

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und  
Kinderchirurgie  
der Universität Würzburg  
Direktor: Prof. Dr. med. C.-T. Germer

**Mitochondrien Targeting:  
Untersuchungen zum antiproliferativen Effekt des  
Antibiotikums Tigecyclin bei humanen kolorektalen  
Karzinomzelllinien**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Linda Löwer  
aus Hamburg

Würzburg, Juli 2018

**Referent:** Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto

**Korreferent:** Univ.-Prof. Dr. med. Ralf Bargou

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21.03.2019

Die Promovendin ist Ärztin

# INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Grundlagen der malignen Transformation .....	1
1.2	Aufbau, Funktion, Ursprung von Mitochondrien und ihre Bedeutung für die maligne Transformation .....	2
1.3	Der Energiestoffwechsel maligner Zellen.....	5
1.4	Antiproliferative Effekte von Antibiotika bei Tumorzellen .....	7
1.5	Ziele .....	8
<b>2</b>	<b>Fragen</b> .....	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>11</b>
3.1	Zelllinien und Zellkultur .....	11
3.2	Zellernte.....	12
3.3	Experimentelles Design .....	12
3.4	Kristallviolett-Assay.....	13
3.5	Bestimmung der Verdopplungszeit der Zelllinien.....	14
3.6	Stammlösungen.....	14
3.7	Bestimmung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration von Tigecyclin.....	14
3.8	Fluoreszenzmikroskopie .....	15
3.9	Western Blot .....	16
3.10	Auswertung und Statistik .....	18
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>19</b>
4.1	Charakterisierung der Zelllinien .....	19
4.2	Der antiproliferative Effekt von Tigecyclin.....	21
4.3	Der antiproliferative Effekt von Tigecyclin in Kombination mit 5-FU oder Oxaliplatin .....	25
4.4	Der antiproliferative Effekt von Tigecyclin in der Mehrtagekultur .....	27
4.5	Die Wirkung von Tigecyclin auf die Atmungskette .....	32
4.6	Untersuchungen zum Tigecyclin-induzierten Zelltod .....	35
<b>5</b>	<b>Beantwortung der Fragen</b> .....	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>38</b>
6.1	Zum antiproliferativen Effekt von Tigecyclin: Selektivität und pharmakologischer Synergismus.....	38
6.2	Zum antiproliferativen Effekt von Tigecyclin: Mitochondriale Proteinbiosynthese und Atmungskette .....	40
6.3	Zum antiproliferativen Effekt von Tigecyclin: Apoptose und Autophagie	43
6.4	Zum antiproliferativen Effekt von Tigecyclin: Beeinflussung proliferationsfördernder Signalwege .....	44
<b>7</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>46</b>

<b>8</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>47</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>48</b>
<b>10</b>	<b>Appendix .....</b>	<b>53</b>
<b>11</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>57</b>
<b>12</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>58</b>
	<b>Publikationsverzeichnis</b>	
	<b>Danksagung</b>	
	<b>Lebenslauf</b>	

# 1 EINLEITUNG

---

## 1.1 GRUNDLAGEN DER MALIGNEN TRANSFORMATION

Krebs ist das Ergebnis einer Vielzahl genetischer und epigenetischer Veränderungen, die im Erbgut der Zelle akkumulieren und das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und programmiertem Zelltod (Apoptose) in Richtung unkontrolliertes Zellwachstum verschieben (Weinberg RA, 2014). Insbesondere die an der Kontrolle von Zellwachstum, Zellteilung und Zelldifferenzierung beteiligten Gene können durch Mutation ein onkogenes Potential erhalten. Die eine unkontrollierte Zellproliferation fördernden Onkogene werden entweder verstärkt oder zur falschen Zeit exprimiert oder ihr Genprodukt ist aktiver als das Wildtyp-Protein. Andererseits können so genannte Tumorsuppressorgene durch Mutation ihre wichtige Funktