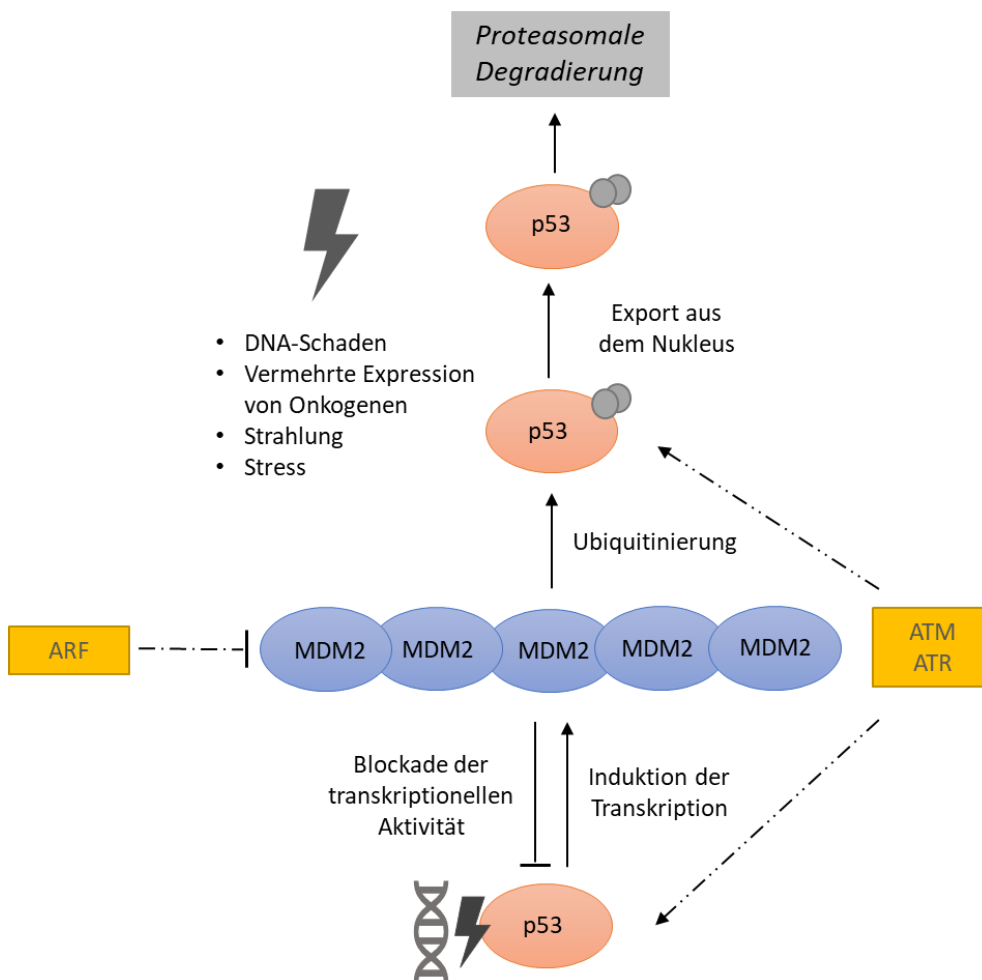


Abbildung 1.3 Dereguliertes MDM2 in malignen Neoplasien

In malignen Neoplasien (mit p53-WT) kommt es zu einer verstärkten MDM2-Aktivität (z.B. durch Amplifikation oder Überexpression), sodass trotz auffälliger Signale/zellulärem Stress p53 weiterhin durch MDM2 inhibiert wird (basierend auf Vogelstein, Lane & Levine 2000, Shangary und Wang 2009 und Chène 2003).



Die Inaktivierung von p53 kann zum einen durch Punktmutationen im TP53-Gen, die die DNA-Bindungskapazität verringern, zum anderen durch überaktive Inhibitoren (wie MDM2 (Abbildung 1.3), das virale Onkoprotein HPV E6 oder p53-Inhibitoren wie iASPP,  $\Delta Np73$ ) geschehen (Selivanova 2010). p53 ist damit das am häufigsten in seiner Funktion beeinträchtigte Gen aller malignen Neoplasien und von besonderer Bedeutung als Angriffsziel in der Entwicklung von Strategien gegen Krebserkrankungen (Chène 2003) (Levine & Oren 2009) (Kim & Dass 2011). Es konnte schon früh in vivo im Mausmodell gezeigt werden, dass die Wiederherstellung der p53-Funktion allein zur Tumorregression ausreichen kann (Ventura et al. 2007).

In Ihrem Review „*Therapeutic targeting of p53 by small molecules*“ diskutiert G. Selivanova (2010), dass Tumorsuppressoren wie p53 als Angriffspunkt in der gezielten Pharmakotherapie maligner Neoplasien im Vergleich zu den Onkogenen bisher eher vernachlässigt wurden. Dies sei damit zu erklären, dass es generell einfacher sei Onkogene, bei denen es sich vor allem um Enzyme handele, in ihrer enzymatischen Aktivität zu blockieren, als die Funktion eines Tumorsuppressors wiederherzustellen. Auch in der Klinik findet die spezifische Pharmakotherapie bereits seit einiger Zeit Anwendung und richtete sich dabei zunächst gegen verschiedene Onkogene. Zu nennen wären dabei die Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (z.B. Imatinib oder Erlotinib), Inhibitoren bzw. Antikörper gegen EGFR (z.B. Cetuximab) oder Antikörper gegen VEGF (Bevacizumab) und HER2/neu (Trastuzumab) (Dietel, Harrisons Innere Medizin 2012). Zunehmend findet jedoch auch die spezifische Pharmakotherapie, die sich gegen Tumorsuppressoren richtet ihren Weg in die klinische Anwendung (Morris & Chan 2015). Eine zukünftige, erfolgreiche Krebstherapie zeichne sich laut Selivanova (2010) dadurch aus, dass sie unter den dutzenden und teils sehr individuellen Veränderungen in Tumoren den kritischen Knotenpunkt für die Entwicklung und das Überleben einer Tumorzelle attackiere und dabei nicht veränderte Zellen schone. Dies sei bei p53 der Fall. Die p53-induzierten negativen Effekte auf das Zellüberleben scheinen nur in Zellen mit

vermehrten Stresssignalen getriggert zu werden; normale Zellen bleiben daher davon verschont. Einmal aktiv ist p53 direkt an der Einleitung von Apoptose und Seneszenz beteiligt. Neben dem Zelltod und der Wachstumssuppression spielt p53 aber auch eine wichtige Rolle in der Regulierung anderer Schlüssel-Eigenschaften der Tumorprogression, wie dem Metabolismus, der Angiogenese, dem Tumorstroma oder dem Schutz vor oxidativem Stress. Laut *Selivanova (2010)* liege in der Reaktivierung von p53 durch gezielte Pharmakotherapie daher der Schlüssel zu einer erfolgreichen Krebstherapie. In den letzten Jahren seien erhebliche Fortschritte in der Reaktivierung der p53-Funktion insbesondere durch niedermolekulare Verbindungen (small molecules) gemacht worden, was *Selivanova (2010)* als vielversprechenden, zukünftigen Therapieansatz sieht.

### **1.3.5 p53-Reaktivierung durch niedermolekulare Verbindungen**

Es gibt verschiedene Strategien der p53-Reaktivierung durch niedermolekulare Verbindungen. Hier kann man zunächst zwischen Agenzien, die die Funktion von mutiertem p53 (Mut-p53) wiederherstellen und denen die WT-p53 reaktivieren, unterscheiden. Der erste Mut-p53-Reaktivator, CP-31398, wurde bereits 1999 identifiziert (*Li et al. 2019*). Hier konnte mutiertes p53 im Mausmodell wieder in seiner Funktion reaktiviert werden. Die 2002 durch *Bykov et al.* identifizierte niedermolekulare Verbindung PRIMA kann die p53-Funktion über die Wiederherstellung der DNA-Bindung-Kapazität reaktivieren. Ein Derivat von PRIMA-1 (PRIMA-1<sup>MET</sup>) befindet sich in einer Klinischen Studie Phase I/II. Insgesamt wurden bereits etliche Verbindungen entwickelt, die durch unterschiedliche Mechanismen eine Mut-p53-Reaktivierung bewirken können. Die Mehrheit ist jedoch wenig spezifisch in ihrer Wirkungsweise und es zeigen sich häufig auch p53 unabhängige Effekte (*Li et al. 2019*).

Es gibt ebenfalls verschiedene Möglichkeiten die p53-Funktion in WT-p53 wiederherzustellen. Dabei ist die Interaktion zwischen p53 und MDM2 ein vielversprechender Angriffspunkt. MDM2 ist der kritische Negativregulator der p53-

Funktion (s. oben). Es wird daher in p53-WT-Tumoren häufig überexprimiert oder liegt in amplifizierter Form vor (Abbildung 1.3).

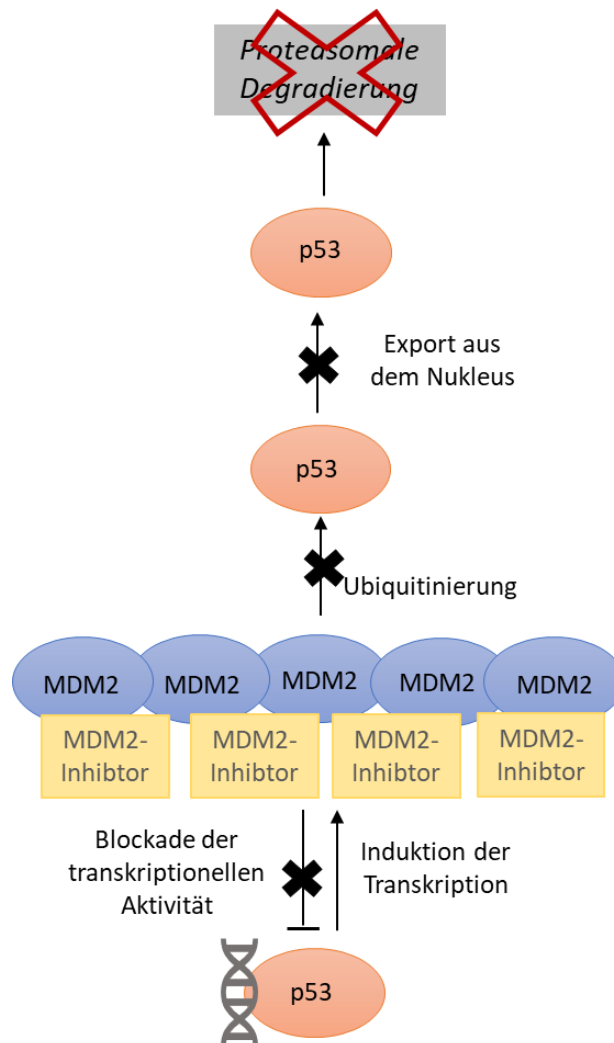


Abbildung 1.4 Blockade der p53-MDM2-Interaktion durch MDM2-Inhibitoren

Durch eine (medikamentöse) Inhibition der MDM2-p53-Interaktion (z.B. durch niedermolekulare Wirkstoffe) wird die Repression von p53 durch verstärkt aktives MDM2 verhindert, sodass p53 wieder vermehrt stabilisiert wird und seiner (Transkriptionsfaktor-)Funktionen nachgehen kann (basierend auf *Vogelstein, Lane & Levine 2000, Chène 2003 und Shangary und Wang 2009*).

Durch die Inhibition der p53-MDM2 Interaktion wird p53 in Tumorzellen vermehrt stabilisiert und kann so seine vielfältigen Tumorsuppressor-Funktionen ausüben (Abbildung 1.4) (*Chène 2003*) (*Levine & Oren 2009*) (*Shangary und Wang 2009*).

Das erste bekannte Molekül, das die p53-MDM2-Interaktion verhinderte, war Nutlin (*Kim & Dass 2011*). Die Familie der Nutlins wurde in einem Screen einer chemischen

Substanzbibliothek durch *Vassilev et al. (2004)* entdeckt. Nutlins binden dabei MDM2 und blockieren die p53-Bindungstasche, sodass p53 in p53-WT-Zellen, nicht aber in p53-mutierten- oder p53-Null-Zellen, wieder stabilisiert wird und die nachfolgenden Signalkaskaden aktiviert werden. Nach der Behandlung von Tumor-Zellen mit Nutlin kommt es zum Zellzyklusarrest und folgend einer Wachstumssuppression in vitro und in vivo (*Vassilev et al. 2004*). Die Nutlin-Derivate RG7112 und RG7388 werden zurzeit für verschiedene Tumorentitäten in Phase I, II und RG7388 bereits in einer Phase III Studie (hier in Kombination mit Cytarabin) zur Frage einer möglichen klinischen Anwendung getestet (*Sanz et al. 2019*). Etwa ein Jahr nach Nutlin wurde RITA (reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis), vorher zunächst als NSC652287 gekennzeichnet, von *Issaeva et al. (2004)* identifiziert. RITA bindet nach *Issaeva et al. (2004)* direkt an p53 und verhindert auf diesem Weg dessen Interaktion mit MDM2. Interessanterweise induziert RITA dabei im Vergleich zu Nutlin nicht nur Zellzyklus-Arrest, sondern sogar Apoptose (*Kim & Dass 2011*).

Neben RITA und Nutlin gibt es eine Reihe weiterer p53-WT-Reaktivatoren, die über eine Inhibition der p53-MDM2/MDMX-Interaktion wirken. Dazu zählen beispielsweise Moleküle aus den Gruppen der Spirooxindole und Piperidinone, welche ebenfalls teilweise bereits in klinischen Studien der Phase I und Ib/IIa getestet werden (*Merkel et al. 2017*) (*Sanz et al. 2019*).

Häufig handelt es sich um niedermolekulare Verbindungen (small molecules). Deren Vorteil gegenüber Peptiden liegt in einer einfacheren systemischen Verteilung und besseren Verträglichkeit. Zusätzlich ist die Produktion weniger kompliziert und preisgünstiger (*Selivanova 2010*).

## **1.4 RITA (reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis)**

### **1.4.1 Der niedermolekulare Wirkstoff RITA**

RITA (siehe Abbildung 1.5) wurde von *Issaeva et al. (2004)* in einem zellbasierten Screen in einer Bibliothek niedermolekularer Substanzen identifiziert. Dabei sollten in einem Zell-Proliferations-Assay Agenzien gefunden werden, die das

Tumorzellwachstum in Abhängigkeit von p53 supprimieren. Es konnte ursprünglich gezeigt werden, dass RITA in p53-WT-Tumorzellen, nicht aber in nicht-malignen Zellen wie Fibroblasten und Lymphoblasten, das Zellwachstum p53-vermittelt inhibiert. RITA bindet dabei an den N-Terminus von p53 und induziert damit eine Konformationsänderung, welche die Bindung an MDM2 verhindert. Es kommt so zu einer dosisabhängigen p53-Aktivierung durch RITA. Die Formation von p53-MDM2-Komplexen wird um mehr als das Dreifache reduziert und die Ubiquitinierung von p53 unterbunden. Die Transkriptions-Funktion von p53 wird aktiviert. Daraus resultiert vor allem die Einleitung von Apoptose, weniger von Zellzyklus-Arrest. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass RITA in vivo keine Toxizität aufweist, dabei aber das Tumorwachstum sehr stark supprimiert (*Issaeva et al. 2004*).

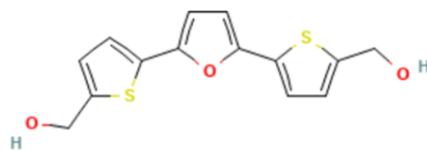


Abbildung 1.5 RITA - NSC 652287 – 2,5-bis(5-hydroxymethyl-2-thienyl)furan

C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub> NIH National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information (*PubChem* - CID: 374536).

Der von *Issaeva et al. (2004)* geschilderte RITA-induzierte Effekt auf das Zellwachstum konnte in vielen Tumorzelllinien nachgewiesen werden. Die Behandlung von Tumorellen mit RITA führt zu einer signifikanten Rate an Apoptose, beispielsweise in IGROV1-, H460- oder NTERA-2D1-Zellen, mit einer nur marginalen Zelltod-Rate in WT-p53 exprimierenden, nicht-malignen Zellen (*Weilbacher et al. 2014*). Dieser Effekt zeigte sich zum Beispiel auch auf Myelom-Zellen (*Surget et al. 2014*) oder Cervix-Carcinom Zellen (*Zhao et al. 2010*) sowie A498-, A549-, HCT116- oder U2OS-Zellen (*Enge et al. 2009*).

#### 1.4.2 Apoptose-Einleitung durch RITA

In den frühen Arbeiten zu RITA wurde dessen Eigenschaft der bevorzugten Apoptose-Einleitung (im Gegensatz zu beispielsweise vermehrtem Zellzyklus-Arrest)

großes Interesse entgegengebracht (*Selivanova 2010*) (*Enge et al. 2009*): Eine Mikroarray-Analyse nach RITA-Behandlung zeigte eine deutliche Aktivierung von proapoptotischen Zielgenen wie Fas, PUMA oder Noxa sowie von Signalwegen, die an Apoptose beteiligt sind (*Enge et al. 2009*). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch RITA aktiviertes p53 die Transkription anti-apoptotischer Proteine wie Mcl-1, Bcl-2 oder MAP4 unterdrückt (*Selivanova 2010*). Laut Enge et al. (2009) spielt außerdem der Umstand, dass RITA an p53 bindet und MDM2 somit aus der Bindung freigelassen und nicht in seiner Funktion beeinträchtigt wird, eine wichtige Rolle. Er entwickelte ein Modell, in dem das nach RITA-Behandlung freie und funktionelle MDM2, den Transkriptions-Cofaktor hnRNPk, der für die Induktion von Proarrest-Genen durch p53 verantwortlich ist, degradiert und so zur Apoptose-Einleitung beiträgt. In der oben genannten Microarray-Analyse (*Enge et al. 2009*) wurden jedoch neben den pro-apoptotischen Genen auch Signalwege, die mit DNA-Schaden in Verbindung stehen, als deutlich heraufreguliert gelistet, sodass RITA hier scheinbar auch eine gewisse Genotoxizität aufweist. Es wurde daher vermutet, dass die Induktion von DNA-Schadens-Signalen, die zusätzlich zur p53-Reaktivierung stattfindet, zu posttranslationalen Modifikationen führt, die die zelluläre Antwort in Richtung Apoptose verändern (*Selivanova 2010*). Auch ältere Studien, damals noch zu NSC-652287, beschreiben einen möglichen cytotoxischen Effekt durch DNA-Vernetzung durch RITA (*Doggrell 2005*).

Die Einleitung von Apoptose im Vergleich zur Induktion von Zellzyklusarrest ist ein großer Vorteil von RITA. Zum einen erscheint der Zelltod als Resultat einer Behandlung als grundsätzlich wünschenswertes Ergebnis. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass der p53 getriggerte Zellzyklusarrest auch die Sensitivität gegenüber chemotherapeutischer Behandlung verschlechtern kann, da Zellen in diesem Zustand insgesamt weniger angreifbar werden (*Moreno et al. 2007*). *Selivanova (2010)* charakterisiert in diesem Zusammenhang p53 als „Redeemer“ und „Exterminator“: „Redeemer“ in Sinne der Induktion von Zellzyklus-Arrest, DNA-Reparatur oder Antioxidantien, was zu Tumorprävention und Stabilität von Zellen, aber auch zu Langlebigkeit und Schutz vor Chemotherapie führt. „Exterminator“ im

Sinne seiner zentralen Rolle bezüglich der Einleitung von Apoptose und Seneszenz, was zur Elimination von Tumorzellen, aber auch zu Nebenwirkungen von Chemotherapien oder den Verlust von Zellen, z.B. nach Ischämien, führt.

RITA wurde in einem zellulären Assay, in dem nach einem gewünschten phänotypischen Zielparameter gesucht wurde, entdeckt. Dieser Ansatz hat generell den Vorteil, dass die identifizierten Moleküle, das gewünschte biologische Verhalten und dabei selten Genotoxizität zeigen. Allerdings kann es hier durchaus schwierig sein, den genauen biologischen Mechanismus hinter der beobachteten Wirkung aufzuklären (*Saha, Qui & Chang 2013*).

## **1.5 RITA-Toleranz**

### **1.5.1 Vorarbeiten zu RITA**

Auch im Fall von RITA konnte entgegen ursprünglicher Annahmen im Laufe der Zeit gezeigt werden, dass es neben seiner Wirkung auf p53-WT-Tumorzellen auch in verschiedenen Zelllinien, die mutiertes p53 exprimieren, Effekte zeigt (*Zhao et al. 2010*). *Wanzel et al. (2016)* wiesen nach, dass RITA (im Gegensatz zu Nutlin) die Proliferation von Tumorzellen unabhängig von funktionalem p53 inhibiert. In Zellkulturen, in denen in einem Teil der Zellen mit Hilfe des CRISPR/Cas9 Systems p53-Mutationen oder -Deletionen bzw. mittels siRNA (small interfering RNA) ein p53-Knockdown erzeugt wurde, zeigte sich nur nach Nutlin-Behandlung, nicht aber nach einer Behandlung mit RITA ein selektiver Wachstumsvorteil p53-defizienter Zellen. In erzeugten p53-defizienten Zellklonen der Zelllinien HCT116 und H460 zeigte sich keine Resistenz gegenüber einer Behandlung mit RITA (wohl aber mit Nutlin).

Daneben konnte die Hypothese, dass RITA eine Genotoxizität aufweist, untermauert werden. Eine Behandlung mit RITA führt zur Induktion von DNA-Schadens-Signalen innerhalb der Zelle.

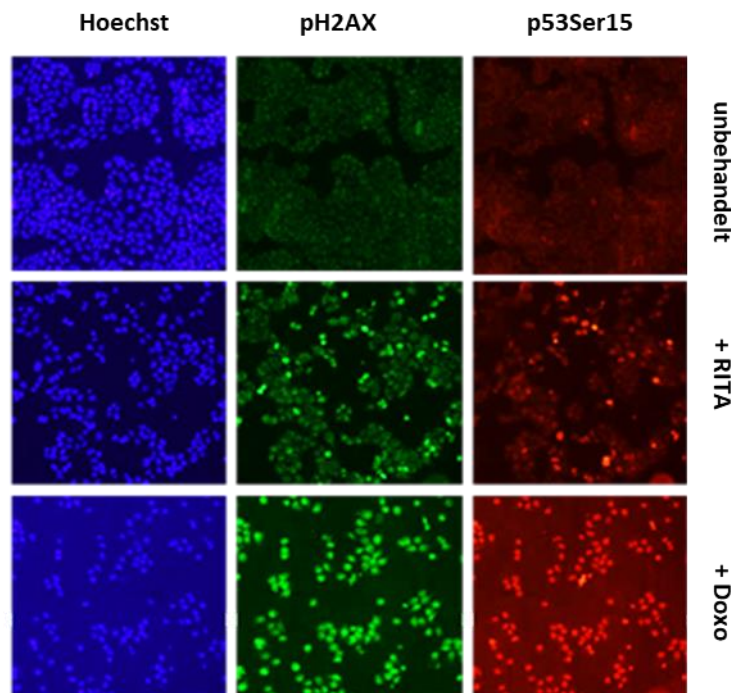


Abbildung 1.6 Nachweis von vermehrten DNA-Schadens-Signalen nach RITA-Behandlung  
 Immunfluoreszenz-Färbung von H460-Zellen unbehandelt sowie nach RITA- und Doxorubicin-Behandlung (Reihe 1-3); Hoechst-Färbung der DNA als Kontrolle (Spalte 1), Immunfluoreszenz-Färbung von  $\gamma$ H2A.X (Spalte 2) und p53<sup>pSer15</sup> (Spalte 3). Verstärkte Phosphorylierung von H2A.X an Serin 139 und von p53 an Serin15 nach RITA- und Doxorubicin-Behandlung, entsprechend vermehrten DNA-Schadens-Signalen sowohl in Doxorubicin als auch in RITA (Referenz: PD Dr. Michael Wanzel, Vgl. auch *Wanzel et al. 2016*).

Eine Immunfluoreszenz-Färbung von H460 Zellen nach RITA-Behandlung zeigte eine erhöhte Phosphorylierung von H2A.X an Serin 139 und von p53 an Serin15 (Abbildung 1.6). Phosphorylierungen an diesen Stellen sind ein Marker für die zelluläre Antwort nach DNA-Schaden, insbesondere auch im Rahmen einer Chk2-Aktivierung (*Zhao et al. 2008*). Dazu passend wurde auch in der Literatur bereits beschrieben, dass die Einleitung der p53 induzierten Apoptose nach RITA-Behandlung von der Anwesenheit von Chk2 abhängig ist (*De Lange et al. 2012*).

Im Rahmen der Zellkultur-Versuchen mit RITA konnte beobachtet werden, dass bei H460-Zellen, die grundsätzlich sensitiv gegenüber einer Behandlung mit RITA sind, ein kleiner Prozentsatz von Zellen die Behandlung überlebte. Kultiviert man diese Zellen weiterhin unter RITA-Behandlung bilden sie Sphären aus (Abbildung 1.7). Aus



einzelnen hieraus isolierten Zellen oder einem Pool überlebender Zellen konnten verschiedene gegenüber RITA vermehrt resistente Zellenklone entwickelt werden. Weitere resistente Zelllinien konnten durch eine Behandlung mit einer über Monate langsam gesteigerten RITA-Dosis erzeugt werden. Die verschiedenen H460-Zellklone/Subzelllinien zeigen nach ihrer Etablierung jeweils ein vermehrtes Überleben nach RITA-Behandlung (Abbildung 1.8).

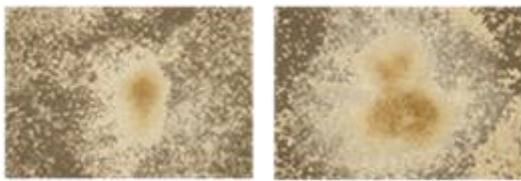


Abbildung 1.7 Sphären-Bildung der RITA-resistenten Zellklone  
(Referenz: PD Dr. Michael Wanzel, Vgl. auch *Wanzel et al.* 2016).

### 1.5.2 Arzneimittelresistenzen

Arzneimittelresistenzen stellen ein großes Problem in der Behandlung maligner Erkrankungen dar. Manche Tumorentitäten zeigen von Beginn an eine intrinsische Resistenz gegenüber einem Therapieregime (primäre Resistenz). Der Tumor kann jedoch ebenso trotz grundsätzlicher Sensitivität gegenüber einem Agens im Verlauf eine Toleranz entwickeln (sekundäre Resistenz). Dieses Phänomen stellt eine frustrierende Komplikation nach primärem Ansprechen einer Therapie dar (sowohl der „älteren“ Radio- und Chemotherapie-Regime als auch der „neueren“ zielgerichteten Therapien) (*Groenendijk & Bernards 2014*) (*Longley & Johnston 2004*). Die einer sekundären, erworbenen Resistenz zu Grunde liegenden Mechanismen sind auf verschiedenen Ebenen der zellulären Antwort zu finden und reichen von einem vermehrten Efflux oder der direkten Inaktivierung des Arzneimittels über Veränderungen im Bereich des spezifischen Angriffspunktes des Medikamentes bis zu einer abgewandelten Reaktion der Zelle auf die Wirkung der Substanz (*Groenendijk & Bernards 2014*) (*Ramos and Bentires-Alj 2015*).

Neben Resistenzmechanismen denen eine (potenziell bekannte und somit auch molekularbiologisch nachzuweisende) Mutation im spezifischen Angriffspunkt des Agens oder dessen Signalkaskade zu Grunde liegt, rücken auch vermehrt nicht-mutationsbedingte Mechanismen der Arzneimittelresistenz, die auf epigenetischen Veränderungen, Tumorzellplastizität und intratumoraler Heterogenität beruhen, in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses (*Boumahdi & Sauvage 2020*) (*Ramos and Bentires-Alj 2015*).

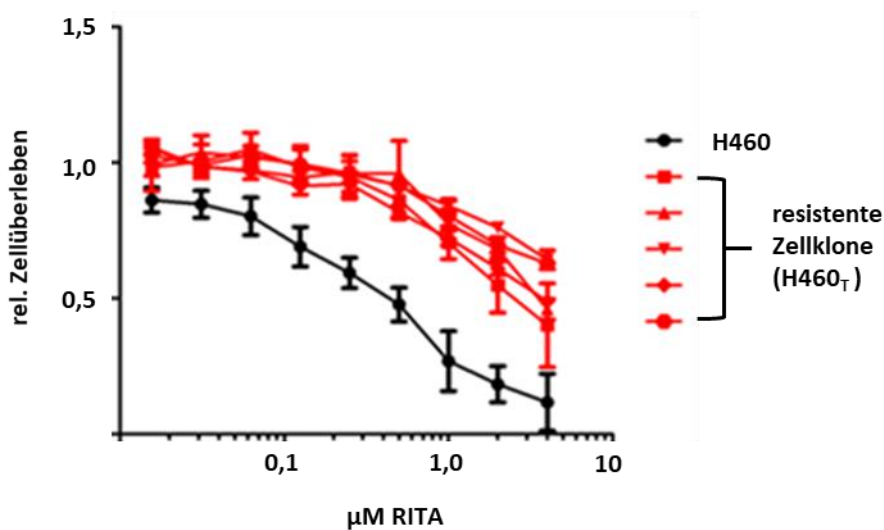


Abbildung 1.8 RITA- resistente Zellklone der grundsätzlich RITA-sensitiven, p53-WT Zelllinie H460  
Behandlung von parentalen H460- und resistenten H460<sub>T</sub>-Zellen mit unterschiedlichen RITA-Konzentrationen und Messung des Zellüberlebens nach drei Tagen im CellTiter-Glo-Assay in RLU normalisiert. Es zeigt sich ein vermehrtes relatives Überleben der resistenten H460<sub>T</sub>-Zellen gegenüber den parentalen H460-Zellen nach RITA-Behandlung (Referenz: PD Dr. Michael Wanzel, Vgl. auch *Wanzel et al. 2016*).

### 1.5.3 RITA-Toleranz

Es ist nicht davon auszugehen, dass es sich bei den RITA-resistenten H460-Zellen (H460<sub>T</sub>-Zellen) um eine Resistenz auf dem Boden einer p53-Mutation handelt. Dagegen spricht, dass die Klone weiterhin sensibel gegenüber einer Behandlung mit Nutlin bleiben, welches nur in Abhängigkeit von WT-p53 zu Zellzyklus-Arrest führt (*Wanzel et al. 2016*). Zusätzlich entstand bei sukzessiver Steigerung der RITA-

Konzentration in jedem Well einer 96-Well Platte in gleicher Weise ein resistenter Klon. Es trat nicht sporadisch eine Resistenz auf, wie es bei Mutationen zu erwarten wäre (*Wanzel et al. 2016*). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass nach dauerhafter Kultivierung ohne RITA wieder eine Resensitivierung der H460-Klone erreicht werden kann (*Wanzel et al. 2016*).

Es handelt es sich hierbei also nicht um eine durch Mutation erworbene Resistenz; die Zellen befinden sich vielmehr in einem reversiblen RITA-toleranten Zustand, weshalb auch in Zukunft der Begriff Toleranz und nicht mehr Resistenz verwendet wird. Auch in der Literatur wurden bereits transiente, nicht mutationsbedingte Mechanismen der Arzneimittelresistenz beschrieben. Die durch *Sharma et al. (2010)* beschriebenen sogenannten drug-tolerant persistors (DTPs) sind Subpopulationen von Tumorzellen, die sich in einem erworbenen, reversiblen Zustand der Arzneimittelresistenz befinden. Ihr Auftreten wird mit einer vermehrten Häufigkeit beobachtet, als bei mutationsbedingten Mechanismen zu erwarten wäre. Zusätzlich werden mit ihnen Eigenschaften von Tumorstammzellen in Verbindung gebracht (*Sharma et al. 2010*). Auch die RITA-resistenten H460-Zellen zeigen einige Eigenschaften von Stammzellen. Das oben beschriebene Ausbilden von Sphären ist ein Charakteristikum von Krebs-Stammzellen (*Pastrana, Silva-Vargas & Doebsch 2011*), genauso wie das vermehrte Exprimieren des Oberflächenmarkers CD133 (*Levina et al. 2008*). Eine Anreicherung von CD133 positiven Zellen konnte von Dr. Wanzel unter den RITA-resistenten Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie festgestellt werden (*Wanzel et al. 2016*). Auf Grund der Tumorstammzell-Eigenschaften kann ein vermehrter Medikamenten-Efflux aus der Zelle als möglicher Toleranzmechanismus diskutiert werden. Die gesteigerte Expression von ABC-Transportern, wodurch ein Agens verstärkt aus den Zellen hinausgepumpt wird, wurde in der Literatur als Mechanismus der Arzneimittel-Elimination von Tumorstammzellen beschrieben (*Hirschmann-Jax et al. 2004*). Um den Mechanismus der RITA-Toleranz in den Zellklonen aufzuklären, wurde daher ein siRNA-Screen einer Bibliothek aller ABC-Transporter durchgeführt. Es konnte dabei kein Transporter identifiziert werden, dessen Knockdown zur Aufhebung der RITA-

Toleranz führt. Auch eine Behandlung der toleranten Zellen mit Verapamil, einem Inhibitor der ABC-Transporter, zeigte keine signifikante Veränderung des Zellüberlebens. Somit ist davon auszugehen, dass hier nicht die Ursache der RITA-Toleranz zu finden ist (*Bachelor-Arbeit Förster 2012*). Auch *Sharma et al. (2010)* schlossen einen vermehrten Medikamenten-Efflux als zu Grunde liegende Mechanismus ihrer DTPs eher aus.

Interessanterweise zeigen die erzeugten H460-Zellklone neben einer Toleranz gegenüber der Behandlung mit RITA ebenfalls eine vermehrte Resistenz gegenüber verschiedenen DNA-Vernetzungsmitteln, wie Cisplatin, Oxaliplatin, Carmustin und Mitomycin C (*Wanzel et al. 2016*). Nach *Wanzel et al. (2016)* kann außerdem die in RITA-sensitiven Zellen gezeigte  $\gamma$ H2A.X-Akkumulation (als Zeichen der Reaktion der Zelle auf RITA-induzierte DNA-Schädigung) nicht für RITA-resistente HCT116-Zellen nachgewiesen werden. Diese Veränderung war ebenfalls nicht abhängig vom p53-Status der Zelle.

Zusammenfassend befinden sich die von Dr. Wanzel aus der Zelllinie H460 erzeugten Zellklone in einem scheinbar reversiblen, gegenüber RITA toleranten Zustand, welcher unter Behandlung mit RITA erworben und in längerer Kultivierung ohne RITA auch wieder verloren werden kann. Sie zeigen zumindest einige Eigenschaften von Tumorstammzellen. Der Mechanismus hinter der Toleranz liegt nicht in einer p53-Mutation, sondern scheint mit einer veränderten zellulären DNA-Schadens-Antwort nach RITA Behandlung zusammenzuhängen.

## **1.6 NSCLC-Zellen H460**

Bei den oben beschriebenen und weiterhin in dieser Arbeit verwendeten H460-Zellen handelt es sich um WT-p53 tragende Zellen eines großzelligen Lungenkarzinoms (*Carney 1985*). Das Lungenkarzinom stellt die häufigste krebsbedingte Todesursache in Nordamerika und Europa dar. Die generelle relative 5-Jahres-Überlebensrate mit einem Lungenkarzinom wird in Deutschland für 2013 mit etwa 16 % bei Männern und 21 % bei Frauen angegeben. Die 5-Jahres-Überlebenszeit variiert jedoch in Abhängigkeit vom Tumorstadium, dem Zeitpunkt

der Diagnose und dem Differenzierungsgrad sowie dem histologischen Typ des Tumors (*AWMF Leitlinie 2018*). Die überwiegende Mehrheit (80-90%) der Lungenkrebserkrankungen sind auf das Zigarettenrauchen als Hauptrisikofaktor zurückzuführen, seltener auf die Exposition mit Asbest, Arsen, sechswertigem Chrom, polyzyklischen Kohlenwasserstoffen oder Senfgas; aber auch Niemalsraucher bzw. Personengruppen ohne die genannten Risikofaktoren können betroffen sein (*Dietel, Harrisons Innere Medizin 2012*).

Traditionell wird zwischen den beiden Hauptgruppen der kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome unterschieden (small-cell-lung-cancer [SCLC] = kleinzelliges Lungenkarzinom, non-small-cell-lung-cancer [NSCLC] = nicht kleinzelliges Lungenkarzinom). Unter NSCLC werden das Adenokarzinom, das Plattenepithelkarzinom und großzellige Karzinome subsummiert; das SCLS bildet alleinig diese Kategorie (*Petersen 2011*). Die derzeit gültige WHO-Klassifikation (*WHO Classification of Tumours: Thoracic Tumours - 2021*) unterscheidet insgesamt noch deutlich mehr Subkategorien. Grundsätzlich werden in der histologischen Diagnostik Karzinome zunächst in die Kategorien des Adenokarzinoms, Plattenepithelkarzinoms oder neuroendokrinen Karzinoms, welches wiederum in das kleinzellige Karzinom und das großzellige neuroendokrine Karzinom unterteilt wird, eingeordnet. Die Diagnose des großzelligen Karzinoms (wie für die Zelllinie H460 beschrieben) ist letztendlich eine Ausschlussdiagnose und beschreibt ein gering differenziertes, nicht kleinzelliges Karzinom für das keiner der Marker einer adeno-, plattenepithelialen oder neuroendokrinen Differenzierung nachgewiesen werden kann (*WHO Classification of Tumours: Thoracic Tumours - 2021*).

Die Therapie von Lungenkarzinomen kann im Falle von NSCLC in bis zu 30% der Fälle zunächst operativ (meist kombiniert mit systemischer Therapie und/oder Bestrahlung) angegangen werden (*AWMF Leitlinie 2018*). Bei Inoperabilität, in fortgeschritteneren Stadien oder auch als palliatives Therapiekonzept stehen neben der traditionellen Radio-/Chemotherapie ebenfalls systemische molekulare Therapien (bei nachgewiesenen ALK Translokationen, BRAF V600E Mutation, EGFR Mutationen, NTRK Alterationen, ROS1 Translokationen oder RET Alterationen) oder

Immuntherapien (PD-L1-Inhibitoren) zur Verfügung (*AWMF Leitlinie 2018*) (*Onkopedia Guidelines NSCLC 2021*).

Die neueren zielgerichteten Wirkstoffe führten insgesamt zu verbesserten Therapiemöglichkeiten in den fortgeschritteneren Stadien der Lungenkrebserkrankung. Jedoch treten nach initialem Ansprechen (wie auch häufig im Rahmen der traditionellen Therapien) erworbene Resistenzen und die damit auch letztendlich verbundenen Rezidive der Erkrankung regelhaft auf und limitieren somit die Wirksamkeit der Therapie und folglich auch das Überleben der Patienten (*Tulpule & Bivona 2020*).

Insgesamt ist die Frage, warum und wie Tumorzellen im Verlauf einer Therapie eine Resistenz gegenüber dem entsprechenden Arzneimittel entwickeln und insbesondere wie man dies verhindern oder was man diesem Phänomen entgegensetzen kann, nicht abschließend geklärt.

## **1.7 Fragestellung**

In der vorliegenden Arbeit werden die RITA-toleranten H460-Zellen weiter untersucht. Unter der Annahme, dass es sich um einen potenziell reversiblen Toleranzmechanismus und bei den toleranten Zellen um sogenannte DTPs handelt, soll zunächst die Frage beantwortet werden, ob eine Resensitivierung der H460-Zellen gegenüber RITA möglich ist. Hierfür wird die Methode der RNA-Interferenz (RNAi) verwendet. Durch RNAi mit siRNAs (small interfering RNA) oder shRNAs (short hairpin RNA), können einzelne Gene gezielt herunterreguliert und somit „abgeschaltet“ werden; es handelt sich somit um „eine wirkungsvolle Methode zur gezielten Funktionsuntersuchung von Genen“ (*Steinbrink et al. 2007*).

Zur Analyse des Transkriptoms der RITA-toleranten Zellen wird ein Mikroarray zum Vergleich der Genexpression von RITA-toleranten zu RITA-sensiblen Zellen erstellt. So können in den toleranten Zellen verstärkt exprimierte Gene, die möglicherweise eine Rolle für den Toleranzmechanismus spielen, identifiziert werden. Ihre tatsächliche funktionelle Bedeutung kann dann mit Hilfe von RNAi untersucht werden.

Weiterhin sollen Gene der DNA-Schadens-Antwort in Bezug auf die Toleranz überprüft werden. In der Literatur wird die verringerte Radio- und Chemosensitivität von Tumorstammzellen, deren Eigenschaften die toleranten Zellen zum Teil zeigen (s.o.), ursächlich unter anderem im Zusammenhang mit einer verstärkten DNA-Reparatur nach DNA-Schaden gesehen (*Bao et al. 2006*) (*Maugeri-Sacca, Bartucci & De Maria 2012*). Unter der Annahme einer veränderten zellulären Antwort der toleranten Zellen auf den durch RITA verursachten DNA-Schaden (s.o) könnte somit eine Wiederherstellung der Sensitivität gegenüber RITA durch das „Abschalten“ eines dieser (DNA-Schadens-Antwort-) Gene gelingen. Mittels RNAi im Hochdurchsatzverfahren können ausgewählte Gen-Bibliotheken in systematischer Weise hinsichtlich bestimmter funktioneller Eigenschaften von Genen durchsucht werden (*Steinbrink et al. 2007*); im Vorliegenden Fall wurde daher eine Bibliothek von Genen der DNA-Schadens-Antwort ausgewählt, um einen siRNA-Screen durchzuführen.

Ziel dieser Arbeit ist es Gene zu finden, deren „Abschaltung“ (Knockdown) mit Hilfe von RNAi zu einer Resensitivierung der toleranten Zellen gegenüber RITA führt.

Die Erkenntnisse sollen neben der generellen Erforschung von Toleranzmechanismen von Tumorzellen (im speziellen in Bezug auf DTPs und insbesondere auch im Bereich der neuen zielgerichteten Tumorthérapien/p53-Reaktivatoren) auch der Identifikation möglicher Ziele zur Überwindung von Therapietoleranz-/resistenz dienen und können zusätzlich Rückschlüsse auf den grundsätzlichen Wirkungsmechanismus von RITA ermöglichen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verwendete Zelllinien

##### **NCL-H460** (ATCC HTB-177)

etablierte humane Zelllinie, NSCLC – großzelliges Karzinom

Neben den unveränderten Zellen wurden auch aus H460 entwickelte, gegenüber der Behandlung mit dem p53-Reaktivator RITA tolerante Zellklone verwendet - H460<sub>T</sub> (Referenz Michael Wanzel):

- H460<sub>T1</sub> wurde durch eine über Monate kontinuierliche, minimale Steigerung der RITA-Konzentration entwickelt.
- H460<sub>T2</sub> wurde aus dem Pool der Zellen, die eine Behandlung mit RITA überlebten, erzeugt.

##### **HEK293T** (ATCC CRL-11268)

etablierte humane Zelllinie, embryonales Nierengewebe

enthält virale DNA des humanen Adenovirus 5 und exprimiert „SV-40 large T-Antigen“

#### 2.1.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden von Roche (Universal Probe Library) bezogen und in einer 100µM Stocksolution bei -20°C gelagert. Für die qPCR wurden sie verdünnt und in einer Konzentration von 10µM verwendet.

Tabelle 2.1 Oligonukleotide

Name	sense 5' -> 3'	antisense 3' -> 5'
RAD18	ACATGTACAATGCCCAATGC	GCTTCAAGACGCATCCTAGTC
SOX2	ATGGGTTTCGGTGGTCAAGT	GGAGGAAGAGGTAACCACAGG
USP1	GGTTGAACAGCTCCAGGCTA	AGGGTTGAGTTCCTCAGTG
INHBA	CTCGGAGATCATCACGTTTG	CCTTGGAAATCTCGAAGTGC
FST	TCTGCCAGTTCATGGAGGA	TCCTTGCTCAGTTCGGTCTT
28S	TTGAAAATCCGGGGGAGAG	ACATTGTTCCAACATGCCAG



### 2.1.3 siRNAs

Alle verwendeten siRNAs wurden von Dharmacon (ThermoScientific) synthetisiert und bei -20° C gelagert.

#### 2.1.3.1 Kontrollen

Tabelle 2.2 siRNA Kontrollen

Name	Typ	Nummer	Sequenz
nsi - 3	OnTargetPlus	si3	UGGUUUACAUGUUUUCUGA
PLK1 - pool	OnTargetPlus	si9	GCACAUACCGCCUGAGUCU
		si10	CCACCAAGGUUUUCGAUUG
		si11	GCUCUCAAUGACUCAACA
		si12	UCUCAAGGCCUCCUAAUAG
POLD2 - pool	OnTargetPlus	si9	CGUGCUGCCAGGCGAGUUU
		si10	AAGAUGAACUGCAGCGUAU
		si11	GGGUUAUCCUCGUGGCAA
		si12	GGACAGAACGUGAGUGACA

- non targeting siRNA (nsi): nicht spezifisch bindende siRNA (nach *Dharmacon ON-TARGETplus siRNA Reagents*) – Verwendung als Negativ-Kontrolle
- PLK1 (PLK): Polo Like Kinase 1 – kodiert für eine Ser/Thr Protein Kinase mit Funktionen in der M-Phase des Zellzyklus; Inhibition von PLK führt zu einer starken Reduktion der Proliferation von Krebszellen (nach *Database of Human Genes: GeneCards® (GC16P024093)*) – Verwendung als Positiv-Kontrolle
- POLD2 (Pol): DNA-Polymerase Delta 2 - DNA Polymerase, die eine wesentliche Funktion in der DNA-Replikation und -Reparatur hat; Inhibition von POLD2 führt zu einer starken Reduktion der Proliferation von Krebszellen (nach *Database of Human Genes: GeneCards® (GC07M044114)*) – Verwendung als Positiv-Kontrolle

### 2.1.3.2 siRNA-Library

DNA-Damage-Response-Library – siGenome: siRNA Pools (4 siRNAs/Pool)

G-006005-01 - # 407 Gene mit Funktion in der Antwort auf DNA-Schaden

### 2.1.3.3 einzelne siRNAs

Tabelle 2.3 siRNAs Zielgene

Name	Typ	Nummer	Sequenz
RAD18	siGenome	si1	CAUAAUAGAUGAACUGGUA
		si2	GCAGGUUAAUGGAUAAUUU
		si3	GAUAAUAUGACCUCAGUAA
		si4	GCAGUUUGCUUUAGAGUCA
SOX2	siGenome	si1	ACAACAUGAUGGAGACGGA
		si2	GCUCGCAGACCUACAUGAA
		si3	UCAUGAAGAAGGAUAAGUA
		si4	GCUCUUGGCUCCAUGGGUU
INHBA	OnTargetPlus	si1	GAACGGGUAUGUGGAGAU
		si2	GAGUGUGGGUGCUCAUAGA
		si3	GGAUUUCUGUUGGCAAGUU
		si4	GGAGUGAACUGUUGCUCUC
FST	OnTargetPlus	si5	GGACUACAGCUUCCUAUA
		si6	GUAAAGAAACGUGUGAGAA
		si3	GGUAAACUCUCUAUAAGUG
		si4	UGUGUGACCUGUAAUCGGA

### 2.1.4 Vektoren

Transfer Vektor - Lentiviraler Vektor mit shRNA:

pGIPZ: Das pGIPZ Plasmid enthält neben der shRNA unter anderem eine Puromycin-Resistenz als Selektionsmarker

2nd Generation Packaging System (Addgene – Referenz: *Didier Trono Lab Plasmids*)

pSPAX: „Packaging Plasmid“

pMD2g: VSV-G „Envelope expressing Plasmid“

Tabelle 2.4 shRNAs

Name		Sequenz
Control	shcon	mock
RAD18	sh1	TGCTGTTGACAGTGAGCGAG <b>AGCTCACATGGATATATTT</b> ATAGTGA AGCCACAGATGTAT <b>AAATATATCCATGTGAGCT</b> CCTGCCTACTGCCT CGGA
	sh2	TGCTGTTGACAGTGAGCGAA <b>GCCTGCTGCAAAGACCAA</b> ATAGTGA AGCCACAGATGTAT <b>TTGGTCTTTGCAGCAGGGCT</b> CCTGCCTACTGCCT CGGA
	sh3	TGCTGTTGACAGTGAGCGAG <b>GAGCAGGTTAATGGATAATTT</b> AGTG AAGCCACAGATGTAA <b>ATTATCCATTAACCTGCTC</b> CCTGCCTACTGCC TCGGA
	sh4	TGCTGTTGACAGTGAGCGC <b>TTGGTGGATCAGGCTAGAAA</b> ATAGTG AAGCCACAGATGTAT <b>TTTCTAGCCTGATCCACCA</b> GATGCCTACTGCC TCGGA
	sh5	TGCTGTTGACAGTGAGCGCA <b>ACGATCTTCAAGACACAGA</b> ATAGTGA AGCCACAGATGTAT <b>TCTGTGTCTTGAAGATCGT</b> TTTGCCTACTGCCT CGGA

### 2.1.5 Kommerzielle Kits und Fertigreagenzien

CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit	LifeTechnologies
Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent	LifeTechnologies
RNAqueous®-Micro Total RNA Isolation Kit	Ambion
Agilent Low RNA Input Linear Amplification Kit PLUS	Agilent
Gene Expression Hybridization Kit	Agilent
Gene Expression Wash Buffer Kit	Agilent
SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™	Sigma-Aldrich
VisiBlue™ qPCR mix colorant	TataaBiocenter
RITA (NSC-652287)	Merck-Millipore

### 2.1.6 Medien, Lösungen und Puffer

Für alle Lösungen und Verdünnungen wurde Wasser nach Aufbereitung durch die Purelab ultra ELGA Wasseraufbereitungsanlage der Firma LabWater verwendet.

#### Medien und Seren

RPMI Media 1640 Gibco® GlutaMAX™ LifeTechnologies

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium GIBCO LifeTechnologies  
(high glucose (4.5 g/l), with L-glutamine and sodium pyruvate)

Opti-MEM® I Reduced Serum Media LifeTechnologies

FBS – Fetal Bovine Serum Sigma-Aldrich

#### Lösungen und Puffer

PBS GIBCO® Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline LifeTechnologies

10x Trypsin-EDTA-Lösung Sigma-Aldrich  
zur Verwendung: 1:5 Verdünnung mit PBS

Polybren-Lösung 8 µg/ml Sigma-Aldrich

Giemsa-Stammlösung Carl Roth

DMSO - Dimethylsulfoxid

HBS-Puffer - (128 mM NaCl, 6mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 5,5 mM Glukose, 10 mM HEPES,  
1mM CaCl<sub>2</sub> 0.2% BSA)

Calciumchlorid-Lösung - (2.5 M CaCl<sub>2</sub>)

70% Ethanol

### 2.1.7 Antibiotika

PenStrep: 100 Einheiten/ml Penicillin - 100 µg/ml Streptomycin LifeTechnologies

Puromycin 2 µg/ml Sigma-Aldrich

### **2.1.8 RITA**

2,5-bis([5-hydroxymethyl-2-thienyl]furan) - NSC-652287

Merck-Milipore

### **2.1.9 Verbrauchsmaterialien**

Für die Zellkultur wurden Kulturschalen und Multiwell-Kulturplatten der Firma Sarstedt verwendet. Reagenzröhrchen verschiedener Größe wurden von Greiner Bio-One bezogen sowie 1,5 ml Reagenzgefäße von der Firma Sarstedt. Zur Lagerung eingefrorener Zellen in Flüssigstickstoff wurden Cryotubes (Cryo.S.) von Greiner Bio-One verwendet.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kulturtechniken

#### 2.2.1.1 Medien

Als Standard-Medium für die Kultivierung der H460-Zellen wurde verwendet:

RPMI Medium

+ 10% FBS

+ 1% Penicillin/Streptomycin

Als Standard-Medium für die Kultivierung der HEK-293T-Zellen wurde verwendet:

DMEM Medium

+ 10% FBS

+ 1% Penicillin/Streptomycin

als Selektionsmedium für die pGIPZ infizierten Zellen wurde verwendet:

RPMI Medium

+ 10% FCS

+ 1% Penicillin/Streptomycin

+ 1 % Puromycin

Gefriermedium:

RPMI Medium

+ 25% FBS

+ 10% DMSO

#### 2.2.1.2 Zellkulturpflege

##### Kultivierung

Die Arbeiten mit lebenden Zellen wurden in einem speziellen Raum für die Zellkultur mit autoklavierten Einwegmaterialien unter sterilen Bedingungen an einer

Sicherheitswerkbank (MSC Advance ThermoScientific) durchgeführt. Kontaminiertes Abfallmaterial wurde separat gesammelt und vor der Entsorgung autoklaviert.

Die verwendeten adhären Zellen wurden in beschichteten Zellkulturschalen in einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37°C (HVA Cell 240 Inkubator - ThermoScientific) kultiviert. Die Zellen wurden passagiert bevor sie vollständige Konfluenz erreichten. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit vorgewärmtem PBS gewaschen. Zum Ablösen wurden die Zellen für wenige Minuten mit Trypsin-Lösung inkubiert und danach mit frischem Medium resuspendiert und so vereinzelt. Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen der Suspension in einer Neubauer-Zählkammer (Neubauer improved - Marienfeld) gezählt. Die gewünschte Zellzahl wurde dann mit frischem, vorgewärmtem Medium in einer neuen Kulturschale ausgesät.

#### Einfrieren und Auftauen

Zum Einfrieren wurden die Zellen einer annähernd konfluenten Kulturschale wie oben beschrieben abgelöst und danach bei 1200rpm für 5min abzentrifugiert um anschließend das Medium abzusaugen. Das Zellpellet wurde danach mit 500-700µl Gefriermedium resuspendiert und in ein Cryotube pipettiert. Die Tubes wurden bei -80°C in einem mit Isopropanol gefülltem Behältnis (Mr. Frosty - Nalgene) langsam und gleichmäßig tiefgefroren und nach drei Tagen in Flüssigstickstoff überführt.

Eingefrorene Zellen wurden zunächst im Cryotube im 37°C Wasserbad aufgewärmt und dann mit 9ml Medium resuspendiert. Danach wurden die Zellen bei 1200rpm für 5min abzentrifugiert und der Medium-Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde erneut mit vorgewärmtem Medium resuspendiert und die Zellsuspension auf einer Zellkulturschale ausgesät.

#### 2.2.1.3 RITA-Behandlung

RITA wurde in DMSO gelöst und in 200µl Aliquots mit einer Konzentration von 1mM bei -4°C gelagert. Zur Behandlung der Zellen wurde das Medium bei Aussaat

generell mit in einer Konzentration von 1 $\mu$ M RITA versetzt (falls nicht anders gekennzeichnet).

### 2.2.2 RNA-Interferenz (RNAi)

RNAi ist ein in allen Lebewesen natürlich vorkommender, weitverbreiteter Mechanismus der Gen-Inaktivierung. Lange dsRNA oder shRNA Moleküle werden mit Hilfe des Enzyms Dicer in kleine circa 20 bis 25 Nukleotidpaare lange Bruchstücke zerschnitten. Diese werden vom sogenannten RISC-Komplex (RNA-induced silencing complex – RNA-induzierter Stilllegungskomplex) gebunden und mit Hilfe einer im Komplex integrierten Helikase entwunden. Der RISC-Komplex kann nun komplementäre messenger-RNA (mRNA) aufspüren. Nach der Basenpaarung wird die mRNA durch ein Protein des RISC-Komplexes namens Argonaut am Poly-A-Schwanz gespalten und freigesetzt. Die mRNA wird nun rasch durch Exonukleasen zerstört. Die siRNA verbleibt im RISC-Komplex. So können mit einer einzelnen siRNA sehr viel mehr komplementäre mRNAs abgebaut werden (*Filipowicz 2005*) (*McManus & Sharp 2002*).

#### 2.2.2.1 RNAi durch siRNA

Das Einbringen von den, auch natürlicherweise vorkommenden, siRNAs in Zellen stellt eine relativ einfache Methode dar, um für Experimente eine transiente Hemmung der Expression spezifischer Gene zu erreichen (*Cseke - Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine – Third Edition*).

#### Transfektion

Die Transfektion der siRNAs wurde mit Lipofectamine® RNAiMAX als reverse Transfektion gemäß des Herstellerprotokolls durchgeführt. Dabei werden die siRNAs mit Hilfe von kationischen Lipiden als Träger der RNA-Moleküle in die Zelle eingebracht. Reverse Transfektion meint, dass die Zellen während des Ausplattierens mit siRNA transfiziert werden; im Vergleich zur Transfektion an Tag 1 des Experiments („forward Transfection“).



Opti-MEM® wurde mit der entsprechenden Menge an siRNA versetzt. Lipofectamine® RNAiMAX wurde hinzugegeben und durch behutsames Auf- und Abpipettieren vermischt. Der Transfektionsmix wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die zu transfizierenden Zellen wurden wie beschrieben (2.2.1.2) in Medium gelöst. Die Suspension wurde zum Transfektionsmix hinzugegeben und beides durch behutsames Auf- und Abpipettieren miteinander vermischt.

Die Volumenadjustierungen der verschiedenen Kulturformate waren wie folgt:

96 Well-Format	2.5µl siRNA [1µM]
(c: si-RNA 25nm)	+17.4µl OptiMEM
	+ 0.1µl RNAiMAX
	+80µl Zellsuspension (5000 Zellen/Well)

6 Well-Format	2.5µl siRNA [20µM]
(c: siRNA 20nm)	+500µM OptiMEM
+ 5µl RNAiMAX	
	+2ml Zellsuspension (100 000 Zellen/ml)

6cm Schale	5µl siRNA [20µM]
(c: siRNA 20nm)	+1ml OptiMEM
	+10µl RNAiMAX
	+4ml Zellsuspension (100 000 Zellen/ml)

Die transfizierten Zellen wurden daraufhin wie gewöhnlich inkubiert und nach drei Tagen per Celltiter Glow Assay oder PCR analysiert bzw. nach 10 Tagen für den Koloniebildungstest gefärbt.

## Kontrollen

Als Negativ-Kontrolle wird eine siRNAs ohne spezifisches Muster/Ziel („non-targeting siRNA“ – nsi #3 (OnTargetPlus)) verwendet, sodass hier kein Gen-Knockdown stattfindet und diese Kontrolle daher die Ausgangsbasis für den Effekt der zielgerichteten siRNAs darstellt.

Als Positiv-Kontrolle werden siRNAs gegen ein Zielgen verwendet, dessen Knockdown bekanntermaßen einen deutlichen letalen Effekt in den verwendeten Zelllinien zeigt (*Filipowicz 2005*). Die verwendeten Zielgene PLK und POLD2 sind entsprechend essenziell für das Zellüberleben (siehe oben).

## siRNA Screen – RNA-Interferenz im Hochdurchsatzverfahren

Die Transfektion der Dharmacon DNA-Damage-Response-Library wurde mit Hilfe eines Pipettier-Roboters (Hamilton StarLet) im 96-Well Plattenformat in mehreren Replikaten durchgeführt.

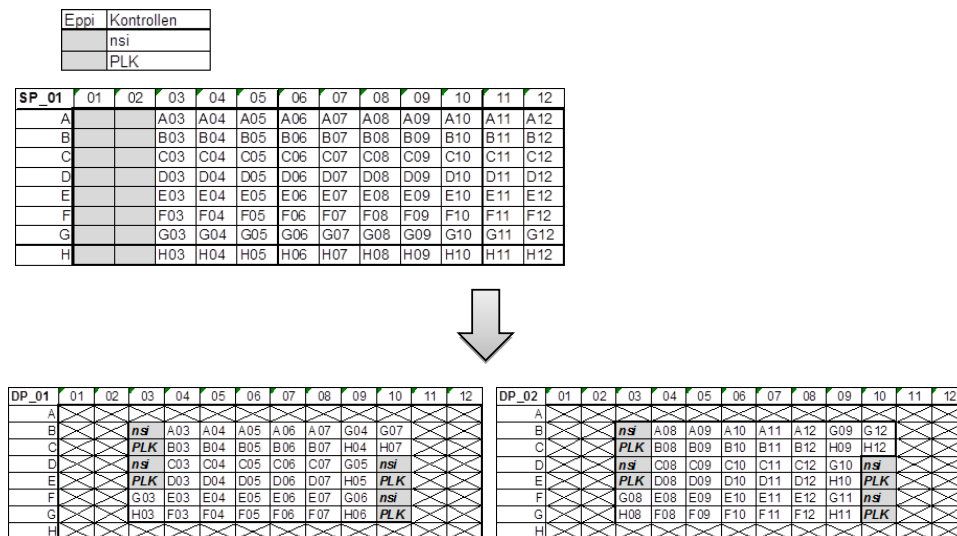


Abbildung 2.1 Verteilung der Proben im Rahmen des siRNA Screen

Hamilton StarLet-Pipettier-Roboter; 96-Well Plattenformat

nsi=ungerichtete siRNA=Negativ-Kontrolle; PLK= siRNA gegen PLK-Gen=Positiv-Kontrolle

Der Roboter verteilte die siRNAs der Bibliothek („Source Plate“) sowie die Kontroll-siRNAs zusammen mit den anderen Reagenzien und der vorbereiteten Zellsuspension nach vorgegebenem Schema (s. Transfektion) auf zwei „Destination

Plates“ (Abbildung 2.1). Die Platten wurden drei Tage wie gewöhnlich inkubiert und das Zellüberleben per Celltiter Glow Assay gemessen.

Zur Beurteilung der Qualität wurde der Z'-Faktor der einzelnen Platten bestimmt:

$$Z' = 1 - 3 \times [(\sigma_p + \sigma_n) / |(\mu_p - \mu_n)|]$$

( $\sigma_p$  und  $\sigma_n$  = Standardabweichungen der Positiv- bzw. Negativkontrolle)

( $\mu_p$  und  $\mu_n$  = Mittelwerte der Positiv- bzw. Negativkontrolle)

Dabei gilt ein Z'-Faktor > 0.5 als optimal, 0 – 0.5 als akzeptabel und < 0 als ungenügend (*Birmingham et al. 2009*).

Die Auswertung des Screens erfolgte mit Hilfe des Bioinformatikers der Arbeitsgruppe (Lukas Rycak) mittels der RNAi-ther Software (*Rieber et al. 2009*), einem Programm für die statistische Analyse von RNA-Interferenz im Hochdurchsatzverfahren. Dabei wurde die Signalintensität pro Well auf die gemittelte Signalintensität der non-targeting siRNA Kontrolle (nsi) einer Platte normalisiert und die einzelnen Replikate zusammengefasst. Diese Werte wurden dann z-transformiert:

$$z = (x - \mu) / \sigma$$

( $x$  = Signalintensität;  $\mu$  = mittlere Signalintensität;  $\sigma$  = Standardabweichung)

Die RNAi-ther Software erstellt hierbei den „robust z-score“, der den Median und Median der absoluten Standardabweichung in der Kalkulation verwendet (im Gegensatz zum einfachen Mittelwert) (*Rieber et al. 2009*). Es entsteht eine dimensionslose Verteilung der Werte um den Wert 0 mit einer Varianz und Standardabweichung von 1. Negative bzw. positive Werte stellen ein schwaches bzw. starkes Signal (hier: wenig oder viel Überleben) dar (*Birmingham et al. 2009*). Um eine Hitliste potenzieller Gene zur weiteren Validierung zu erstellen, wurde ein Cut-off bei einem Median der absoluten Standardabweichung des Medians gewählt.

#### 2.2.2.2 RNAi shRNA

Mit Hilfe von viralen Vektoren eingebrachte shRNAs werden von Zellen dauerhaft transkribiert, im Gegensatz zur einfachen siRNA Transfektion, die nur transient ist. So kann eine stabile Gen-Inhibition erzeugt werden (*Cseke - Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine – Third Edition*). Für die Versuche wurde ein lentivirales System verwendet. Lentiviren zeigen eine effektive Transfektion von proliferierenden und nicht-proliferierenden Zellen und erzeugen eine stabile Gen-Transduktion und so einen stabilen Knockdown.

#### Transfektion und Virusernte

Zur Transfektion wurde der folgende Transfektions-Mix hergestellt:

pGIPZ (sh1-5 und shcon)	20µg
pSPAX	13µg
pMD2g	07µg
DNA insg.	40µg

Die DNA wurde mit 150µl 2.5M CaCl<sub>2</sub> versetzt und ad 1500µl mit Wasser aufgefüllt. Dieser Mix wurde langsam unter kontinuierlichem Vortexen zu 2x HBS getropft. 24 Stunden vor Transfektion wurden 5 000 000 HEK-Zellen auf einer 10cm Platte ausgesät. Vier Stunden nach Mediumwechsel wurde der endgültige Mix unter behutsamem Schütteln dazugegeben. Nach 24 Stunden wurde das Medium erneut gewechselt. 48 und 72 Stunden nach Transfektion wurde das Virus abgeerntet, indem der das Virus enthaltende Überstand abpipettiert und durch einen 0.45µM Filter (Filtopar S0.45 von Sarstedt) filtriert wurde.

#### Infektion

Für die Virusinfektion wurden 750 000 Zellen auf einer 10cm Kulturplatte ausgesät und 24 Stunden später infiziert:

- 3ml Virus-Suspension (Herstellung s. oben)
- + 2ml Standard-DMEM-Medium
- + 5µl Polybren

Nach 24 Stunden wurde zunächst das Medium gewechselt, nach 48 Stunden dann das Standard-Medium gegen das Puromycin enthaltende Selektions-Medium getauscht und die Zellen ab sofort mit diesem Medium kultiviert.

### **2.2.3 Methoden zur Analyse des Zellüberlebens**

#### 2.2.3.1 CellTiter- Glo-Assay

Zur Bestimmung der relativen Menge an überlebenden Zellen wurde der CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega) eingesetzt. Das Zellüberleben wird durch Quantifizierung des vorhandenen ATPs, welches proportional zur Anzahl der lebenden Zellen ist, gemessen. Katalysiert durch das Enzym Luciferase reagiert Luciferin zusammen mit ATP zu Oxyluciferin und AMP, was ein Lumineszenz-Signal erzeugt.

Generell wurde die Messung (sofern nicht anders gekennzeichnet) 3 Tage nach Behandlung der Zellen durchgeführt. Das CellTiter-Glo® Reagenz wurde bei -20°C gelagert und für die Messung im Dunklen bis zum Erreichen der Raumtemperatur aufgetaut. Auch die zu messenden Proben wurden vor der Messung an die Raumtemperatur equilibriert.

Die Menge an CellTiter-Reagenz, die zu den bereits ausgesäten Zellen pipettiert wurde, entsprach der Menge an Medium, die sich bereits in dem betreffenden Well befand. Nach Hinzugabe des Reagenz wurden die Proben lichtundurchlässig verpackt, für 10 Minuten bei Raumtemperatur behutsam geschüttelt und weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Lumineszenz der Proben mit dem Luminometer (ORION II, Titertek-Berthold) in RLU/sec gemessen.

#### 2.2.3.2 Colony Formation Assay (Koloniebildungstest)

Beim Colony Formation Assay handelt es sich um eine Methode, mit der das in-vitro-Zellüberleben dargestellt werden kann. Es wird untersucht ob die Zellen unter bestimmten Bedingungen noch in der Lage sind, sich ohne Limit zu teilen und Kolonien zu formen oder ob alle oder ein Teil der Zellen die Möglichkeit zur Teilung

verloren haben. Daher kann der Colony Formation Assay unter anderem dazu verwendet werden, die Effektivität zytotoxischer Reagenzien zu bestimmen (Franken 2006). Die jeweiligen Zellen wurden auf 6 cm Platten ausgesät, je nach Experiment behandelt und für 10 Tage kultiviert.

Danach wurden sie nach Giemsa gefärbt:

- zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS
- Fixierung mit 70% Ethanol, Ethanol abschütten und 30min bei Raumtemperatur trocknen lassen
- Färbung 30 min mit 4 ml Giemsa-Stammlösung 1:20 mit H<sub>2</sub>O verdünnt
- Färbung abschütten und die Platte einmal durch Wasser ziehen
- Lufttrocknen bei Raumtemperatur

## **2.2.4 RNA-basierte Methoden**

### 2.2.4.1 RNA-Purifikation

#### Durchführung

Die RNA von Zellproben wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) anlehnend an das Protokoll des Herstellers wie im Folgenden dargestellt isoliert:

- Die circa 90% konfluenten Zellen wurden auf Eis mit kaltem PBS gewaschen und dann direkt in 1ml kaltes PBS von der Platte geschabt und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß transferiert.
- Zentrifugation 5min bei 3000rpm, Überstand absaugen
- das Zellpellet wurde mit 600µl RLT-Puffer + Mercaptoethanol (1ml RLT + 10µl Mercaptoethanol) homogenisiert
- 600µl 70% Ethanol wurden hinzugefügt
- 2x jeweils 600µl auf eine Minisäule geladen und 1min bei 13 000rpm zentrifugiert
- die Säule wurde mit 350µl RW1-Puffer gewaschen (1min 13 000rpm)

- DNase-Behandlung: 10µl DNase Stocksolution (RNase-free DNase Set - Quiagen) + 70µl RDD Puffer wurde auf eine Säule geladen und 15 min bei 30° im Wasserbad inkubiert
- die Reaktion wurde mit 350µl RW1 Puffer (1min 13 000rpm) gestoppt
- die Säulen wurden 2x mit 500µl RPE-Puffer gewaschen (1min 13 000rpm und 3min 13 000rpm)
- Elution mit 60µl RNase freiem Wasser (1min 13 000rpm nach 5min Inkubation bei Raumtemperatur)

#### Qualitätsbestimmung

Die Konzentration sowie die Qualität der RNA wurde per Spektralphotometer-Messung (NanoDrop™ Spektralphotometer) bestimmt.

Das Absorptionsmaximum von RNA liegt bei 260 nm. Die Reinheit der Probe wurde durch die 260/280 Ratio überprüft. Für RNA gilt: Eine Ratio von circa 2.0 kann generell als rein angesehen werden. Liegt die Ratio unter 1.8 liegt möglicherweise eine Kontamination mit Phenolen oder Proteinen vor, was einen Einfluss auf die Stabilität der RNA haben kann. Eine Ratio von unter 1.5 kann nicht auf die Messung von RNA zurückgeführt werden und zeigt möglicherweise die Absorption von Proteinen oder anderen Zellprodukten an (*Cseke - Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine – Third Edition*).

Es wurden nur RNA-Proben mit einer Ratio um 1.9 bis 2.1 weiterverwendet. Die Proben wurden entweder sofort verwendet oder bei -80°C gelagert.

#### 2.2.4.2 cDNA-Synthese

Das generelle Prinzip der cDNA-Synthese ist, dass mRNA mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase und einem Oligo-dT-Nukleotid-Primer kopiert wird. Daraus ergibt sich ein komplementärer DNA-Strang, welcher dann *complementary DNA* (cDNA) genannt wird (*Cseke - Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine – Third Edition*).

Die cDNA-Synthese wurde mit dem SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit (LifeTechnologies) gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

7µl RNase freies Wasser mit 500ng RNA

+2µl 5x VILO Reaction Mix

+1µl Superscript Enzym Mix

wurden vermischt und für 25min bei 10°C, 60min bei 42°C und 5min bei 85°C inkubiert.

Die cDNA wurde dann von 10µl auf 50µl mit DNase freiem Wasser verdünnt und entweder sofort verwendet oder bei -20°C gelagert.

#### 2.2.4.3 Quantitative real time PCR

Die Quantitative real time PCR (qRT-PCR) ist eine Labortechnik, die basierend auf der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) DNA- oder RNA-Moleküle amplifiziert und gleichzeitig quantifiziert. In dieser Arbeit wurde die qRT-PCR zur Quantifizierung von RNA verwendet. In diesem Fall wird die qRT-PCR mit der vorherigen reversen Transkription von RNA zu cDNA verbunden. Durch die Kopplung von Fluorophoren an die DNA während der laufenden PCR kann die Amplifikation der Probe in Echtzeit gemessen werden.

Die qRT-PCR kann in eine exponentielle und eine Plateau-Phase der Amplifikation eingeteilt werden. Theoretisch besteht zwischen der Anfangsmenge an DNA und der Menge des PCR-Produkts zu jedem Zeitpunkt ein Zusammenhang. Da in der exponentiellen Phase aber die verlässlichsten Daten akquiriert werden können, werden die Messungen in diesem Zeitfenster durchgeführt (*Cseke - Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine – Third Edition*).

#### Durchführung

Die qRT-PCR wurde im 384-Well-Format in drei Replikaten für jedes Ziel-Gen durchgeführt. Als Fluoreszenz-Farbstoff wurde SYBR Green I verwendet. Der Mastermix wurde wie folgt hergestellt:



SYBR Green Jumpstart Taq Readymix	25 $\mu$ l
Oligos	+0,5 $\mu$ l
VisiBlue	+0,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ l

Zu den 9  $\mu$ l des Mastermixes wurde 1  $\mu$ l cDNA (totales Volumen von 10  $\mu$ l/Well) pipettiert und die Proben für 1min bei 1000rpm zentrifugiert.

Zur Durchführung der qRT-PCR wurde das LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche) verwendet. Mit Hilfe der spezifischen Primer wurde die zuvor mit Hilfe der reversen Transkriptase hergestellte cDNA amplifiziert und die neu-synthetisierte DNA durch das Fluoreszenzsignal des mit der DNA interkalierenden SYBR Greens detektiert und die Intensität des Signals gemessen.

Das folgende Cycling-Protokoll wurde verwendet:

Denaturierung: 94°C 2 min	} x 40 Zyklen
Denaturierung: 94°C 20 sec	
Annealing: 60°C 20 sec	
Elongation: 72°C 20 sec	

### Auswertung

Zur Qualitätskontrolle wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Somit konnte die Spezifität der Amplifikation beurteilt sowie die Kongruenz der Schmelzkurven innerhalb der Triplets verglichen werden. Zur Auswertung erfolgte eine relative Quantifizierung nach der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode (*Holzapfel & Wickert 2007; Pfaff 2004*): Als Ct-Wert wird der Amplifikationszyklus bezeichnet, bei dem die Fluoreszenz signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt (festgelegter Schwellenwert). Hierbei besteht eine umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der vorhandenen cDNA Menge und dem Ct. Zunächst wurde der Mittelwert der Triplets ermittelt. Danach wurde von dem gemittelten Ct-Wert der Proben der gemittelte Ct-Wert eines internen Referenzgens („Housekeeping Gene“) abgezogen ( $\Delta$ Ct). Als Referenzgen wurde in diesem Fall 28S-rRNA verwendet.

Anschließend wurde der  $\Delta\text{Ct}$ -Wert der Kontroll-Probe von dem  $\Delta\text{Ct}$ -Wert der behandelten Proben abgezogen ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ ). Um den Wert der n-fachen Expression von behandelten zu Kontrollproben zu erhalten wird  $\text{Ratio}=2^{-\Delta\Delta\text{CP}}$  gebildet:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

( $\Delta\text{CP}=\text{CP Zielgen}-\text{CP Referenzgen}$ ;  $\Delta\Delta\text{CP}=\Delta\text{CP Behandlung}-\Delta\text{CP Kontrolle}$ )

### 2.2.5 Microarray-Analyse

Um eine genomweite Gen-Expressions-Analyse auf mRNA-Ebene durchzuführen wurde ein Microarray (DNA-Chip) durchgeführt. Mit dieser Hochdurchsatz-Untersuchung ist es möglich eine Art Schnappschuss der Gen-Expression einer Zellprobe zu erstellen und mit einer anderen Probe zu vergleichen. Tausende von Gensonden werden auf einen soliden Träger aufgebracht und dann mit zwei oder mehr fluoreszenzmarkierten RNA-Proben hybridisiert. Entsprechend der unterschiedlichen Genexpression entsteht ein Farbmuster, das gemessen und analysiert werden kann (*Franken et al. 2006*). Für den Microarray wurde das Agilent Oligonukleotide Microarray System (Agilent Technologies) verwendet. Der Array wird von Agilent mit Hilfe der SurePrint Technology hergestellt. Dabei werden 60mer lange Oligonukleotid-Proben Base für Base per Inkjet-Technologie auf den Glasträger aufgetragen und so der DNA-Chip, der die Basis des Microarrays bildet, hergestellt (Human GE 4x44K v2 Microarray - Agilent p/n G2519F-026652).

#### Durchführung

Die Durchführung des Microarrays erfolgte anhand des „Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis - Low Input Quick Amp Labeling“ Protokolls (*Labeling Protocol Version 6.7 Agilent*). Es handelt sich hierbei um ein „Two-Color“-Design des Microarrays. Dabei werden zwei unterschiedliche Proben mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt und dann im Hybridisierungsschritt auf demselben Array vermischt. Der Glasträger wird dann mit zwei verschiedenen, den Fluoreszenzfarbstoffen entsprechenden Wellenlängen gescannt und die Signalintensität beider Farbkanäle am selben Spot miteinander verglichen.

Man erhält für jeden Spot des Arrays eine Ratio, die das mRNA-Transkriptionslevel des jeweiligen Gens repräsentiert. Der Microarray wurde als Referenzdesign durchgeführt. Dabei wird jeweils eine Mischreferenz mit den verschiedenen zu testenden Proben verglichen. Dies ermöglicht den Vergleich mehrerer Proben miteinander. Als Farbstoffe wurden Cyanine-3 (Cy3) und Cyanine-5(Cy5) verwendet. Als erstes wurde RNA aus den Zellproben isoliert. Die Reinheit der RNA ist insbesondere bei der Benutzung von Fluoreszenz-Farbstoff von besonderer Bedeutung (*Duggan 1999*) und sie wurde daher vor Beginn des Experimentes mit Hilfe des Experion™ Automated Electrophoresis System (BioRad) bestimmt. Mit Hilfe der im Agilent Low RNA Input Linear Amplification Kit enthaltenen reversen Transkriptase wurden 200 ng der RNA zunächst in cDNA umgeschrieben. Im nächsten Schritt erfolgte die Amplifikation und Synthese von cRNA. Während dieser Amplifikation durch die T7 RNA Polymerase erfolgte die Markierung mit Cy3-CTP oder Cy5-CTP. Dabei wurde Cy3 für die Referenzprobe verwendet. Bei dieser Referenzprobe handelte es sich um eine „gepoolte Mischreferenz“, einer Mischung aller verwendeten Proben. Mit Cy5 wurden die einzelnen Proben markiert. Die markierte und amplifizierte cRNA wurde dann mit dem RNAqueous-Micro Total RNA Isolation Kit aufgereinigt und am Photometer (NanoDrop™ Spektralphotometer) quantifiziert. Dabei wurde auch die Reinheit der Probe durch die 260/280 Ratio überprüft. Danach erfolgte die Hybridisierung (Gene Expression Hybridization Kit). 825 ng der Cy5 markierten Probe wurden mit derselben Menge der Cy3 markierten Mischreferenz kombiniert und über Nacht (17h 65°C) mit dem 4x44K-Chip in der Hybridisierungs-Kammer (Agilent p/n G2534A) hybridisiert. Nach Ablauf der Hybridisierungszeit wurde der Chip gewaschen (Gene Expression Wash Buffer Kit) und dann mit dem Agilent Microarray Scanner (Agilent p/n G2565CA) ausgelesen. Die entstandenen Bilder wurden mit der Feature Extraction Software von Agilent (G4460AA) prozessiert und analysiert.

## Analyse

Um die differentielle Expression der zu analysierenden Proben im Vergleich zur Mischreferenz darzustellen wird die Log-Ratio, der Logarithmus des Quotienten der gemessenen Signalintensitäten, verwendet. Dieser wird auch als M-Wert bezeichnet:

$$M = \log_2 (Cy5/Cy3) = \log_2 (Cy5) - \log_2 (Cy3)$$

Weiterhin kann der A-Wert, die mittlere logarithmische Signalintensitäten an einem Spot, ermittelt werden:

$$A = \frac{1}{2} \times \log_2 (Cy5 \times Cy3) = \frac{1}{2} \times (\log_2 Cy5 + \log_2 Cy3)$$

Die gemessenen Signalintensitäten wurden nach der LOESS Methode (LOESS-Regression) nach Yang et al (2001) normalisiert. Dies sollte routinemäßig in cDNA Microarrays durchgeführt werden um systematische, signalintensitätsabhängige Effekte zu korrigieren (*Smyth & Speed 2003.*)

Um die n-fache Expression einer Probe im Vergleich mit anderen darzustellen, wurde der logarithmische Foldchange ( $\log_2FC$  – zweiter Logarithmus der Expressionsveränderung) berechnet:

$$\log_2FC = \log_2 (Expr.1) - \log_2 (Expr.2) = M (Probe 1) - M (Probe 2)$$

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Bestätigung der RITA-Toleranz der verwendeten Zellklone

Zu Beginn der Experimente wurde die Reaktion der verwendeten toleranten H460-Zellklone auf eine Behandlung mit RITA überprüft.

Nach einer Behandlung mit RITA-Konzentrationen zwischen 0,125  $\mu\text{M}$  und 2  $\mu\text{M}$  wurde das Zellüberleben der H460- und H460<sub>T</sub>-Zellen mit Hilfe des CellTiter-Glo-Assays quantifiziert. Die Abbildung 3.1 zeigt ein signifikant vermindertes relatives Überleben der parentalen H460-Zellen nach RITA-Behandlung. Die toleranten H460<sub>T</sub>-Zellen zeigen im Gegensatz dazu ein kaum reduziertes relatives Überleben, entsprechend der beschriebenen Toleranz.

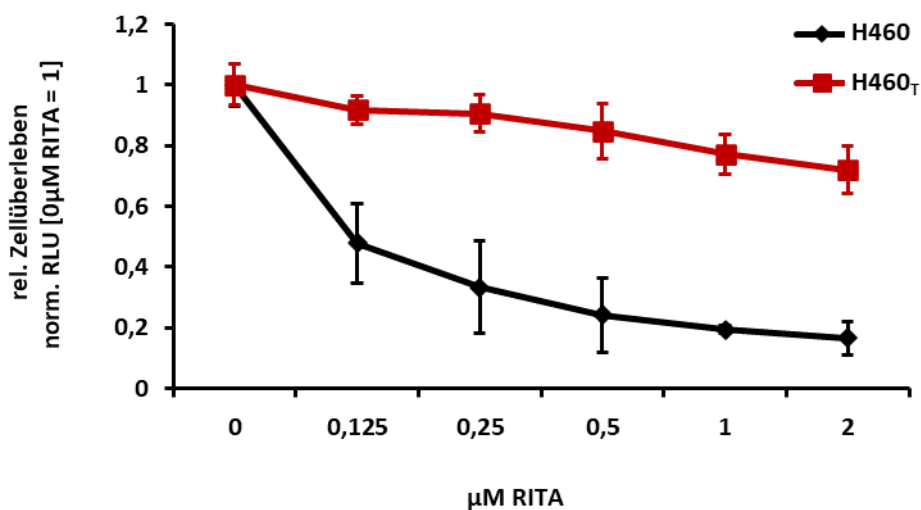


Abbildung 3.1 Nachweis der RITA-Toleranz der H460<sub>T</sub>-Zellen

Behandlung von parentalen H460- und toleranten H460<sub>T</sub>-Zellen mit ansteigenden RITA-Konzentrationen und Messung des Zellüberlebens nach drei Tagen im CellTiter-Glo-Assay in RLU normalisiert [RITA 0 $\mu\text{M}$  = 1]; p-Wert bei 1  $\mu\text{M}$  RITA: 0,001 [ $\alpha=0,005$ ]. Signifikant vermehrtes relatives Überleben der H460<sub>T</sub>- gegenüber der H460-Zellen nach RITA-Behandlung.

## 3.2 Microarray

### 3.2.1 Microarray Analyse – H460 und H460<sub>T</sub> im Vergleich: Die Gene SOX2, INHBA und FST zeigen eine vermehrte Expression in H460<sub>T</sub> im Vergleich zu H460

Mit Hilfe eines DNA-Chips bzw. Microarrays lässt sich das gesamte Transkriptom eines Zelltypes mit relativ wenig Zeitaufwand untersuchen. Um herauszufinden, welche Gene in den toleranten Zellen im Vergleich mit den parentalen Zellen heraufreguliert sind, wurden für den Microarray jeweils zwei Proben der parentalen H460-Zellen und der RITA-toleranten H460-Zellen (H460<sub>T1</sub> und H460<sub>T2</sub>) verwendet und nach der Normalisierung mittels LOESS Methode zusammengefasst. Danach wurde die Expressionsveränderung H460 versus H460<sub>T</sub> mittels log<sub>2</sub>FC dargestellt (vgl. Kapitel 2.2.5) (Abbildung 3.2):

$$\log_2FC = \frac{1}{2} \times (M(H460_{T1}) + M(H460_{T2})) - \frac{1}{2} \times (M(H460\_1) + M(H460\_2))$$

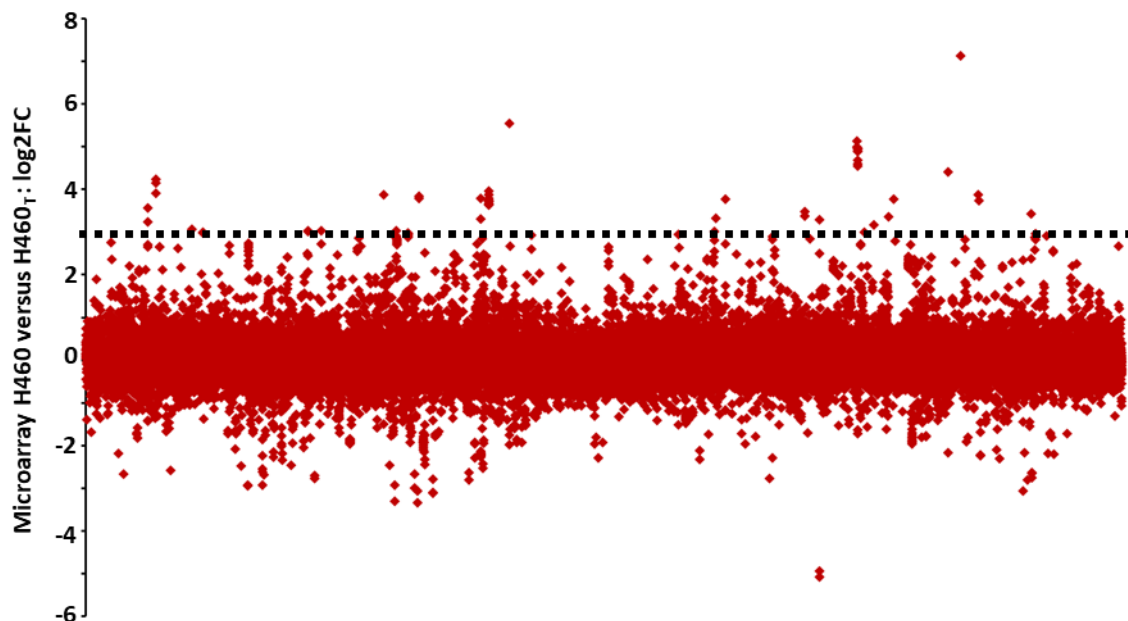


Abbildung 3.2 Vergleich der Genexpression H460<sub>T</sub>- und H460-Zellen im Microarray mittels log<sub>2</sub>FC

Die roten Punkte entsprechen dem zweiten Logarithmus der Expressionsveränderung der im Microarray gemessenen Gene: log<sub>2</sub>FC Wert = H460<sub>T</sub> 2<sup>n</sup>-fach exprimiert im Vergleich zu H460

Positiver Wert = vermehrt exprimiert; Negativer Wert = vermindert exprimiert

Schwarze Linie = für die „Hitliste“ gewählter Cut-off von + 3

Mit Hilfe des log<sub>2</sub>FC-Wertes wurde eine Liste aller gemessenen Gene geordnet nach der relativen Stärke der Genexpression (RITA-sensibel im Vergleich zu RITA-tolerant) erstellt. Geordnet nach den höchsten Werten zeigt das entstandene Ranking somit in absteigender Reihenfolge diejenigen Gene an, deren Expressionslevel in den H460<sub>T</sub>-Zellen im Vergleich zu H460 besonders hoch war. In der Listung wurde ein Cut-off von 3 gewählt. So entstand eine „Hitliste“ mit 61 Positionen und 29 unterschiedlichen Genen (Anhang Tabelle 6.1). Diese Gene wurden mittels Literaturrecherche in PubMed und unter GeneCards® auf im Kontext dieser Arbeit interessant erscheinende Publikationen und Eigenschaften überprüft und einzelne Gene zur weiteren Validierung ausgewählt.

Um nachzuweisen, dass die im Microarray gefundenen potenziellen „Hits“ nicht nur in der Microarray-Analyse vermehrt exprimiert werden, wurde eine RT-qPCR-Analyse zur Quantifizierung der mRNA-Level der betreffenden Gene in den toleranten und parentalen Zellen durchgeführt. Die RITA-toleranten Proben wurden auf die parenterale Probe (H460 = 1) normalisiert. Die Gene SOX2, FST und INHBA konnten dann im Weiteren mittels RT-qPCR validiert werden. Sie zeigen auch in der RT-qPCR eine signifikant vermehrte relative Expression in den toleranten H460<sub>T</sub>-Zellen im Vergleich zu den parentalen H460-Zellen (Abbildung 3.3). Hierbei zeigt sich auch für SOX2 der stärkste Effekt, passend auch zum Ergebnis des Microarrays, wo SOX2 ebenso auf Rang 1 (also als Gen mit der am stärksten differenten Genexpression zwischen H460 und H460<sub>T</sub>) gelistet wurde (Anhang Tabelle 6.1 und Abbildung 3.3).

### **3.2.2 Ein Knockdown der Gene SOX2, INHBA und FST führt nicht zu einer Resensitivierung der H460<sub>T</sub>-Zellen gegenüber RITA**

Um zu eruieren, ob die vermehrte Expression der drei „Hits“ des Microarrays auch funktionell eine Rolle im Toleranzmechanismus spielt, wurde getestet, welche Auswirkung die Hemmung der Expression von SOX2-, INHBA- und FST- auf das Zellüberleben der RITA-toleranten Zellen hat.

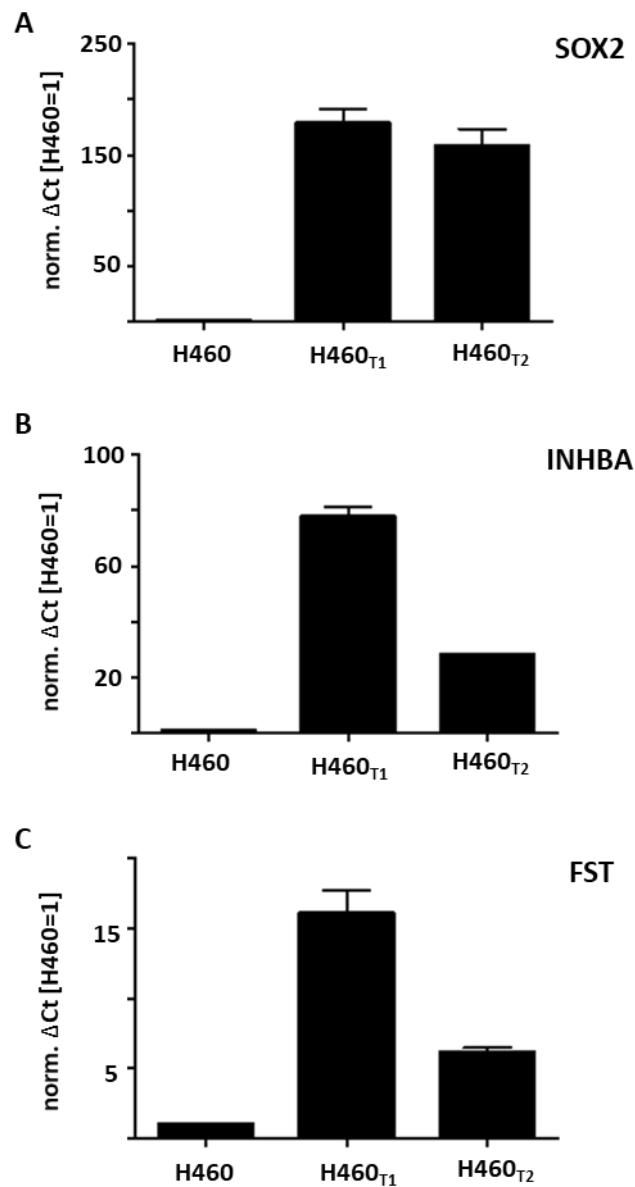


Abbildung 3.3 Vermehrte relative Expression der Gene SOX2, INHBA und FST in den H460<sub>T</sub>-Zellen im Vergleich zu den H460-Zellen

RT-qPCR zur Analyse der mRNA Level -  $\Delta\text{Ct}$  normalisiert auf H460 ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ ),  $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  - entsprechend der n-fachen Expression der Gene SOX2 (A), INHBA (B) und FST (C) in H460<sub>T1</sub> und H460<sub>T2</sub> im Vergleich zu H460; P-Werte: A) SOX2: H460<sub>T1</sub> = 0,00005 und H460<sub>T2</sub> = 0,000001, B) INHBA: H460<sub>T1</sub> = 0,0002 und H460<sub>T2</sub> = 0,001, C) FST: H460<sub>T1</sub> = 0,0004 und H460<sub>T2</sub> = 0,0001 [ $\alpha = 0,005$ ]. A, B und C: SOX2 (A), INHBA (B) und FST (C) zeigen jeweils eine signifikant vermehrte relative Expression in den toleranten H460<sub>T1</sub> und H460<sub>T2</sub> im Vergleich zu den parentalen H460. SOX2 zeigt dabei die ausgeprägteste Expressions-Level Zunahme mit bis zu 180-facher Expression (in H460<sub>T1</sub>) und 160-facher Expression (in H460<sub>T2</sub>).



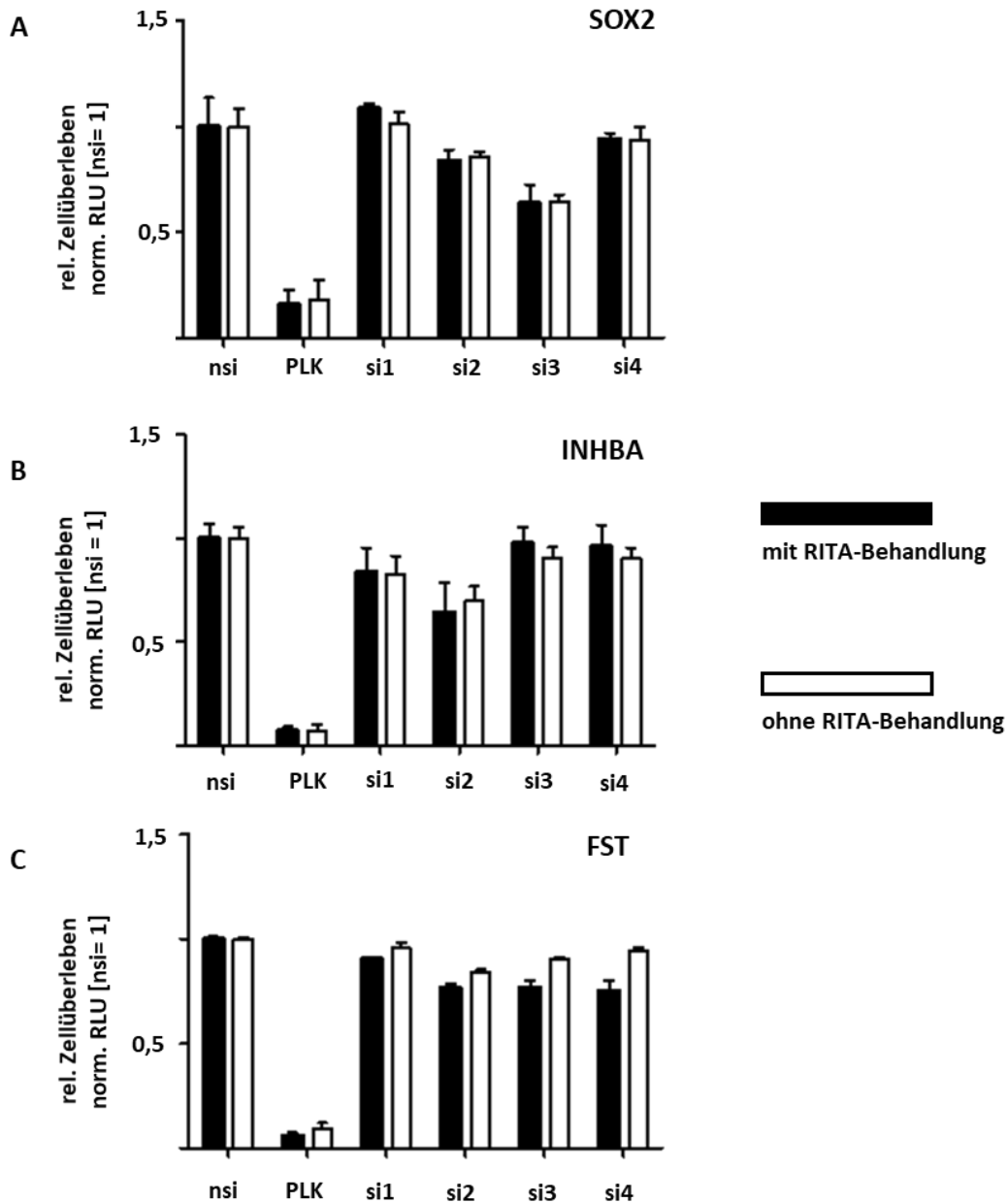


Abbildung 3.4 Persistierende RITA-Toleranz in den H460r-Zellen nach Knockdown von SOX2, INHBA und FST

siRNA-Transfektion von H460r mit einer non-spezifischen (Negativ)-Kontrolle (nsi), PLK als letale (Positiv)-Kontrolle (PLK) sowie vier unterschiedlichen siRNAs (si1 bis si4) gegen jeweils SOX2 (A), INHBA (B) und FST (C); Kultivierung mit und ohne RITA und Messung des Zellüberlebens nach drei Tagen im CellTiter-Glo-Assay in RLU normalisiert [nsi = 1]; P-Werte: A) SOX2: si1 = 0,5 si2 = 0,3 si3 = 0,3 si4 = 0,2 - B) INHBA: si1 = 0,07 si2 = 0,3 si3 = 0,5 si4 = 0,4, C) FST: si1 = 0,02 si2 = 0,004 si3 = 0,009 si4 = 0,06 [ $\alpha=0,005$ ]; A, B, C: Nach SOX2 (A), INHBA (B) und FST (C) Knockdown kein signifikant vermindertes relatives Überleben der mit RITA behandelten toleranten H460r-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

Dafür wurde in den H460<sub>T</sub>-Zellen die Expression des jeweiligen Gens mittels siRNA gehemmt und diese dann mit und ohne RITA-Behandlung inkubiert. Nach drei Tagen wurde das Zellüberleben mittels CellTiter-Glo-Assay gemessen.

Weder für den SOX2- noch für den FST- oder INHBA-Knockdown konnte ein deutlicher Effekt auf das Zellüberleben nach RITA-Behandlung gezeigt werden. Trotz guter (SOX2 und FST) bis akzeptabler (INHBA) Knockdown-Effizienzen (siehe Anhang: Abbildung 6.1, Abbildung 6.2, Abbildung 6.3) wurde das Überleben der Zellen nach siRNA-Knockdown des entsprechenden Gens insgesamt nicht wesentlich beeinträchtigt. Dabei konnte insbesondere auch kein wesentlich signifikanter Unterschied des Zellüberlebens zwischen den mit und ohne RITA kultivierten Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 3.4). Es konnte somit gezeigt werden, dass SOX2, FST und INHBA in den toleranten Zellen vermehrt exprimiert werden; eine Resensitivierung der H460<sub>T</sub>-Zellen durch den Knockdown eines der „Hit“-Gene des Microarrays gelingt jedoch nicht.

### **3.3 siRNA – Screen**

Um Gene zu identifizieren, die insbesondere auch funktionell eine Rolle in Bezug auf die RITA-Toleranz spielen und deren Knockdown möglicherweise eine Resensitivierung der H460<sub>T</sub>-Zellen bewirken können, wurde ein siRNA-Screen durchgeführt. Die toleranten Zellen wurden mit den siRNAs einer DNA-Damage-Response-Bibliothek transfiziert und mit RITA behandelt. Das Zellüberleben wurde mittels CellTiter-Glo-Assay analysiert. Von Interesse sind die Gene, mit deren Knockdown die H460<sub>T</sub>-Zellen unter RITA-Behandlung wieder vermehrt absterben und damit wieder sensibel gegenüber einer RITA-Behandlung reagieren (für den Ablauf des Screens Vgl. Kapitel 2 sowie Abbildung 4.1.).

#### **3.3.1 Screen-Etablierung**

Die Transfektion wurde zunächst per Hand im 96 Well Format etabliert und die Effektivität mit dem Z'-Faktor überprüft (Abbildung 3.5). Als Positiv-Kontrollen

wurden PLK und POLD2 getestet (siehe Kapitel 2). Für den Screen wurde bei geringeren Werten für den Z'-Faktor PLK ausgewählt (Abbildung 3.5).

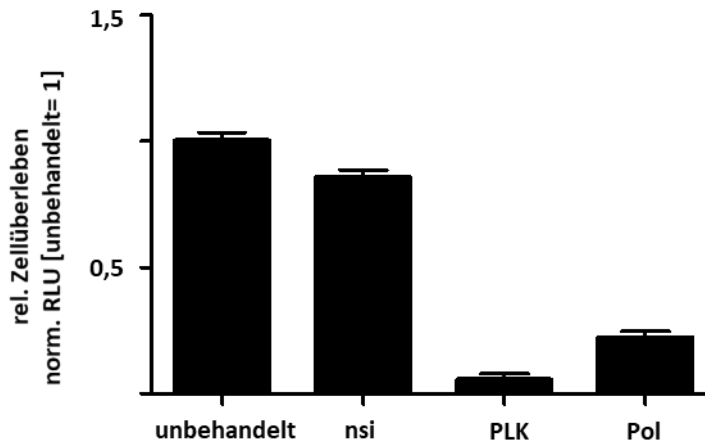


Abbildung 3.5 siRNA-Screen-Etablierung 96-Well Format

Messung des Zellüberlebens nach drei Tagen im CellTiter-Glo-Assay in RLU normalisiert [unbehandelt = 1] von H460<sub>T</sub>-Zellen unbehandelt sowie nach siRNA Transfektion einer non-spezifischen (Negativ-)Kontrolle (nsi) und zwei letaler (Positiv-)Kontrollen (PLK und Pol; Z'-Faktor: PLK = 0,8; Pol = 0,7. Bei Z'-Faktoren zwischen 0,5 und 1,0 entspricht der Aufbau einem exzellenten Essay mit einem geringeren (etwas höheren) Wert für PLK.

Danach wurden mehrere Test-Transfektionen mit dem Pipettier-Roboter durchgeführt sowie alle Reagenzien, die für den gesamten Screen und für das Hit-Screening verwendet wurden, separiert und in einem letzten Übungsdurchlauf getestet. Dieser wurde nach dem exakten Aufbau und Ablauf des tatsächlichen Screens durchgeführt. Anstatt der siRNA-Bibliothek wurde H<sub>2</sub>O als unbehandelt-Kontrolle verwendet (Abbildung 3.6). Die Zellen der nsi-Kontrolle zeigten dabei annähernd das Überleben der unbehandelten Zellen, während der Knockdown von PLK zu einem sehr geringen Zellüberleben führte. Der Roboter pipettiert sehr genau, sodass die Abweichungen minimal ausfielen. Daher waren die Z'-Faktoren optimal. Der Screen konnte entsprechend dieses Testdurchlaufs durchgeführt werden.

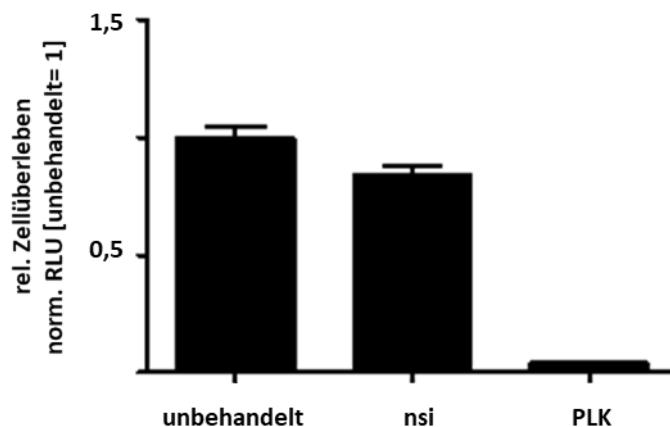


Abbildung 3.6 Testdurchlauf vor Screening-Start mit dem Pipettier-Roboter

Messung des Zellüberlebens nach drei Tagen im CellTiter-Glo-Assay in RLU normalisiert [unbehandelt = 1] von H460r-Zellen unbehandelt sowie nach siRNA Transfektion einer non-spezifischen (Negativ-)Kontrolle (nsi) und einer (Positiv-)Kontrollen (PLK); Z'-Faktor = 0,9. Bei einem Z'-Faktoren zwischen 0,5 und 1,0 entspricht der Aufbau einem exzellenten Essay.

### 3.3.2 Daten-Erfassung, Qualitätssicherung und Analyse: Eine „Hitliste“ aus 57 Genen zur weiteren Validierung wird erstellt

Der gesamte Screen wurde fünfmal unter gleichbleibenden Bedingungen und mit denselben Materialien repliziert. Alle Signalintensitäts-Messungen (in RLUs) wurden digital gespeichert und entsprechend der Nummer des Durchlaufs und der Source Plate sowie ihrer Position auf den Destination Plates (s. auch Kapitel 2) in das RNAither-Protokoll eingefügt. Um die Qualität zu beurteilen wurde für jede Platte der Z'-Faktor bestimmt. Mit Hilfe der Positiv- und Negativ- Kontrolle kann so überprüft werden ob die Messung gelungen ist und ausreichend Aussagekraft besitzt. Mit Ausnahme einer Platte hatten alle einen Z'-Faktor von größer als 0.5 und konnten somit zu Datenanalyse verwendet werden. Um die Variabilität der absoluten Höhen der Signalintensitäten der einzelnen Platten zu kontrollieren, muss eine Normalisierung der Daten durchgeführt werden: Hierfür wurden die Daten zunächst plattenweise auf die Negativ-Kontrolle normalisiert und dann der Median aller Replikate gebildet.

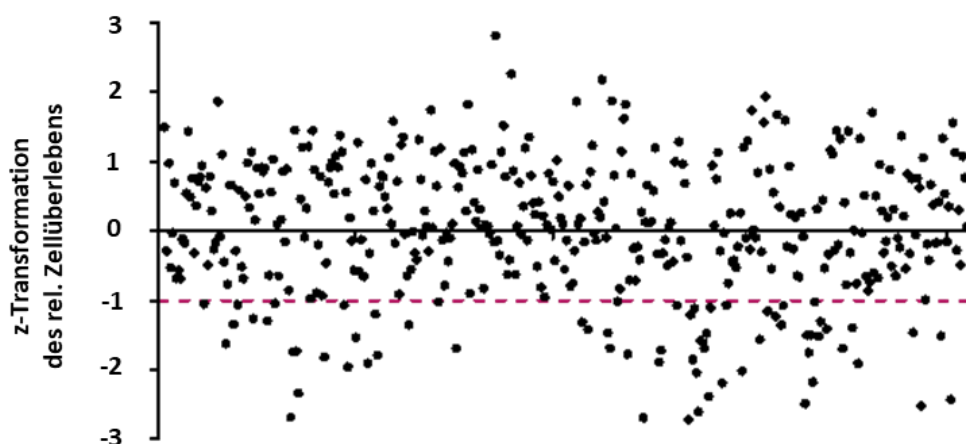


Abbildung 3.7 Übersicht Zellüberleben der H460<sub>r</sub>-Zellen im siRNA- Screen der DNA-Damage-Response-Bibliothek

z-Transformation des relativen Zellüberlebens der H460<sub>r</sub>-Zellen nach dem siRNA-Screen mit der DNA-Damage-Response-Bibliothek, Kultivierung mit RITA und Messung des Zellüberlebens nach drei Tagen im CellTiter-Glo-Assay in RLU normalisiert [nsi = 1]. rote Linie bei -1 = -1 Median der StDEv

Die negativen Werte nach z-Transformation stellen weniger Zellüberleben im Vergleich zum medianen Überleben dar. Als potenzielle „Hits“ wurden die Gene mit einem Wert <-1 (unterhalb der roten Linie) ausgewählt.

Die normalisierten Werte, die das Zellüberleben nach Knockdown repräsentieren, wurden z-transformiert („robust z-score“). Man erhält eine dimensionslose Verteilung der Daten um den Wert 0 (Vgl. auch Kapitel 2) (Abbildung 3.7).

Um die potenziellen „Hits“ des Screens zu identifizieren wurde eine Liste der kontrollnormalisierten, z-transformierten Werte erstellt. Von Interesse waren die Gene, denen ein negativer Wert zugeordnet war. Ein negativer Wert nach z-Score repräsentierte wenig Zellüberleben nach Knockdown eines spezifischen Gens. Als Cut-off-Wert wurde der Median aller Werte minus dem Median der absoluten Standardabweichung (hier nach z-Transformation – „robust z-score“ = -1) gewählt. Alle Werte, die kleiner waren als -1, wurden als potenzielle „Hits“ angesehen (Abbildung 3.7). Die 57 identifizierten Gene wurden zur weiteren Validierung ausgewählt (Anhang 3: Liste der normalisierten z-transformierten Werte [Cut-off: Median -1 Median der StDEv: 57 Gene]).

### **3.3.3 Ein Knockdown der „Hits“ führt auch außerhalb des Screens zu einem reduzierten Zellüberleben der H460<sub>T</sub>-Zellen; ein Effekt, der jedoch sowohl mit als auch ohne RITA-Behandlung auftritt**

Zur Validierung der Ergebnisse wurden die 57 potenziellen „Hits“ erneut außerhalb des Screen-Settings getestet. Es wurde ein „Hit-Screening“ mit vom Screen/von der DNA-Damage-Response-Library differenter siRNAs durchgeführt. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe des Roboters. Das Ergebnis des Screens konnte hier bestätigt werden. Es zeigte sich ein vermindertes Zellüberleben der H460<sub>T</sub>-Zellen nach Knockdown der 57 „Hit“-Gene im CellTiter-Glo-Assay (Abbildung 3.8).

Der siRNA-Screen wurde unter Behandlung der Zellen mit RITA durchgeführt. Um diejenigen Gene aus der Liste der „Hits“ zu identifizieren, deren Knockdown nur unter Behandlung mit RITA, nicht aber in unbehandeltem Zustand zu einem verminderten Zellüberleben führt, wurden im durchgeführten „Hit-Screening“ die H460<sub>T</sub>-Zellen nach der Transfektion einmal mit RITA-Behandlung und einmal ohne RITA-Behandlung kultiviert. Nachdem die Werte plattenweise auf den Mittelwert der Negativ-Kontrolle normalisiert wurden, konnte man die Werte für das relative Zellüberleben nach Transfektion der siRNA eines spezifischen Gens mit und ohne RITA-Behandlung miteinander vergleichen (Abbildung 3.8). Von Interesse waren diejenigen Gene, deren Knockdown ohne RITA-Behandlung keinen großen Effekt auf das Überleben der Zellen hatte; deren Knockdown mit RITA-Behandlung aber zum verstärkten Zelltod der RITA-resistenten Zellen führte. Dies konnte für keines der „Hit“-Gene bestätigt werden. Nach Knockdown der verschiedenen „Hit“-Gene konnte in keinem Fall ein vermehrtes Überleben der H460<sub>T</sub>-Zellen ohne eine RITA-Behandlung gezeigt werden (Abbildung 3.8).

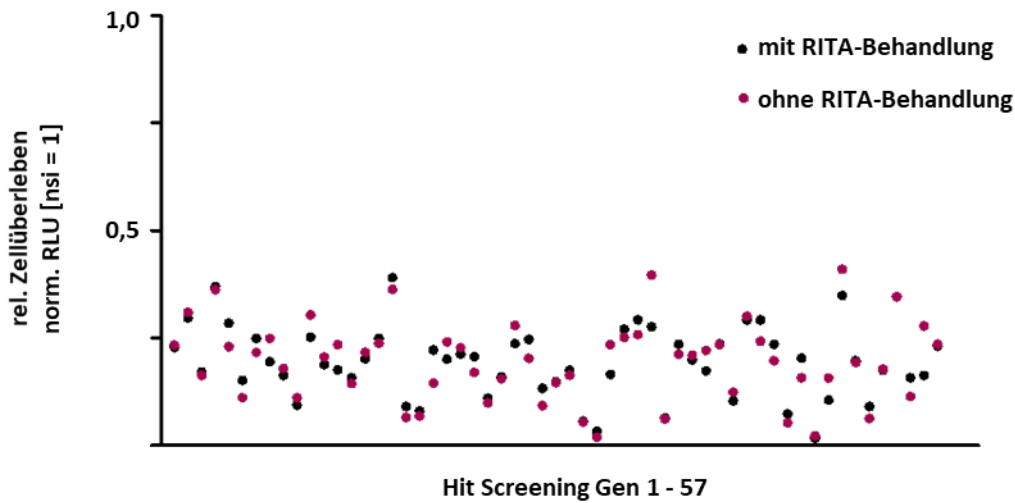


Abbildung 3.8 „Hit-Screening“: Vermindertes relatives Zellüberleben der H460<sub>T</sub>-Zellen nach Knockdown der „Hit“-Gene mit und ohne RITA-Behandlung

Transfektion von H460<sub>T</sub>-Zellen mit siRNAs gegen die „Hit“-Gene des Screens, Kultivierung mit und ohne RITA-Behandlung und Messung des Zellüberlebens nach drei Tagen im CellTiter-Glo-Assay in RLU normalisiert auf die Negativkontrolle [nsi = 1]; Z'-Faktoren: 0,8 und 0,9. Entsprechend des Screens zeigt sich nach Knockdown der 57 „Hit“-Gene ein vermindertes relatives Zellüberleben. Dieser Effekt ist sowohl mit als auch ohne RITA zu sehen.

### 3.3.4 Identifikation von RAD18 im Screen-Nachtrag: Durch einen RAD18-Knockdown kann eine Resensitivierung von H460<sub>T</sub> erreicht werden

In der siRNA-Bibliothek, die bei dem RNAi-Screen verwendet wurde, fehlten einige Gene, die unter dem Überbegriff „Replikationsstress“ zusammengefasst werden können. Sie können anderen siRNA-Bibliotheken zugeordnet sein, spielen aber auch eine Rolle in Bezug auf DNA-Schaden und DNA-Reparatur und sind daher im Rahmen dieser Untersuchung von Interesse.

Die folgenden Gene wurden daher zusätzlich in einem „Mini-Screen“ getestet:

Cul4a, Cul4b, Rad18, Rad6A, Rad6B, FANCD2, USP1

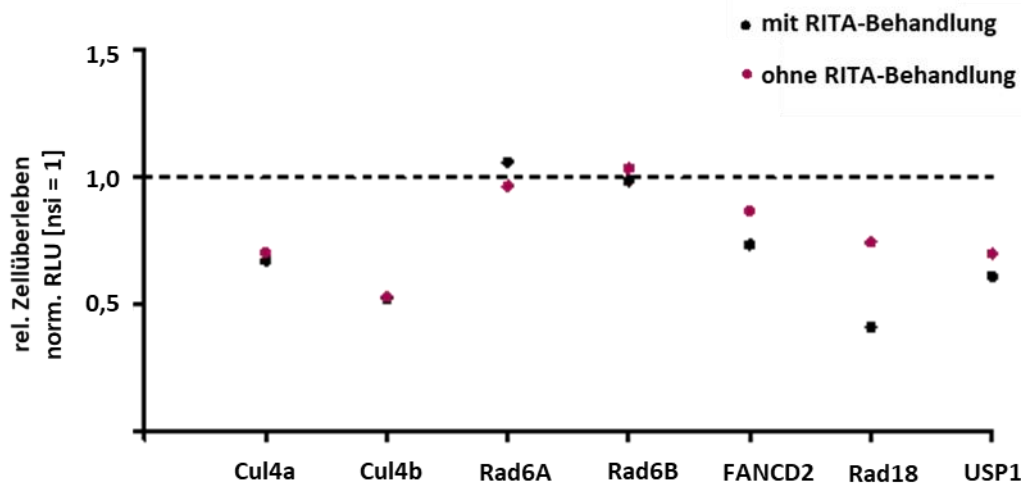


Abbildung 3.9 „Mini-Screen“: Relatives Zellüberleben der H460<sub>T</sub>-Zellen nach Knockdown der Replikations-Stress Gene mit und ohne RITA

Transfektion von H460<sub>T</sub>-Zellen mit einem siRNA Pool gegen Nachtrag-/Replikations-Stress Gene, Kultivierung mit und ohne RITA-Behandlung und Messung des Zellüberlebens nach drei Tagen im CellTiter-Glo-Assay in RLU normalisiert auf die Negativkontrolle [nsi = 1]; Z'-Faktoren der Platten: 0,8, 0,8, 0,9 und 0,8; p-Werte relatives Überleben mit und ohne RITA: Cul4a = 0,01, Cul4b = 0,877, Rad6a = 0,01, Rad6b = 0,2, FANCD2 = 0,07, Rad18 = 0,004, USP1 = 0,8 [ $\alpha=0,005$ ]. Die H460<sub>T</sub>-Zellen zeigen nach Rad18 Knockdown sowohl das geringste relative Überleben nach RITA-Behandlung als auch einen signifikanten Unterschied zwischen den mit RITA behandelten und unbehandelten Zellen.

Die Transfektion der „Replikationsstress-Gene“ wurde nach gleichem Protokoll mit Hilfe des Pipettier-Roboters sowie mit denselben Reagenzien wie der ursprüngliche Screen durchgeführt. Alle Gene wurden von Anfang an mit und ohne RITA-Behandlung getestet. Die Transfektion der siRNA gegen die „Replikationsstress-Gene“, jeweils mit und ohne RITA, wurde in zwei Replikaten durchgeführt. Die Qualität des Mini-Screens wurde mit Hilfe der Z'-Faktoren der einzelnen Platten überprüft. Die Signalintensitäten wurden plattenweise auf die gemittelte Negativkontrolle normalisiert und der Median der beiden Replikate gebildet. Es zeigt sich nach Knockdown des Gens RAD18 ein deutlich vermindertes relatives Zellüberleben in H460<sub>T</sub>. Im Vergleich dazu lag die Zellvitalität ohne RITA-Behandlung signifikant höher (Abbildung 3.9).



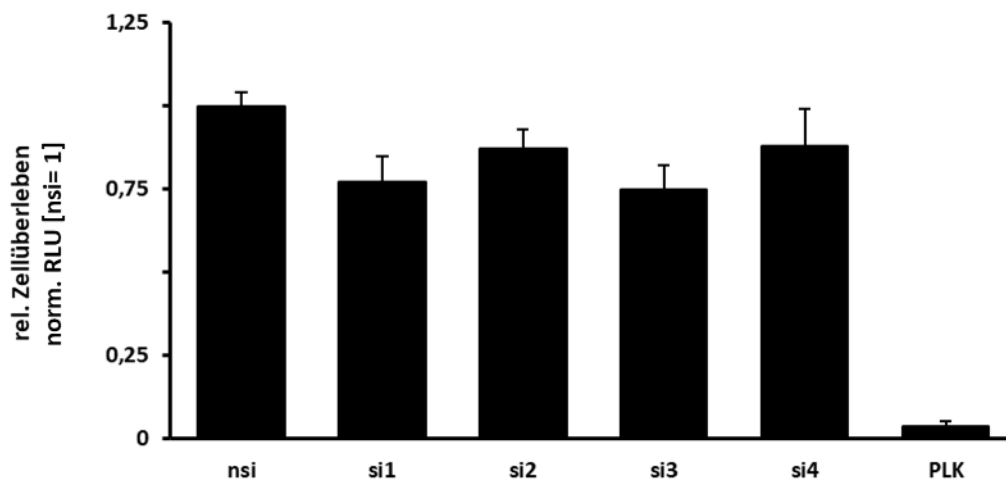


Abbildung 3.10 Nur gering reduziertes relatives Überleben der H460<sub>T</sub>-Zellen nach RAD18 Knockdown und RITA-Behandlung im CellTiter-Glo-Assay

siRNA-Transfektion von H460<sub>T</sub> mit einer non-spezifischen (Negativ)-Kontrolle (nsi), PLK als letale (Positiv)-Kontrolle (PLK) sowie vier unterschiedlichen siRNAs (si1 bis si4) gegen RAD18; Kultivierung mit RITA und Messung des Zellüberlebens nach drei Tagen im CellTiter-Glo-Assay in RLU normalisiert [nsi = 1]; P-Werte: si1 = 0,003, si2 = 0,1576, si3 = 0,001, si4 = 0,025 [ $\alpha=0,005$ ]. Nach RAD18 Knockdown zeigt sich nur ein gering vermindertes relatives Überleben der H460<sub>T</sub>-Zellen, mit nur teilweise signifikantem Effekt (si1 und si3) im Vergleich zur nsi-Negativ-Kontrolle.

Um den Effekt des RAD18 Knockdowns auf die H460<sub>T</sub>-Zellen zu validieren wurden diese erneut mit weiteren gegen RAD18 gerichteten siRNAs (nicht die im Screen verwendeten siRNAs aus der Bibliothek) transfiziert. Mittels RT-qPCR wurde zunächst die Knockdown-Effizienz der RAD18 siRNAs überprüft: Nach Transfektion konnten durchgehend niedrige mRNA-Level des RAD18-Gens nachgewiesen werden (siehe Anhang: Abbildung 6.4). Nach Messung des Zellüberlebens nach drei Tagen im CellTiter-Glo-Assay konnte jedoch allenfalls ein geringes und nur teilweise signifikant reduziertes relatives Zellüberleben der mit siRAD18 im Vergleich zu den mit der nsi-Negativ-Kontrolle transfizierten Zellen gezeigt werden (Abbildung 3.10). Im Colony Formation Assay ließ sich hingegen ein deutlicher Effekt nach RAD18 Knockdowns darstellen (Abbildung 3.11): Ohne RITA-Behandlung hatte der RAD18 Knockdown sowohl in den parental H460-Zellen als auch in den toleranten H460<sub>T</sub>-Zellen keine wesentliche Auswirkung auf das Zellüberleben.

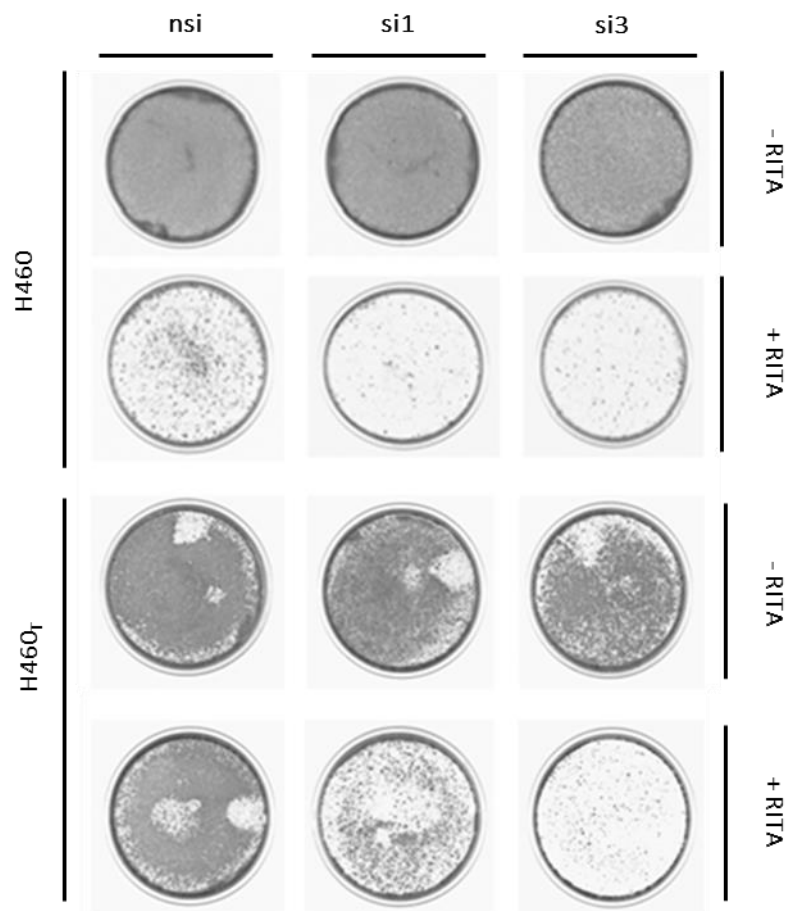


Abbildung 3.11 Reduziertes Überleben der toleranten H460<sub>T</sub>-Zellen nach RAD18 Knockdown mittels siRNA und RITA-Behandlung im Colony Formation Assay

siRNA-Transfektion von H460 und H460<sub>T</sub> mit einer non-spezifischen (Negativ-)Kontrolle (nsi) und zwei unterschiedlichen siRNAs (si1 und si3) gegen RAD18; Kultivierung mit und ohne RITA (- RITA und + RITA) für zehn Tage. In der Kultivierung ohne RITA sieht man in beiden Zelllinien sowohl in der Negativ-Kontrolle als auch mit Rad18 Knockdown reichlich Koloniebildung. Die parentalen H460-Zellen zeigen nach RITA-Behandlung deutlich reduzierte koloniebildungsfähige Zellen, wohingegen in den toleranten H460<sub>T</sub>-Zellen unter der Negativ-Kontrolle hier weiterhin eine ungestörte Koloniebildung darstellbar ist. Nach RAD18 Knockdown kann jedoch auch in H460<sub>T</sub> eine verminderte Koloniebildungsfähigkeit nach RITA Behandlung nachgewiesen werden.

Weiterhin zeigen die H460<sub>T</sub>-Zellen auch nach RITA-Behandlung und Transfektion mit der nsi-Negativ-Kontrolle kein wesentlich vermindertes Zellüberleben (als Zeichen der beschriebenen Toleranz). Nach RAD18-Knockdown und RITA-Behandlung konnte im Vergleich dazu ein deutlich reduziertes Zellwachstum in den H460<sub>T</sub>-Zellen beobachtet werden. Auch in den parentalen H460-Zellen konnte unter RITA-

Behandlung plus RAD18 Knockdown ein vermindertes Zellüberleben im Vergleich zur Negativ-Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 3.11).

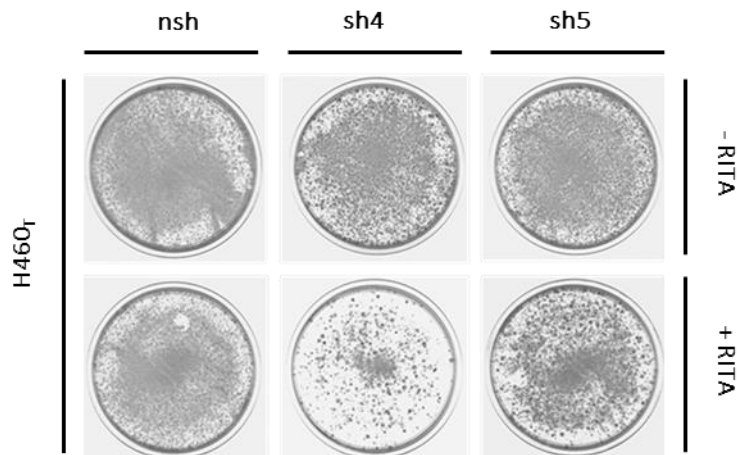


Abbildung 3.12 Reduziertes Überleben der toleranten H460<sub>T</sub>-Zellen nach RAD18 Knockdown mittels shRNA und RITA-Behandlung im Colony Formation Assay

shRNA-Transfektion von H460<sub>T</sub> mit einer non-spezifischen (Negativ)-Kontrolle (nsh) und zwei unterschiedlichen shRNAs (sh4 und sh5) gegen RAD18; Kultivierung mit und ohne RITA (- RITA und + RITA) für zehn Tage. In der Kultivierung ohne RITA sieht man in sowohl in den mit shRNA gegen RAD18 infizierten H460<sub>T</sub>-Zellen als auch in der Negativ-Kontrolle reichlich Koloniebildung. Ein entsprechendes Bild zeigt sich mit RITA-Behandlung in der Negativ-Kontrolle. Im Vergleich hierzu kommt in den mit RAD18 shRNA infizierten H460<sub>T</sub>-Zellen eine verminderte Kolonienbildungsfähigkeit nach RITA Behandlung zu Darstellung.

Im Weiteren konnte dieser Effekt auch mittels RAD18 Knockdown durch shRNAs nachgewiesen werden: H460<sub>T</sub>-Zellen wurden mit den Vektoren für die RAD18 shRNAs 1-5 infiziert, um einen dauerhaften Knockdown für RAD18 zu erzeugen. Im Western Blot zeigten die mit den sh-RNAs 4 und 5 infizierten Zellen einen stabilen Verlust von Rad18 auf Proteinebene (siehe Anhang: Abbildung 6.6). Sie wurden für die weitere Analyse im Colony Formation Assay verwendet. Hierbei ließ sich erneut darstellen, dass der Verlust der RAD18 Expression nach Knockdown ohne weitere Behandlung keinen Einfluss auf das Zellüberleben hat. Die Zellen proliferierten in vergleichbarem Maß wie in der Negativ-Kontrolle. Nach RITA-Behandlung zeigen die RAD18 depletierten, ursprünglich toleranten H460<sub>T</sub>-Zellen allerdings wieder ein verringertes Zellüberleben im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (Abbildung 3.12).

Durch den RNA-Interferenz-Screen der Gene, die an DNA-Schaden und -Reparatur beteiligt sind, wurde somit RAD18 als Hit identifiziert. Unter der Bedingung niedriger RAD18 Transkription (durch shRNA und siRNA Knockdown) und somit Beeinträchtigung der Rad18-Funktion reagieren die H460<sub>T</sub>-Zellen wieder sensibler auf die Behandlung mit RITA.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 siRNA-Screen: Die Resensitivierung der H460<sub>T</sub>-Zellen kann durch einen RAD18-Knockdown erreicht werden

#### 4.1.1 Die Überwindung der RITA-Toleranz durch RAD18 als ein Gen der DNA-Schadens-Antwort ist passend zur aktuellen Einordnung von RITA als primären DNA-Vernetzer

Nach seiner Entdeckung Mitte der 2000er Jahre war RITA als Wirkstoff in der Reihe der p53-Reaktivatoren ein hoffnungsvoller Kandidat einer zukünftigen Krebstherapie, der potent maligne (p53-WT)-Zellen angreifen und nicht-neoplastisches Gewebe schonen sollte (*Issaeva et al. 2004*). Es stellte sich in den folgenden Jahren jedoch heraus, dass RITA nicht nur in p53-WT-Zellen, sondern auch in p53-mutierten oder sogar p53-null-Zellen Apoptose einleiten kann (*Weilbacher et al. 2014*). *Wanzel et al. (2016)* konnten zeigen, dass RITA Krebszellwachstum unabhängig von funktionellem p53 inhibiert. Daneben konnte nach RITA-Behandlung (in sensitiven Zellen) eine deutliche Induktion der DNA-Schadens-Antwort, wie nach DNA-Doppelstrangbrüchen, nachgewiesen werden. Diese Erkenntnis wird durch frühere Arbeiten unterstützt, die RITA bereits mit DNA-Schaden, insbesondere DNA-Vernetzung, in Verbindung brachten (*Doggrell 2005, De Lange et al. 2012*). Die aktuelleren Erkenntnisse legen daher letztendlich nahe, dass RITA doch primär in seiner Funktion als DNA-Vernetzer wirkt (*Wanzel et al. 2016*) und somit seine Rolle als vielversprechender p53-Reaktivator nicht erfüllen konnte.

Das Ergebnis des in der vorliegenden Dissertation durchgeführten siRNA-Screens einer DNA-Schadens-Antwort-Bibliothek mit der Identifizierung von RAD18 als „Hit“ unterstützt diese Annahme: Die Toleranz der H460<sub>T</sub>-Zellen gegenüber einer RITA-Behandlung kann durch einen RAD18 Knockdown überwunden werden. Dieses Ergebnis macht zunächst einmal deutlich, dass eine Resensitivierung, wie bereits vermutet (siehe Einleitung und *Wanzel et al. 2016*), möglich ist und es sich um einen

transienten, nicht mutationsbedingten Toleranzmechanismus handelt. Daneben legt das Ergebnis eines „Hits“ innerhalb einer Bibliothek der DNA-Schadens-Antwort nahe, dass die Toleranz der H460<sub>T</sub>-Zellen gegenüber RITA insgesamt eher nicht von p53 (bzw. dessen fehlender Reaktivierung) abhängig ist, sondern vielmehr von einer veränderten Antwort der Zelle auf DNA-Schaden; passend zu der Erkenntnis, dass RITA weniger als p53-Reaktivator, sondern eher als DNA-Vernetzer, der einen DNA-Schaden verursacht, einzuordnen ist (*Wanzel et al. 2016*).

Es handelt sich bei Rad18 im Speziellen um ein Protein mit Bedeutung in der DNA-Schadens-Toleranz, genauer in der Überbrückung von Replikationsarrest (*Ting et al. 2010*). Im Rahmen der Transläsions-DNA-Synthese (TLS) wird Rad18 benötigt um die DNA-Synthese trotz beschädigter Matrize fortzusetzen (*Xin et al. 2000, Yang et al. 2018*). RAD18 wurde in der Literatur auch bereits als Mediator von Resistenzen gegenüber ionisierender Strahlung beschrieben (*Xie et al. 2014*) und wird generell im Rahmen der TLS mit Tumorinitiation, -progression und insbesondere auch Chemoresistenz und DNA-Schadens-Toleranz in Verbindung gebracht (*Yang et al. 2018*) (*Barkley et al. 2012*). Es konnte auch bereits gezeigt werden, dass eine Beeinträchtigung der RAD18 Funktion Tumorzellen gegenüber ionisierender Strahlung oder Zytostatika sensitivieren kann (*Tateishi et al. 2000, Sasatani et al. 2015*). RAD18 wäre demnach insgesamt ein potenziell lohnenswertes therapeutisches Angriffsziel, mit dem eine Resistenzbildungen von Vornherein vermieden werden oder auch Sensitivierung von Krebszellen für eine Bestrahlungs- oder Chemotherapie erreicht werden könnte.

#### **4.1.2 Rad18 spielt im Toleranzmechanismus in seiner Verbindung zum Fanconi-Anämie-Signalwegs eine Rolle**

Auffällig ist, dass RAD18 zusammen mit RAD6 einen Komplex bildet (*Xin et al. 2000*) um seine grundsätzlichen Funktionen innerhalb der TLS auszuüben, ein Knockdown von RAD6 im Screen aber nicht den gleichen Effekt wie der RAD18-Knockdown zeigte. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass RAD18 neben seiner Funktion als Ubiquitin-Ligase im Rahmen der TLS noch davon unabhängig Funktionen in der

DNA-Reparatur selbst hat und auch an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt ist (Ting et al. 2010, Sasatani et al. 2015).

Wanzel et al. (2016) konnten zeigen, dass der RITA-Toleranz eine mTOR vermittelte vermehrte FancD2-Expression mit folgend verstärkter DNA-Reparatur zu Grunde zu liegen scheint. Der Knockdown von FancD2 führt ebenso wie von RAD18 zu einer Resensitivierung der toleranten Zellen gegenüber RITA. Ebenso konnten Wanzel et al. (2016) in den toleranten Zellen erhöhte Protein-Level sowohl für FancD2 als auch für Rad18 zeigen (Western Blot: erhöhte Rad18-Level in H460<sub>T</sub> - siehe Anhang). Zunächst scheinen Rad18 als Teil der TLS und FancD2 als integraler Bestandteil des Fanconi-Anämie-Signalwegs (FA-Signalwegs) zwei separaten Reparaturwegen zugeordnet zu sein. Jedoch wurde bereits eine gegenseitige Beeinflussung dieser beiden Signalwege über die Verbindung von FancD2 und Rad18 in der Literatur diskutiert (Song et al. 2010). Park et al. (2010) konnten sogar bereits zeigen, dass der Knockdown von RAD18 zu einer Beeinträchtigung der FancD2-abhängigen DNA-Schadens-Antwort führt, sodass die hier getroffene Beobachtung der Resensitivierung der RITA toleranten Zellen durch einen RAD18 Knockdown die Ergebnisse von Wanzel et al. (2016) bezüglich einer FancD2 vermittelten RITA-Toleranz unterstützt. Auch in Zusammenschau mit der fehlenden Resensitivierung der H460<sub>T</sub>-Zellen durch einen RAD6-Knockdown lässt sich somit vermuten, dass RAD18 für den Toleranzmechanismus in seinen TLS-unabhängigen Funktionen (seiner Verbindung zum FA-Signalweg und in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen) eine Rolle spielt.

## **4.2 RITA-tolerante und -sensitive Zellen im Vergleich: Eine Microarray-Analyse unterstreicht den Stammzellcharakter der H460<sub>T</sub>-Zellen**

### **4.2.1 SOX2**

In den RITA-toleranten Zellen zeigte sich die SOX2-Transkription im Vergleich zu den RITA-sensitiven Zellen deutlich heraufreguliert. SOX2 ist ein Transkriptionsfaktor,

der eine zentrale Rolle in der Regulation von Pluripotenz und Differenzierung spielt. Es wird häufig als Marker für Zellen mit Stammzeleigenschaften genannt. Die vermehrte Expression von SOX2 (zusammen mit einem oder mehreren anderen Transkriptionsfaktoren) kann somatische Zellen in pluripotente Zellen verwandeln (*Jeong et al. 2010*). Außerdem steht eine vermehrte SOX2-Expression in Verbindung mit erhöhter Expression von weiteren Tumorstammzellmarkern sowie dem Potential Sphären zu bilden (*Bareiss et al. 2013*), passend zu den Eigenschaften der H460<sub>T</sub>-Zellen. Auch in der Literatur wurde SOX2 in den letzten Jahren vermehrt mit Therapie-Resistenz und schlechter Prognose in Verbindung gebracht (*Li et al. 2015*) (*Jintong et al. 2015*).

Der Versuch durch künstliches Herabregulieren von SOX2 die RITA-Toleranz zu überwinden und die H460<sub>T</sub>-Zellen wieder in RITA-sensitive Zellen umzuwandeln gelang jedoch nicht. In diesem Zusammenhang wurde in der Literatur bereits beschrieben, dass die Stabilisierung von SOX2 wichtig für Erzeugung von Pluripotenz, jedoch weniger für deren Aufrechterhaltung, ist (*Ouyang et al. 2015*).

SOX2 scheint somit bei den schon etablierten toleranten Zellklonen funktionell eine untergeordnete Rolle zu spielen. Es konnte jedoch mit der vermehrten Expression von SOX2 ein weiterer Tumorstammzellmarker für die RITA-toleranten Zellen etabliert werden.

Das Ergebnis unterstreicht somit den Tumorstammzell-Charakter der H460<sub>T</sub>-Zellen. Interessanterweise zeigt die Zelllinie A549, für die ein großer natürlicher Anteil von Tumorstammzellen (>45%) beschrieben wurde, eine inhärente Resistenz gegenüber RITA (*Weilbacher et al. 2014*). In der Literatur wurde außerdem bereits eine bevorzugte Aktivierung von DNA-Reparatur-Signalwegen zu Lasten der Apoptoseeinleitung in Tumorstammzellen beschrieben (*Schatton et al. 2009*); so wie auch die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen mit den Arbeiten von Wanzel et al. (*2016*) einen Toleranzmechanismus, der auf einer verstärkten DNA-Reparatur der toleranten Zellen nach DNA-Schaden basiert, nahelegen. Passend dazu beschrieben Lundholm et al. (*2013*) radio- und cisplatinresistente NSCLC-Zellen (und nach Wanzel et al. (*2016*) zeigen die RITA-toleranten Klone ebenfalls eine Kreuzresistenz



gegenüber Cisplatin), die Sphären bildeten, CD133 positiv waren sowie vermehrt SOX2 exprimierten und welche sie somit als Tumorstammzellen charakterisierten. Sie konnten zusätzlich zeigen, dass diese Zellen veränderte zelluläre DNA-Schaden-Reparatur-Signale und eine verringerte Apoptose-Einleitung nach zytotoxischer Behandlung aufweisen.

Hier zeigt sich somit ein Zusammenhang zwischen Tumorstammzellen bzw. Tumorstammzellcharakteristika, Therapieresistenz und einer veränderten Antwort der Zelle auf DNA-Schaden, passend zu den Erkenntnissen dieser Arbeit.

#### **4.2.2 INHBA und FST**

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass sowohl INHBA als auch FST, die funktionell miteinander in Verbindung stehen, in den toleranten Zellen überexprimiert werden. INHBA gehört zur TGF-beta Superfamilie. Das Gen codiert für die Inhibin beta A Untereinheit, die sowohl Teil von Activin A bzw. Activin AB als auch von dessen funktionellem Gegenspieler Inhibin A ist. FST (Follistatin) kann Activin mit hoher Affinität binden und es so hemmen. Diese Funktion wurde zunächst in Bezug auf die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse entdeckt: Activin verstärkt die FSH-Sekretion, während Inhibin und FST diese hemmen. Neben dieser Funktion als Hormone kontrollieren sie aber auch lokal im Gewebe verschiedene Zellfunktionen als Proliferations-/ beziehungsweise Differenzierungsfaktoren der TGF-beta Familie und sind mit diesen Funktionen im Kontext dieser Arbeit von Interesse (*Knight & Glister 2001*). Insbesondere für Activin A, das nur aus Inhibin beta A Untereinheiten besteht, wurden in der Literatur schon vielfältige Funktionen in der Regulation von Proliferation, Zell-Differenzierung, Tumorprogression, Apoptose, Immunantwort und Wundheilung beschrieben (*Chen et al. 2006*). Es konnte außerdem ein Zusammenhang zwischen der Überexpression des Gens INHBA und einer schlechteren Prognose und Langzeitüberlebensrate für verschiedene Karzinome des Gastrointestinaltraktes nachgewiesen werden, z.B. für Pankreaskarzinome (*Togashi et al. 2015*), Karzinome des Magens (*Oshima et al. 2014*) und kolorektale Karzinome (*Okano et al. 2013*). Auch für FST konnte in

verschiedenen Studien gezeigt werden, dass es eine Rolle in der Tumorprogression spielt: Die Möglichkeit FST als Biomarker für das Adenokarzinom der Lunge (*Chen et al. 2014*) oder als potenzielles Angriffsziel bei Prostatakarzinomen (*Sepporta et al. 2013*) zu verwenden wurde in der Literatur diskutiert. FST und INHBA sind in den erzeugten Zellklonen deutlich überexprimiert und scheinen daher von Bedeutung für die Toleranz gegenüber RITA zu sein. Die oben genannten Studien, die eine Rolle der beiden Gene in Tumorprogression und Resistenz beschreiben sind daher passend zu dem Ergebnis dieser Arbeit. Dass allerdings INHBA, also vor allem auch Activin A, gleichzeitig mit FST, dessen hormoneller Gegenspieler, heraufreguliert ist, wirkt zunächst widersprüchlich. Tatsächlich unterstreichen einige Arbeiten den „Gegenspieler-Charakter“ von FST und INHBA in malignen Neoplasien (*Seder et al. 2009, Chen et al. 2014*). In der Literatur finden sich jedoch auch Beschreibungen einer simultanen vermehrten Expression: In einer genomweiten Expressions-Analyse, die „Treiber-Gene“ in gingivobuccalen Neoplasien identifizieren sollte, wurden ebenfalls sowohl INHBA als auch FST als Gene mit besonders hohem Expressions-Level beschrieben (*Ambatipudi et al. 2012*). Auch im Kontext der Wundheilung steigt das Follistatin-Level gleichzeitig mit dem Level an Inhibin beta A an (*Loomans & Andl 2015*). Nennenswert ist dabei, dass H. Dvorak, der Entdecker von VEGF, Krebs einst als „Wunde, die nicht heilt“ („the wound that does not heal“ – *NEJM 1986*) beschrieb. Zusammenfassend scheinen die Funktionen und Effekte von INHBA und FST insgesamt in besonderem Maße abhängig von Kontext und Zelltyp zu sein (*Loomans & Andl 2015*).

Es konnte außerdem im Kontext dieser Arbeit durch einen INHBA- bzw. FST-Knockdown keine Resensitivierung der RITA-toleranten Zellen erreicht werden, sodass die Bedeutung der hier gefundenen Überexpression dieser beiden Gene letztendlich unklar bleibt.

## 4.3 Methodik: Herausforderung Hochdurchsatzverfahren

### 4.3.1 Etablierung des siRNA-Screens – RNAi im Hochdurchsatzverfahren

Die RNA-Interferenz im Hochdurchsatzverfahren bietet die Möglichkeit in großem Umfang genetische „Loss-of-Function-Versuche“ in Zellkultur durchzuführen und wurde daher in diesem Kontext ausgewählt, um den Knockdown-Effekt aller bekannter Gene der DNA-Schadens-Antwort auf die RITA-toleranten Zellklone zu testen.

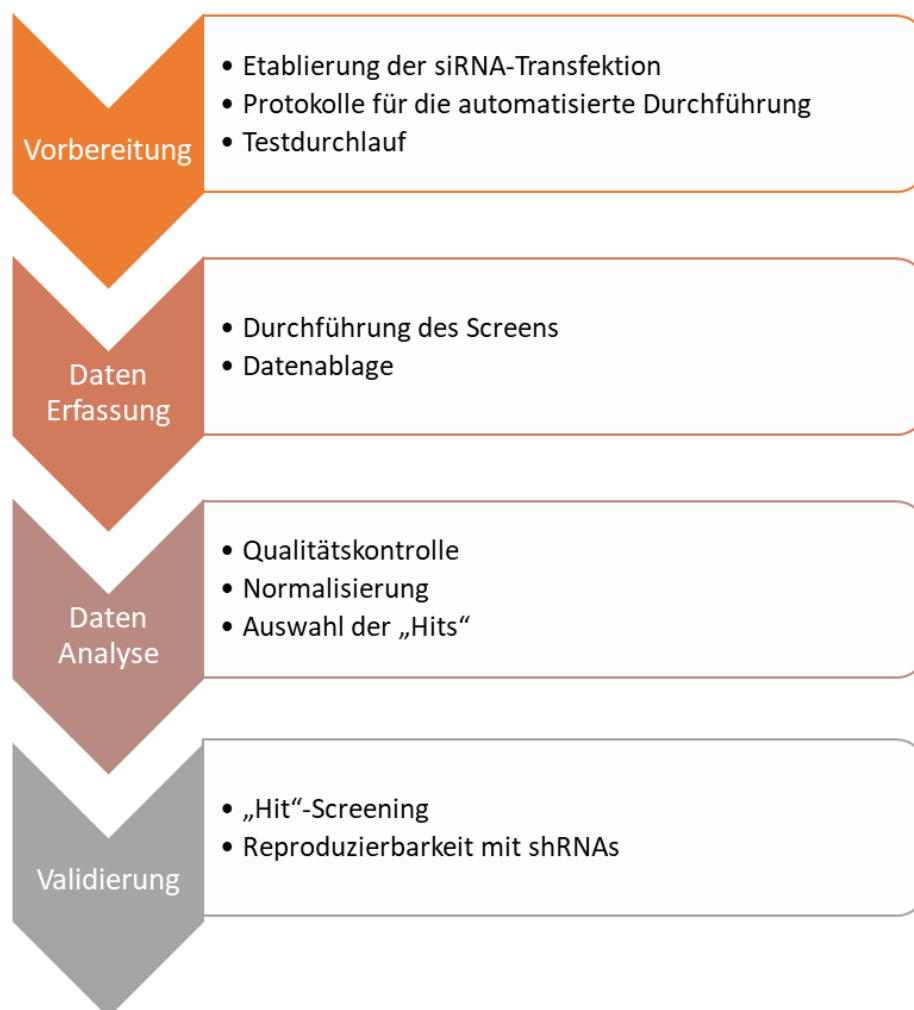


Abbildung 4.1 Ablaufschema des siRNA-Screens.

Es wurde eine Bibliothek synthetischer siRNAs bestehend aus Pools aus 4 siRNAs gerichtet gegen 407 Zielgene verwendet. Als Ergebnismessung wurde das

Zellüberleben mittels Celltiter Glow Assay ausgewertet. Dieser Ansatz zeichnet sich durch einen geradlinigen, unkomplizierten Aufbau aus. Nichtsdestotrotz erfordert ein aussagekräftiger siRNA-Screen ein großes Maß an Planung, Automatisierung und adäquater Auswertung. Durch das vorherige Erstellen von Standard-Durchführungs-Protokollen und dem Pipettieren mit Hilfe des Pipettier-Roboters konnte ein hohes Maß an Automatisierung und so auch Reproduzierbarkeit erreicht werden (Abbildung 4.1). Um Randeffekte zu vermeiden, wurden die äußeren beiden Reihen der 96-Well Platten nicht zur Messung verwendet und hier alleinig Zellsuspension pipettiert. Als Qualitätsindikator wurde der Z'-Faktor verwendet, welcher sowohl in der Optimierungsphase als auch während des Screens zur Performance-Überprüfung Verwendung fand. Dieser ist in diesem Kontext etabliert und wird häufig verwendet (*Birmingham et al. 2009*). Die Z'-Faktoren der ausgewerteten Assays lagen immer über 0.5, was eine sehr gute Qualität anzeigt. Allerdings wurde mit PLK eine relativ starke Positiv-Kontrolle ausgewählt, wodurch generell auch relativ hohe Z'-Werte generiert werden (*Birmingham et al. 2009*). Insgesamt kann man aber auf Grund der guten Z'-Faktoren und genauen Screen-Etablierung von einem gelungenen Screen ausgehen. Um dennoch die Verlässlichkeit dieses experimentellen Ansatzes zu testen, wurde der Screen in fünf Replikaten durchgeführt. Auch konnte man so einen misslungenen Assay auf Grund des niedrigeren Z'-Faktors identifizieren und daher von der Auswertung ausschließen. Um das große Datenvolumen adäquat zu handhaben, wurde ein statistisches Analyseprogramm für RNA-Screens verwendet und mit Hilfe des Bioinformatikers der Arbeitsgruppe (Lukas Rycak) ausgewertet. Eine Normalisierung wurde zunächst pro Platte auf die Negativ-Kontrolle durchgeführt, was eine Vergleichbarkeit der generierten Daten über den gesamten Screen gewährleistet. Außerdem wurde aus den vier verwendeten Replikaten der Median für jedes Gen gebildet. Dann wurde der „robust z-Score“ erstellt. Im Vergleich zum z-Score ist der „robust z-Score“ weniger sensibel gegenüber Ausreißern, da er aus dem Median und der absoluten Standardabweichung vom Median kalkuliert wird. Der z-Score ist eine dimensionslose Größe und gibt das Überleben der Zellen jedes einzelnen Gens im

Vergleich zur Gesamtheit an. Damit inkorporiert er die generelle Verteilung aller Messungen und liefert damit akkuratere Ergebnisse, benutzt dabei allerdings auch die gemessenen Proben als de facto Negativ-Kontrollen (*Birmingham et al. 2009*).

Zur Hit-Identifikation wurde ein Grenzwert definiert als „Median minus dem Median der absoluten Standardabweichung“, was eine Auswahl von 57 potenziellen Hits ergab. Der Vorteil dieser Methode u.a. im Vergleich zur einfachen Standardabweichung ist die verbesserte Robustheit gegenüber Ausreißern sowie der Möglichkeit auch schwächere Hits identifizieren zu können bei weiterhin klarer Darstellung der starken Hits (*Birmingham et al. 2009*).

Das Screening der sieben weiteren Gene, die im ursprünglichen Screen nicht vorhanden waren, wurde mit denselben Materialien und der gleichen Methodik und Protokollen, wie der große Screen durchgeführt. Auf Grund der nachträglichen Anfertigung wäre es fehlerbehaftet gewesen, zu versuchen die Daten in den großen Screen zu inkorporieren, sodass das Ergebnis dieser sieben Gene separiert betrachtet wurde. Da bei sieben Genen jedes Gen einzeln ausgewertet werden konnte und keine Hit-Liste erstellt werden musste wurde auf eine z-Transformation verzichtet.

Nachdem 57 potenzielle Hits, deren Knockdown zum Absterben der RITA-toleranten Zellen führt, identifiziert werden konnten, müssen diese noch weiter validiert werden. Zunächst war von Interesse, welches dieser Gene nur in Zusammenhang mit einer Behandlung mit RITA zum Absterben der der toleranten Zellen führt und dessen Knockdown ohne RITA-Behandlung kaum Einfluss auf das Zellüberleben hat. Daher wurde der Knockdown-Effekt der Hits mit und ohne RITA-Behandlung verglichen. Leider zeigte sich dabei, dass der Knockdown aller ausgewählten Gene sowohl mit als auch ohne RITA einen letalen Effekt hat. Es handelt sich bei den ausgewählten Hits also um Gene, deren Funktion essenziell für das (Tumor)Zellüberleben ist. In der Liste befinden sich zum Beispiel PLK, welches auch als Positiv-Kontrolle auf Grund seines bekannten letalen Effektes verwendet wurde.

Letztendlich zeigt das Ergebnis jedoch, dass die Etablierung und Durchführung des Screens prinzipiell erfolgreich waren, auch wenn hier kein „Hit-Gen“ identifiziert werden konnte, welches das Potenzial hat die RITA-Toleranz zu überwinden.

Da es sich bei dem Nachtrag-Screen nur um sieben Gene handelte wurde er sofort mit und ohne RITA durchgeführt. Dabei wurde RAD18 als potenzieller Hit detektiert. In der Kombination RAD18-Knockdown plus RITA-Behandlung ist das Zellüberleben deutlich reduziert, während bei einem RAD18-Knockdown ohne RITA-Behandlung erheblich mehr Zellen überleben. Um falsch positive Hits durch off-target-Effekte der siRNAs auszuschließen ist eine weitere Validierung von Nöten. Off-target-Effekte entstehen durch ungezielte Interaktionen zwischen der siRNA und anderen Strukturen als dem gewünschten Ziel-Gen. Eine einfache Lösung ist dabei die Testung von Redundanz. Man verwendet mehrere verschiedene siRNAs gegen dasselbe Gen und überprüft so das Ergebnis. Im Fall dieser Arbeit wurde dieses Ergebnis zum einen durch die Verwendung verschiedener siRNAs, die für unterschiedliche Regionen auf dem Rad18-Gens codieren, überprüft; zum anderen wurde der Effekt auch mit Hilfe von sh-RNAs untersucht und nachgewiesen. Als Endpunkt-Parameter wurde neben dem Celltiter-Glow-Assay als Messungs-Endpunkt auch der Koloniebildungstest genutzt. Mit beiden Techniken konnte der Effekt nachgewiesen werden. Auffällig hierbei ist jedoch, dass die durch einen RAD18-Knockdown erzielte Resensitivierung gegenüber RITA im Koloniebildungstest insgesamt deutlicher zu sehen ist. Bei der Messung des Zellüberlebens mittels Celltiter-Glow-Assay fiel der Effekt des RAD18 Knockdowns auf das Zellüberleben teilweise schwächer aus. Auch wenn der Koloniebildungstest mit seiner ersten Beschreibung in 1956 gemessen am Fortschritt der Biotechnologie eine fast schon antike Technik darstellt, ist sie dennoch eine Standard-Methode um das Zellüberleben nach zytotoxischen Behandlungen darzustellen. Der Koloniebildungstest ist unabhängig von der Art der Einleitung des Zelltodes oder anderen intrazellulären Vorgängen und stellt Auswirkungen von Agenzien oder Therapien auf die Proliferation und reproduktiven Fähigkeiten der Zellen differenziert dar. Insbesondere zeigt er weniger eine Momentaufnahme zu einem

gewählten Messzeitpunkt, sondern eher einen Langzeiteffekt (*Katz et al. 2008*). Die Auswertung mittels Celltiter-Glow-Assay nach drei Tagen ist daher möglicherweise ein eher früher Messzeitpunkt und gibt nur eine erste Tendenz an. G. Selivanova (*2010*) beschrieb, dass generell die Dauer bis zum tatsächlichen Zelltod nach Behandlung mit zytotoxischen Agenzien in verschiedenen Zelllinien sehr unterschiedlich sein kann. Weiterhin vermuten de Lange et al. (*2012*), dass der Zellzyklus-Status der Tumorzellen bei RITA-Behandlung eine Rolle spielt. Unter anderem zeigen Zellen unter Serum-Entzug eine reduzierte Sensitivität gegenüber RITA, was nahelegt, dass sich replizierende Zellen besonders anfällig für die Einleitung von RITA-induzierter Apoptose sind. In diesem Zusammenhang kann auch diskutiert werden, ob im eigentlichen Screen noch weitere Gene, die im Celltiter-Glow-Assay einen etwas schwächeren Effekt knapp unterhalb des Grenzwertes zeigten, potenzielle Hits sein könnten.

Ein Beispiel hierfür ist FANCD2, dessen Funktion essenziell für die Aufrechterhaltung der RITA-Toleranz der H460<sub>T</sub> ist (*Wanzel et al. 2016*) und dessen Rolle und mögliches Zusammenspiel mit RAD18 bereits oben erläutert wurde. FANCD2 wurde ebenfalls im Screen zusammen mit RAD18 getestet, jedoch nicht als „Hit“ identifiziert. Generell ist es wichtig darauf zu verweisen, dass es in den Hochdurchsatzverfahren schwierig ist eine Aussage über die „Nicht-Hits“ treffen. Nach der Auswertung erhält man zwar Gene, die potenziell von Interesse sind. Man kann daraus aber nicht schließen, dass alle anderen Gene keinerlei Bedeutung haben. Eine weitere Schwäche dieses Ansatzes ist der Fokus auf die Identifizierung eines Gens. Eine Zelle agiert in komplexen Signalwegen und Interaktionen. Die Aktivierung bzw. der Knockdown eines einzelnen Genes mag für den vollen Effekt gegebenenfalls nicht ausreichend sein.

#### **4.3.2 Auswertung des Microarrays**

Um die Genexpression der RITA-toleranten Zellklone mit den parental H460-Zellen zu vergleichen wurde eine Mikroarray-Analyse durchgeführt. Ein Mikroarray ist ein potentes Werkzeug für genomweite Studien. Er liefert Daten in großem

Umfang und ist insbesondere für vergleichende Analysen der Gen-Expressions-Level von großem Nutzen. Die Menge der erhobenen Daten stellt aber auch große Anforderungen an die korrekte Auswertung und vor allem auch an die Interpretation der erhobenen Daten (*Schulze & Downward 2001*). Auch innerhalb von ursprünglich gleichen Proben können bei einer Mikroarray-Analyse Unterschiede detektiert werden. Es kann vermutet werden, dass bei Gewebespezifischen Genen eine natürliche Varianz von 20-30% möglich ist. Insbesondere die Expression vieler „Housekeeping“-Gene bewegt sich in weniger strengem Rahmen, sodass sogar Veränderungen bis ins Vierfache biologisch nicht von Bedeutung sein können (*King & Sinha 2001*). Um dieses Problem zu adressieren wurden in dem durchgeführten Mikroarray jeweils zwei Proben der parentalen sowie toleranten Zellen analysiert und miteinander verrechnet. Weiterhin wurden die durch den Array identifizierten, in den toleranten Zellen vermehrt exprimierten Gene per qPCR validiert.

Neben den generellen, biologischen Expressions-Varianzen hängt die Streuung der gemessenen Werte auch deutlich von der absoluten Intensität ab. Für die Quantifizierung der Expressions-Veränderung ist aber eine konstante Varianz innerhalb des gesamten Intervalls notwendig. Dies wurde mit einer LOESS-Normalisierung erreicht. Weiterhin wurde der logFC der einzelnen Gene zur Erstellung einer Rangliste berechnet. Nach *Dalman et al (2012)* ist der T-Test für große Assays (> 15 000 Gene) weniger geeignet. Mit Hilfe des Fold Change lässt sich zu einer akkurateren Einschätzung der tatsächlich differenziell exprimierten Gene kommen. Nichtsdestotrotz bleibt das Problem, was tatsächlich eine bedeutsame Veränderung ist, also wo der Cut-off-Wert gewählt werden sollte, bestehen. Die in der Literatur beschriebenen Cut-off-Werte bewegen sich überwiegend zwischen 1.5 und 4 (*Chen et al. 2007, Dalman et al. 2012, McCarthy & Smyth 2009*). Im vorliegenden Fall wurde mit einem Wert von 3 ein relativ hoher Cut-off gewählt, womit sich die erzeugte „Hitliste“ auf <100 Gene beschränkt. Hier werden die am drastischsten verändert exprimierten Gene dargestellt; subtilere Veränderungen werden aber nicht erfasst.



Insgesamt kann man mit verschiedenen Auswertungsstrategien zu sehr unterschiedlichen Auswertungen einer Mikroarray-Analyse kommen (*Dalman et al. 2012*). Daher ist die Verwertung der Array-Daten mit der hier beschriebenen Auswertung noch nicht ausgeschöpft. Neben der Sichtung der in den toleranten Zellen herunterregulierten Gene, können in Zukunft noch verschiedene weitere statistische Analysen (z.B. eine GSEA – Gene Set Enrichment Analysis, Veränderung des Cut-off-Wertes) durchgeführt werden.

#### **4.4 Die RITA-toleranten Zellen als DTPs (drug tolerant persisters)**

In der vorliegenden Arbeit wurden NSCLC-Zellen, die gegenüber dem kleinmolekularen Wirkstoff und potentiellen Krebsmedikament RITA eine Toleranz zeigen, mit Hilfe von Hochdurchsatzverfahren untersucht. Ziel war es die Toleranz zu überwinden und so Hinweise auf den zu Grunde liegenden Mechanismus zu erhalten. Es gelang die Etablierung eines siRNA-Screens mit Testung von 407 verschiedenen Genen der DNA-Schadensantwort mit der Identifizierung und Validierung von RAD18, durch dessen Knockdown eine Resensitivierung der toleranten Zellen gegenüber RITA gelingt. Dieses Ergebnis zeigt, dass es sich um einen nicht-mutationsbedingten und reversiblen Toleranzmechanismus handelt. RAD18 spielt in der Resensitivierung der toleranten Zellen am ehesten in seiner TLS-unabhängigen Funktion im Bereich der Kommunikation mit dem FA-Signalweg und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen eine Rolle. Die Toleranz der Tumorzellen gegenüber RITA, das zunächst als p53-WT-Reaktivator gehandelt wurde, jedoch unlängst vielmehr als DNA-Vernetzer beschrieben wird (*Wanzel et al. 2016*), involviert somit passend dazu Veränderungen im Bereich der zellulären DNA-Schadensantwort.

Weiterhin wurden mittels eines DNA-Microarrays in den toleranten Zellen vermehrt exprimierte Gene analysiert. Im Speziellen konnte hier neben den in den Vorarbeiten gezeigten Charakteristika wie Sphärenbildung oder der Anreicherung von CD133+ Zellen (*Wanzel et al. 2016*) mit der deutlich verstärkten SOX2-

Expression ein weiteres Stammzellmerkmal für die RITA-toleranten Zellen etabliert werden.

Bei den RITA-toleranten Zellen handelt es sich also um NSCLC-Tumorzellen, die durch veränderte, potenziell überwindbare, intrazelluläre Regulationsmechanismen eine verringerte Sensitivität gegenüber einer RITA-Behandlung sowie zusätzlich Stammzellcharakteristika zeigen. Dieses Ergebnis stützt die Hypothese, dass es sich bei den RITA-toleranten (H460<sub>T</sub>-)Zellen um DTPs handelt; eine Subpopulation von Tumorzellen, die zunächst durch *Sharma et al. 2010* beschrieben und benannt wurde und eine vermehrte, jedoch potenziell reversible Toleranz gegenüber Tumortherapie sowie auch Tumorstammzell-Eigenschaften zeigt. DTPs bzw. Zellen ähnlicher Natur konnten mittlerweile in vielen unterschiedlichen Neoplasien nachgewiesen werden (aufgelistet durch *Cabanos & Hata 2021*). *Cabanos & Hata (2021)* beschreiben außerdem, dass der Begriff DTP (oder auch „persister“) zwar keine exakte tumorbiologische Definition hat oder absolute Trennschärfe besitzt, fassen jedoch letztendlich folgende Charakteristika für diese meist nach *Sharma et al. (2010)* als DTPs bezeichnete, mittlerweile vielfach nachgewiesene, mit Resistenzen vergesellschaftete Art von Tumorzellen zusammen: Es handelt sich um ruhende Zellen („slow cycling“), die sich durch eine Toleranz gegenüber Krebsmedikamenten bzw. -behandlungen auszeichnen und Apoptose umgehen können. Sie zeigen außerdem in variablem Maße Stammzeileigenschaften. Grundlegend dabei ist, dass sich es um einen transienten Zustand der Zellen handelt, der somit prinzipiell reversibel ist.

Im klinischen Kontext werden DTPs daher unter anderem als Korrelat zu einer minimalen Resterkrankung („Minimal residual disease“ – MRD) gesehen; wenige Zellen, die die initiale Therapie (bei sonst überwiegend gutem Ansprechen) überleben und Rezidive verursachen (*Cabanos & Hata 2021*).

Hier besteht klinischerseits also ein großer Handlungsbedarf und ein großes Interesse an weiteren Erkenntnissen über DTPs bezüglich ihrer Eigenschaften und ihrer Rolle in Bezug auf Resistenzen oder MRD.

## 4.5 Ausblick und Fragen

Auch wenn das Konzept von DTPs mittlerweile etabliert ist (*Cabanos & Hata 2021, Sharma et al. 2010*) bleiben noch Fragen ungeklärt und bieten noch großes Forschungspotenzial.

Unklar bleibt Frage nach der genauen Herkunft der DTPs (und auch der vorliegenden H460<sub>T</sub>-Zellen). Es werden in der Literatur überwiegend zwei Modelle diskutiert (*Cabanos & Hata 2021*): Handelt es sich um innerhalb der Tumorpopulation bereits präexistente resistente Zellen, die unter Behandlung selektiv überleben (Darwinistisches Modell) oder werden die toleranten Zellen erst durch die Behandlung generiert (Klonale Evolution)?

Daneben bleibt auch die Frage der Überschneidung oder sogar eventuellen Deckungsgleichheit von DTPs und Tumorstammzellen noch offen. DTPs werden zunächst als eine gering proliferierende/ruhende, gegenüber Tumorthherapie resistente Gruppe von Zellen, die einige Eigenschaften mit Tumorstammzellen teilen, beschrieben (*Cabanos & Hata 2021*). Wie in 4.2.1 beschrieben wurden in der Literatur bereits NSCLC-Zellen mit ähnlichen Eigenschaften zu den H460<sub>T</sub>-Zellen beschrieben (Cisplatin-Resistenz, Sphärenbildung, CD133-Positivität, vermehrte SOX2-Expression), die von den Autoren als Tumorstammzellen eingeordnet wurden. Handelt es sich bei DTPs (und den H460<sub>T</sub>-Zellen) somit eventuell „einfach“ um Tumorstammzellen? Wo ist die Abgrenzung zwischen DTPs und Tumorstammzellen? Oder wenn es Unterschiede gibt, welche Bedeutung haben die Tumorstammzeleigenschaften letztendlich für die DTPs?

Schlussendlich bleibt auch die Frage nach der klinischen Anwendung noch offen.

Mit RAD18 konnte hier prinzipiell ein potenzielles Angriffsziel zur Überwindung von Therapieresistenzen gegenüber DNA-Vernetzern und zur Anvisierung von DTPs gefunden werden, welches jedoch auf seine weitere Bedeutung und eventuell auf seine mögliche Angreifbarkeit hin noch weiter untersucht werden muss.

Wie in 4.1 diskutiert spielt die Überexpression von RAD18 in den H460<sub>T</sub>-Zellen in seiner Verbindung zum FA-Signalweg bzw. FancD2 eine Rolle. Nach Wanzel et al.

(2016) kann über die Regulation von FancD2 durch den mTor-Signalweg dessen Überexpression und folgend auch die RITA-Toleranz durch mTor-Inhibitoren überwunden werden. Hier bietet sich also ein möglicher Angriffspunkt von DTPs mit bereits klinisch angewandten Arzneistoffen (Everolimus, Temsirolimus und Sirolimus werden in der onkologischen Therapie und als Immunsuppressiva verwendet (*Ruß - ArzneimittelpocketPlus 2021*)).

Letztendlich stellen Therapieresistenzen sowie das Auftreten von Rezidiven weiterhin ein großes Problem in der Tumorthherapie dar, das noch weitere intensive Forschung (unter anderem auch zu DTPs und deren Angriffspunkten) erfordert.

Jedoch lässt der immense Fortschritt, den wir in den letzten Jahren und Jahrzehnten verzeichnen konnten (insbesondere wenn wir unsere derzeitigen Fragen und Problemfelder mit denen der Ärzte des zu Anfang erwähnten fiktiven, jedoch an eine reale Person angelehnten Iwan Iljitsch (*Tolstoi 1886*) vergleichen), auf viele spannende, innovative und wegweisende Erkenntnisse in den kommenden Jahren und Jahrzehnten schließen, sodass das letztendliche Ziel einer effektiven und nachhaltigen/resistenzfreien „Krebstherapie“ immer näher rückt.

## 5 LITERATURVERZEICHNIS

AWMF: *S3-Leitlinie Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms*. Langversion 1.0 (2018) AWMF-Registernummer: 020/007OL

Ambatipudi S, Gerstung M, Pandey M, Samant T, Patil A, Kane S, Desai RS, Schäffer AA, Beerenwinkel N, Mahimkar MB: *Genome-wide expression and copy number analysis identifies driver genes in gingivobuccal cancers*. *Genes Chromosomes Cancer* (2012) 51(2):161-173

Aylon Y, Oren M: *New plays in the p53 theater*. *Current Opinion in Genetics & Development* (2011) 21(1):86-92

Bao S, Wu Q, McLendon R, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN: *Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response*. *Nature* (2006) 444:756-760

Bareiss P, Paczulla A, Wang H, Schairer R, Wiehr S, Kohlhofer U, Rothfuss O, Fischer A, Perner S, Staebler A, Wallwiener D, Fend F, Fehm T, Pichler B, Kanz L, Quintanilla-Martinez L, Schulze-Osthoff K, Essmann F, Lengerke C: *SOX2 Expression Associates with Stem Cell State in Human Ovarian Carcinoma*. *Cancer Research* (2013) 73:5544-5555

Barkley LR, Palle K, Durando M, Day TA, Gurkar A, Kakusho N, Li J, Masai H, Vaziri C: *c-Jun N-terminal kinase-mediated Rad18 phosphorylation facilitates Pol $\eta$  recruitment to stalled replication forks*. *Molecular Biology of the Cell* (2012) 23(10):1943-1954

Birmingham A, Selfors LM, Forster T, Wrobel D, Kennedy CJ, Shanks E, Santoyo-Lopez J, Dunican DJ, Long A, Kelleher D, Smith Q, Beijersbergen RL, Ghazal P, Shamu CE: *Statistical methods for analysis of highthroughput RNA interference screens*. *Nature Methods* (2009) 6(8):569-575

Blume-Jensen P, Hunter T: *Review article: Oncogenic kinase signaling*. *Nature* (2001) 411:355-365

Bykov VJN, Issaeva N, Selivanova G, Wiman KG: *Mutant p53-dependent growth suppression distinguishes PRIMA-1 from known anticancer drugs: a statistical analysis of information in the National Cancer Institute database*. *Carcinogenesis* (2002) 23(12):2011-8

Cabanos HF & Hata AN: *Emerging Insights into Targeted Therapy-Tolerant Persister Cells in Cancer*. *Cancers* (2021) 13, 2666

Carney DN: *Establishment and Identification of Small Cell Lung Cancer Cell Lines Having Classic and Variant Features*. *Cancer Research* (1985) 45:2913-2923

Chen F, Ren P, Feng Y, Liu H, Sun Y, Liu Z, Ge J, Cui X: *Follistatin is a novel biomarker for lung adenocarcinoma in humans*. *PLoS One* (2014) e111398

- Chen JJ, Wang SJ, Tsai CA, Lin CJ: *Selection of differentially expressed genes in microarray data analysis*: The Pharmacogenomics Journal (2007) 7:212–220
- Chen Y, Wang Q, Lin S, Chang D, Chung J, Ying S: *Activin Signaling and Its Role in Regulation of Cell Proliferation, Apoptosis, and Carcinogenesis*. Experimental Biology and Medicine (2006) 231(5):534-544
- Chène P: *Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy*. Nature Review Cancer (2003) 3(2):102-109.
- Cseke LJ, Kirakosyan A, Kaufmann PB, Westfall MV: *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*. Third Edition (2003) CRC Press
- Dalman MR, Deeter A, Nimishakavi G, Duan Z: *Fold change and p-value cutoffs significantly alter microarray interpretations*. BMC Bioinformatics (2012) 13(2):11
- De Lange J, Verlaan-de Vrie M, Teeunisse AF, Jochemsen AG: *Chk2 mediates RITA-induced apoptosis*. Cell Death & Differentiation (2012) 19(6):980-989
- Dietel M, Supporp N, Zeitz M: *Harrisons Innere Medizin*. 18. veränderte Auflage (2012) ABW Wissenschaftsverlag
- Doggrell SA: *RITA – a small-molecule anticancer drug that targets p53*. Expert Opinion on Investigational Drugs (2005) 14(6):739-742
- Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM: *Expression profiling using cDNA microarrays nature genetics supplement*. Nature Genetics (1999) 21:10-14
- Dvorak HF: *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing*. New England Journal of Medicine (1986) 315(26):1650-1659
- Enge M, Bao W, Hedström E, Jackson SP, Moumen A, Selivanova G: *MDM2- dependent downregulation of p21 and hnRNP K provides a switch between apoptosis and growth arrest induced by pharmacologically activated p53*. Cancer Cell (2009) 15(3):171–183
- Filipowicz W: *RNAi: The Nuts and Bolts of the RISC Machine – Minireview*. Cell (2005) 122:17–20
- Fodde R, Smits R, Clevers H: *APC, Signal transduction and genetic instability in colorectal cancer*. Nature Reviews Cancer (2001) 1: 55-67
- Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C: *Clonogenic assay of cells in vitro*. Nature Protocols (2006) 1(5):2315-2319
- Groenendijk FH, Bernards R: *Drug resistance to targeted therapies: Déjà vu all over again*. Molecular Oncology (2014) 8. 1067-1083
- Hanahan D, Weinberg RA: *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell (2011) 144(5):646–674

Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, Goodell MA, Brenner MK: *A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells*. Proceedings of the National Academy of Science (2004) 101(39): 14228–14233

Holzapfel B, Wickert L: *Methoden und Anwendungsgebiete - Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)*. Biologie unserer Zeit (2007) 2:120-126

International Agency for Research on Cancer (IARC): *GLOBOCAN 2012: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*. Section of Cancer Surveillance (2014) IARC CancerBase No. 11

Issaeva N, Bozko P, Enge M, Protopopova M, Verhoef L: *Small molecule RITA binds to p53, blocks p53–MDM2 interaction and activates p53 function in tumors*. Nature Medicine (2004) 12:1321-1328

Jeong CH, Cho YY, Kim MO, Kim SH, Cho EJ, Lee SY, Jeon YJ, Lee KY, Yao K, Keum YS, Bode AM, Dong Z: *Phosphorylation of Sox2 cooperates in reprogramming to pluripotent stem cells*. Stem Cells (2010) 12:2141-2150

Jintong D, Bei L, Yingli F, Yanguo L, Yang W, Jisheng L, Wen Z, Xiuwen W: *Overexpression of Class III  $\beta$ -tubulin, Sox2, and nuclear Survivin is predictive of taxane resistance in patients with stage III ovarian epithelial cancer*. BMC Cancer (2015) 15:536

Katz D, Ito E, Lau KS, Mocanu JD, Bastianutto C, Schimmer AD, Liu F: *Increased efficiency for performing colony formation assays in 96-well plates: novel applications to combination therapies and high-throughput screening*. BioTechniques (2008) 44(2):9-14

Khoo KH, Verma CS, Lane DP: *Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy*. Nat Rev Drug Discov (2014) 13:217–236

Kim SH, Dass CR: *p53-targeted cancer pharmacotherapy: move towards small molecule compounds*. Journal of Pharmacy and Pharmacology (2011) 63: 603–610

King HC, Sinha AA Gene: *Expression Profile Analysis by DNA Microarrays: Promise and Pitfalls*. Journal of the American Medical Association (2001) 286(18):2280-2288

Knight P, Glister C: *Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary*. Reproduction (2001) 121:503–512

Levina V, Marrangoni AM, DeMarco R, Gorelik E, Lokshin AE: *Drug-selected human lung cancer stem cells: cytokine network, tumorigenic and metastatic properties*. PLoS One (2008) 3(8):e3077

Levine AJ, Oren M: *Timeline: The first 30 years of p53: growing ever more complex*. Nature Review Cancer (2009) 9:749-758

Li Y, Chen K, Li L, Li R, Zhang J, Ren W: *Overexpression of SOX2 is involved in paclitaxel resistance of ovarian cancer via the PI3K/Akt pathway*. Tumor Biology (2015) 36(12):9823-9828

- Li Y, Wang Z, Chen Y, Petersen RB, Zheng L, Kun H: *Salvation of the fallen angel: Reactivating mutant p53*. *British Journal of Pharmacology* (2019) 176:817-831
- Longley DB, Johnston PG: *Molecular mechanisms of drug resistance*. *The Journal of Pathology* (2005) 205: 275–292
- Loomans HA, Andl CD: *Intertwining of Activin A and TGF $\beta$  Signaling: Dual Roles in Cancer Progression and Cancer Cell Invasion*. *Cancers* (2015) 7:70-91
- Lowy DR, Willumsen BM: *Function and Regulation of Ras*. *Annual Review of Biochemistry* (1993) 62:851-91
- Lundholm L, Hååg P, Zong D, Juntti T, Mörk B, Lewensohn R, Viktorsson K: *Resistance to DNA-damaging treatment in non-small cell lung cancer tumor-initiating cells involves reduced DNA-PK/ATM activation and diminished cell cycle arrest*. *Cell Death & Differentiation* (2013) 4:e478
- Maugeri-Sacca M, Bartucci M, De Maria R: *DNA Damage Repair Pathways in Cancer Stem Cell*. *Molecular Cancer Therapeutics* (2012) 11(8):1627-1636
- McCarthy D, Smyth GK: *Testing significance relative to a fold-change threshold is a TREAT*. *Bioinformatics* (2009) 6:765–771
- McManus MT, Sharp PA: *Gene silencing in mammals by small interfering RNAs*. *Nature Review Genetics* (2002) 3(10):737-747
- Meek DW, Knippschild U: *Posttranslational Modification of MDM2*. *Molecular Cancer Research* (2004) 1(14):1017-1026
- Merkel O, Taylor N, Prutsch N, Staber PB, Moriggl R, Turner SD, Kenner L: *When the guardian sleeps: Reactivation of the p53 pathway in cancer*. *Mutation Research* 773 (2017) 1-13
- Moreno CS, Matyunina L, Dickerson EB, Schubert N, Bowen NJ, Logani S, Benigno BB, McDonald JF: *Evidence that p53-Mediated Cell-Cycle-Arrest Inhibits Chemotherapeutic Treatment of Ovarian Carcinomas*. *PLoS ONE* (2007) 2(5):e441
- Morris LGT & Chan TA: *Therapeutic Targeting of Tumor Suppressor Genes*. *Cancer* (2015) 121(9): 1357–1368
- Okano M, Yamamoto H, Ohkuma H, Kano Y, Kim H, Nishikawa S, Konno M, Kawamoto K, Haraguchi N, Takemasa I, Mizushima T, Ikeda M, Yokobori T, Mimori K, Sekimoto M, Doki Y, Mori M, Ishii H: *Significance of INHBA expression in human colorectal cancer*. *Oncology Reports* (2013) 30:2903-2908
- Onkopedia – DGHO: *Lungenkarzinom, nicht-kleinzellig (NSCLC)*. Onkopedia (2021) – letzter Zugriff 18.12.2022
- Oshima T, Yoshihara K, Aoyama T, Hasegawa S, Sato T, Yamamoto N, Akito N, Shiozawa M, Yoshikawa T, Numata K, Rino Y, Kunisaki C, Tanaka K, Akaike M, Imada T, Masuda M:



*Relation of INHBA gene expression to outcomes in gastric cancer after curative surgery.* Anticancer Research (2014) 34(5):2303-2309

Ouyang J, Yu W, Liu J, Zhang N, Florens L, Chen J, Liu H, Washburn M, Pei D, Xie T: *Cyclin-Dependent Kinase-Mediated Sox2 Phosphorylation Enhances the Ability of Sox2 to Establish the Pluripotent State.* Journal of Biology Chemistry (2015) 290(37):22782-22794

Park HK, Wang H, Zhang J, Datta S, Fei P: *Convergence of Rad6/Rad18 and Fanconi anemia tumor suppressor pathways upon DNA damage.* PLoS One (2010) 13;5(10):e13313

Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch F: *Eyes Wide Open: A Critical Review of Sphere-Formation as an Assay for Stem Cells.* Cell Stem Cell (2011) 8(5):486–498

Petersen I: *Morphologische und molekulare Diagnostik des Lungenkarzinoms.* Deutsches Ärzteblatt (2011) 108(31-32): 525-31

Pflaum J, Schlosser S, Müller M: *p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer.* Frontiers in Oncology (2014) 4:285

Ramos P, Bentires-Alj M: *Mechanism-based cancer therapy: resistance to therapy, therapy for resistance.* Oncogene (2015) 34, 3617–3626

Rieber N, Knapp B, Eils R, Kaderali L: *RNAither, an automated pipeline for the statistical analysis of high-throughput RNAi screens.* Bioinformatics Applications Note (2009) 25(5):678–679

Ruß A: *ArzneimittelpocketPlus 2021.* 17. Auflage Börm Bruckmeier Verlag

Saha MN, Qiu L, Chang H: *Targeting p53 by small molecules in hematological malignancies.* Journal of Hematology & Oncology (2013) 6:23

Sanz G, Singh M, Peugeot S, Selivanova G: *Inhibition of p53 inhibitors: progress, challenges and perspectives.* Journal of Molecular Cell Biology (2019) 11(7) 586-599

Sasatani M, Xu Y, Kawai H, Cao L, Tateishi S, Shimura T, Li J, Lizuka D, Noda A, Hamasaki K, Kusunoki Y, Kamiya K: *RAD18 Activates the G2/M Checkpoint through DNA Damage Signaling to Maintain Genome Integrity after Ionizing Radiation Exposure.* PLoS One (2015) 10(2):e0117845

Schatton T, Frank NY, Frank MH: *Identification and targeting of cancer stem cells.* Bioessays (2009) 31(10):1038–1049

Schulze A, Downward J: *Navigating gene expression using microarrays - a technology review.* Nature Cell Biology (2001) 3(8):190-195

Seder CW, Hartojo W, Lin L, Silvers AL, Wang Z, Thomas DG, Giordano TJ, Chen G, Chang AC, Orringer MB, Beer DG: *Upregulated INHBA expression may promote cell proliferation and is associated with poor survival in lung adenocarcinoma.* Neoplasia (2009) 11(4):388-396

Selivanova G: *Wild type p53 reactivation: from lab bench to clinic.* FEBS Letters (2014) 588(16):2628-2638

Selivanova G: *Therapeutic targeting of p53 by small molecules*. *Seminars in Cancer Biology* (2010) 20:46–56

Sepporta MV, Tumminello FM, Flandina C, Crescimanno M, Giammanco M, La Guardia M, di Majo D, Leto G: *Follistatin as potential therapeutic target in prostate cancer*. *Targeted Oncology* (2013) 8(4):215-223

Shadfan M, Lopez-Pajares V, Yuan Z: *MDM2 and MDMX: Alone and together in regulation of p53*. *Translational Cancer Research* (2012) 1(2): 88–89

Shangary S, Wang S: *Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy*. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (2009) 49:223-41

Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, McDermott U, Azizian N, Zou L, Fischbach MA, Wong KK, Brandstetter K, Wittner B, Ramaswamy S, Classon M, Settleman J: *A Chromatin-Mediated Reversible Drug-Tolerant State in Cancer Cell Subpopulations*. *Cell* (2010) 141(1):69–80

Sherr CJ: *Review: Principles of Tumor Suppression*. *Cell* (2004) 116:235–246

Smyth GK, Speed T: *Normalization of cDNA microarray data*. *Methods* (2003) 31:265-273

Song IY, Palle K, Gurkar A, Tateishi S, Kupfer GM, Vaziri C: *Rad18-mediated Translesion Synthesis of Bulky DNA Adducts Is Coupled to Activation of the Fanconi Anemia DNA Repair Pathway*. *Journal of Biological Chemistry* (2010) 285(41): 31525–31536

Steinbrink S, Horn T, Ingelfinger D, Fuchs F, Boutros M: *Screeningverfahren - RNA-Interferenz im Hochdurchsatz*. *BIOspektrum* (2007) Sonderheft zur Biotechnica 13:18-20

Surget S, Descamps G, Brosseau C, Normant V, Maïga S, Gomez-Bougie P, Gouy-Colin N, Godon C, Béné MC, Moreau P, Le Gouill S, Amiot M, Pellat-Deceunynck C: *RITA (Reactivating p53 and Inducing Tumor Apoptosis) is efficient against TP53 abnormal myeloma cells independently of the p53 pathway*. *BMC Cancer* (2014) 14:437

Tateishi S, Sakuraba Y, Masuyama S, Inoue H, Yamaizumi M: *Dysfunction of human Rad18 results in defective postreplication repair and hypersensitivity to multiple mutagens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2000) 97(14):7927–7932

Ting L, Juna H, Junjie C: *RAD18 lives a double life: Its implication in DNA double-strand break repair*. *DNA Repair* (2010) 9:1241–1248

Togashi Y, Kogita A, Sakamoto H, Hayashi H, Terashima M, de Velasco M, Sakai K, Fujita Y, Tomida S, Kitano M, Okuno K, Kudo M, Nishio K: *Activin signal promotes cancer progression and is involved in cachexia in a subset of pancreatic cancer*. *Cancer Letters* (2015) 356:819–827

Tolstoi L: *Der Tod des Iwan Iljitsch*. (1886) Reclam Taschenbuch Print 2013

Tulpule A & Bivona TG: *Acquired Resistance in Lung Cancer*. Annual Review of Cancer Biology (2020) 4:279–97

Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA: *In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2*. Science (2004) 303(5659): 844–848

Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, Newman J, Reczek EE, Weissleder R, Jacks T: *Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo*. Nature (2007) 445:661–665

Vogelstein B, Kinzler KW: *p53 function and dysfunction*. Cell (1992) 70:523–526

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ: *Surfing the p53 network*. Nature (2000) 408(6810):307-310

Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz Jr LA, Kinzler KW: *Cancer Genome Landscapes*. Science (2013) 339(6127): 1546–1558

Wanzel M, Vishedyk JB, Gittler M, Gremke N, Seiz JR, Hefter M, Noack M, Savai R, Mernberger M, Charles JP, Schneikert J, Bretz AC, Nist A, Stiewe T: *CRISPR-Cas9-based target validation for p53-reactivating model compounds*. Nature Chemical Biology 12, 22-28 (2016)

Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ, Bar-Sagi D: *Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53*. Nature Cell Biology (1999) 1:20–26

Weilbacher A, Gutekunst M, Oren M, Aulitzky WE, van der Kuip H: *RITA can induce cell death in p53-defective cells independently of p53 function via activation of JNK/SAPK and p38*. Cell Death Dis (2014) 5:e1318

Weinberg RA: *The Biology of Cancer*. Erstveröffentlichung (2007) Garland Science Publication

WHO Classification of Tumours Editorial Board: *WHO Classification of Tumours - Thoracic Tumours*. IARC Publications 5. Edition (2021)

Xie C, Wang H, Cheng H, Li J, Wang Z, Yue W: *RAD18 mediates resistance to ionizing radiation in human glioma cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications (2014) 445(1):263-8

Xin H, Lin W, Sumanasekera W, Zhang Y, Wu X, Wang Z: *The human RAD18 gene product interacts with HHR6A and HHR6B*. Nucleic Acids Research (2000) 28(14):2847-2854

Yang YH, Dudoit S, Luu P, Speed T  
*Normalization for cDNA microarray data*. SPIE BiOS 4266 (2001)

Yang Y, Yanzhe G, Anastasia Z, Satoshi T, Vyacheslav Y, Igor BR, Cyrus V: *Diverse roles of RAD18 and Y-family DNA polymerases in tumorigenesis*. Cell Cycle (2018) 17:833-843

Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG: *ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways.* Cell (1998) 20;92(6):725-34

Zhao CY, Grinkevich VV, Nikulenkov F, Bao W, Selivanova G: *Rescue of the apoptotic-inducing function of mutant p53 by small molecule RITA.* Cell Cycle (2010) 9:1847-1855

Zhao CY, Szekely L, Bao W, Selivanova G: *Rescue of p53 function by small-molecule RITA in cervical carcinoma by blocking E6-mediated degradation.* Cancer Research (2010) 70:3372–3381

Zhao H, Traganos F, Darzynkiewicz Z: *Phosphorylation of p53 on Ser15 during cell cycle caused by Topo I and Topo II inhibitors in relation to ATM and Chk2 activation.* Cell Cycle (2008) 7(19):3048-3055

## 6 ANHANG

### 6.1 Hitliste Microarray

Tabelle 6.1 Microarray H460 im Vergleich H460<sub>T</sub>

log<sub>2</sub>FC: H460 vs H460<sub>T</sub> ; Cut-off: 3 (gerundet). Es entsteht eine Liste mit 61 Positionen und insgesamt 29 unterschiedlichen Genen, die den in H460<sub>T</sub> am stärksten exprimierten Genen entsprechen.

Gen	log <sub>2</sub> FC
SOX2	7,14066664
KIAA1324L	5,54335546
PTGS2	5,12915143
PTGS2	4,99288218
PTGS2	4,96225057
PTGS2	4,95910561
PTGS2	4,94505272
PTGS2	4,89391453
PTGS2	4,88587043
PTGS2	4,69422958
PTGS2	4,6066791
PTGS2	4,54502739
SLITRK6	4,40261459
AREG	4,24174058
AREG	4,15856718
INHBA	3,95735054
AREG	3,91556578
FAM19A4	3,88151496
STRA6	3,88074412
INHBA	3,87105261
GDF15	3,83723781
GDF15	3,79181411
INHBA	3,78894964
IGFBP1	3,78828357
MPZL2	3,78132092
RNF43	3,77684051
INHBA	3,74176809
STRA6	3,73807311
INHBA	3,73467408
INHBA	3,72860987
INHBA	3,71958021
INHBA	3,67149696
INHBA	3,6609700
INHBA	3,6319802
ANO3	3,5746329
PDK4	3,48046391
TNS4	3,42958221
PDK4	3,37913467
RIMS1	3,35875483
MIG7	3,31733973
IGFBP1	3,30598222
PLAC4	3,29145406
ANTXR2	3,24482962
RAPGEF5	3,17693994

BMPER	3,0704792
DKK1	3,03927416
FHL2	3,03032789
DAZ2	3,02630103
MGLL	3,02235111
DAZ2	3,01141092
QPRT	3,00156301
C13orf15	2,9920625
C13orf15	2,97919563
FST	2,97483908
TPBG	2,97037454
FST	2,96912016
FST	2,96782039
FST	2,96566414
FST	2,95174819
FST	2,95076454
FST	2,95035018

## 6.2 Knockdown-Effizienzen siRNA

### 6.2.1 Knockdown Effizienz SOX2

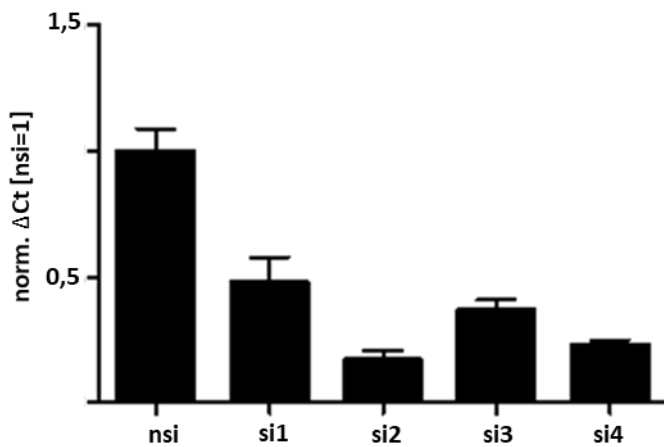


Abbildung 6.1 Knockdown Effizienz SOX2

RT-qPCR zur Analyse der mRNA Level -  $\Delta Ct$  normalisiert auf H460 ( $\Delta\Delta Ct$ ),  $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  - entsprechend der n-fachen Expression des Gens SOX2 nach siRNA-Transfektion mit einer non-spezifischen Kontrolle (nsi) sowie vier unterschiedlichen siRNA gegen SOX2 (si1 bis si4): Eine gute Reduktion der Genexpression konnte erreicht werden.

### 6.2.2 Knockdown Effizienz INHBA

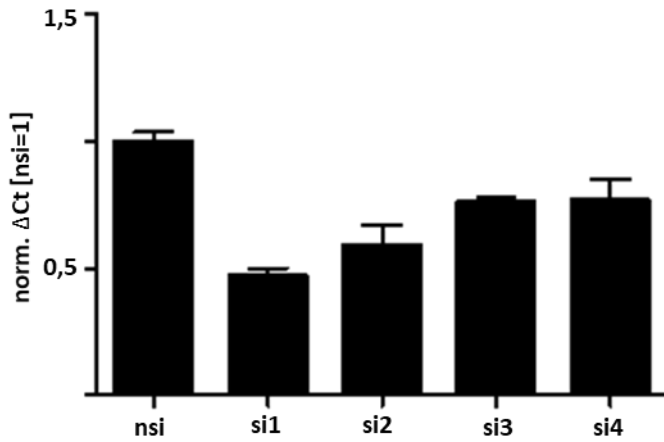


Abbildung 6.2 Knockdown Effizienz INHBA

RT-qPCR zur Analyse der mRNA Level -  $\Delta Ct$  normalisiert auf H460 ( $\Delta\Delta Ct$ ),  $\text{Ratio}=2^{-\Delta\Delta Ct}$  - entsprechend der n-fachen Expression des Gens INHBA nach siRNA-Transfektion mit einer non-spezifischen Kontrolle (nsi) sowie vier unterschiedlichen siRNA gegen INHBA (si1 bis si4): Eine mäßige Reduktion der Genexpression konnte erreicht werden.

### 6.2.3 Knockdown Effizienz FST

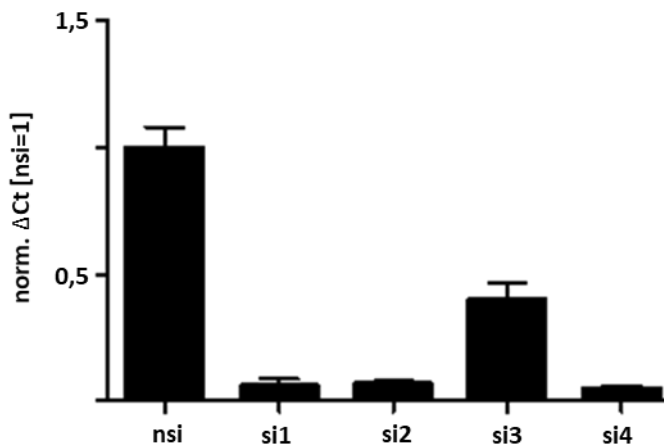


Abbildung 6.3 Knockdown Effizienz FST

RT-qPCR zur Analyse der mRNA Level -  $\Delta Ct$  normalisiert auf H460 ( $\Delta\Delta Ct$ ),  $\text{Ratio}=2^{-\Delta\Delta Ct}$  - entsprechend der n-fachen Expression des Gens FST nach siRNA-Transfektion mit einer non-spezifischen Kontrolle (nsi) sowie vier unterschiedlichen siRNA gegen FST (si1 bis si4): Eine gute Reduktion der Genexpression konnte erreicht werden.

## 6.2.4 Knockdown Effizienz RAD18

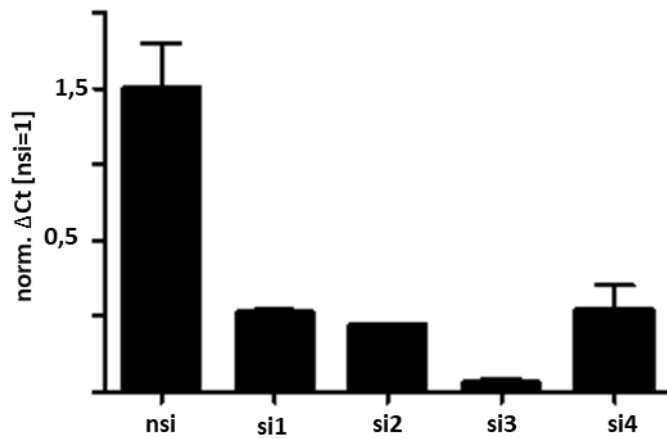


Abbildung 6.4 Knockdown Effizienz RAD18

RT-qPCR zur Analyse der mRNA Level -  $\Delta Ct$  normalisiert auf H460 ( $\Delta\Delta Ct$ ),  $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  - entsprechend der n-fachen Expression des Gens RAD18 nach siRNA-Transfektion mit einer non-spezifischen Kontrolle (nsi) sowie vier unterschiedlichen siRNA gegen RAD18 (si1 bis si4): Eine gute Reduktion der Genexpression konnte erreicht werden.

## 6.3 RAD18 Expression in H460<sub>T</sub>-Zellen

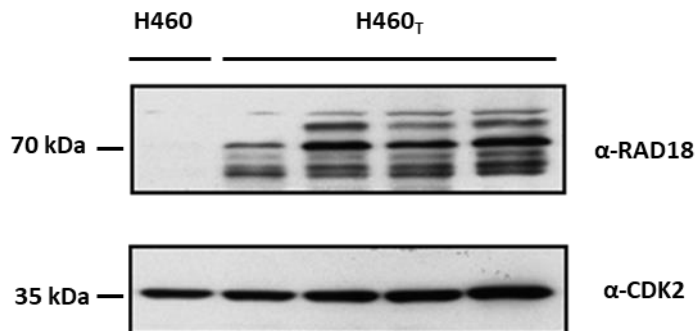


Abbildung 6.5 RAD18 Protein in H460- und H460<sub>T</sub>-Zellen Western Blot

Western Blot Darstellung des Rad18-Proteins in H460- und H460<sub>T</sub>-Zellen; Ladekontrolle CDK2. In H460<sub>T</sub> kommt deutlich mehr stabilisiertes Rad18-Protein als in H460 zur Darstellung (Referenz WB: PD Dr. Michael Wanzel).



## 6.4 Knockdown-Effizienzen shRNA

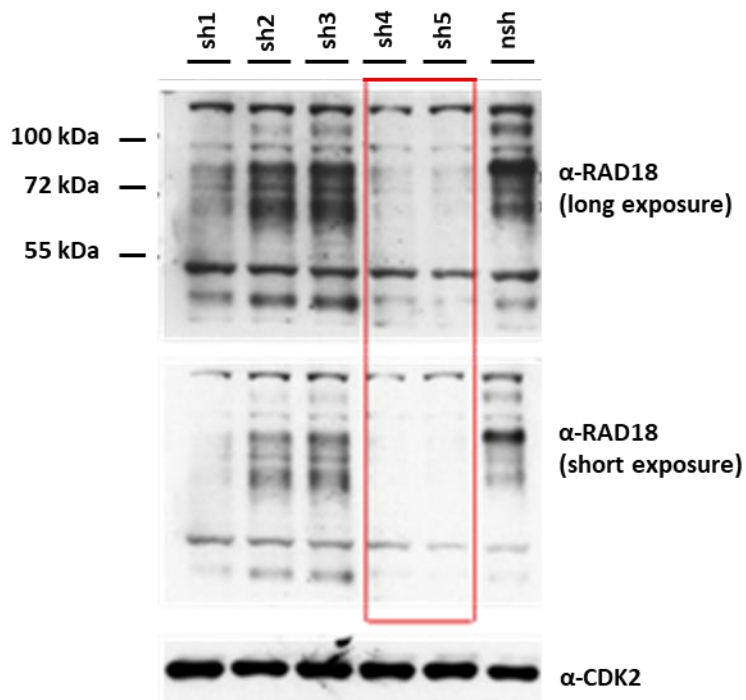


Abbildung 6.6 Knockdown Effizienz RAD18 shRNA

Western Blot Darstellung des Rad18-Proteins in mit shRNA gegen RAD18 (sh1 bis sh5) und einer nicht-spezifischen (Negativ)-Kontrolle (nsh) infizierten H460<sub>T</sub>-Zellen; Ladekontrolle CDK2. Rot umrandet sind sh4 und sh5, bei denen sich das beste Knockdown-Ergebnis zeigte: Auf Proteinebene konnte nahezu kein Genprodukt nachgewiesen werden, sodass diese Zellen für die weitere Analyse verwendet wurden (Referenz WB: PD Dr. Michael Wanzel).

## 7 VERZEICHNIS AKADEMISCHER LEHRER/ INNEN

Adamkiewicz, Aumüller, Bartsch, Basler, Baum, Baumann, Becker, Becker,  
Bette, Bösner, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Dietrich, Dinges, Donner-  
Banzhoff, Eilers, Ellenrieder, Engenhardt-Cabillic, Enke, Feuser, Frietsch, Fuchs-  
Winkelmann, Görg, Grundmann, Gress, Greulich, Grzeschik, Hegele, Heinis, Hertel,  
Hesse, Hofmann, Hoyer, Hundt, Kann, Kanngiesser, Kill, Klose, Knake, Kircher, Kolb-  
Niemann, Koolmann, König, Kühnert, Langer, Leonhardt, Leonhardt, Lill, Lohoff,  
Lüers, Luster, Maier, Maisch, Mahnken, Mandrek, Moll, Morin, Müller, Müller-  
Brüsselbach, Mutters, Nachtigall, Neubauer, Nimsky, Oertel, Pagenstecher, Reinke,  
Peterlein, Pfützner, Plant, Ramaswamy, Renz, Richter, Röhm, Ruchholtz, Sahmland,  
Schäfer, Schmidt, Schmidt, Schofer, Seitz, Seifart, Sekundo, Steiniger, Stiewe, Suske,  
Timmesfeld, Vogelmeier, Wagner, Waldegger, Weihe, Werner, Westermann,  
Wissner, Wulf

## 8 DANKSAGUNG

Ich möchte mich hiermit zu allererst bei Herrn Prof. Dr. med. Stiewe bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Herrn PD Dr. rer. nat. Wanzel danke ich ganz besonders für die Themastellung und die tolle Betreuung (sowohl die fachliche Anleitung als auch persönlich nette Gespräche und angenehme Laboratmosphäre). Dank gilt dabei auch der gesamten Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und Integration der Mediziner-Doktoranten. Dr. rer. nat. Anne Catherine Bretz danke ich sowohl für die Anleitung im Umgang mit dem Pipettier-Roboter, als auch allgemeine Hilfestellungen im Laboralltag und ein offenes Ohr für Fragen. Dr. rer. nat. Katharina Schlereth danke ich für die Hilfe mit der RT-qPCR.

Bei meinen Eltern und Großeltern bedanke ich mich für die uneingeschränkte Liebe und Unterstützung während meines Studiums, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Vielen, vielen lieben Dank an meine Freundinnen und Geschwister, die immer für mich da sind. Und ‚last but not least‘ einen großen Dank an Christian für die Unterstützung und Motivation in den letzten Zügen der Arbeit (ohne die ich das nicht mehr so einfach zu Ende gebracht hätte).

- MHN AK-1: „Bitte nennen Sie die Art des medizinischen Notfalls.“ -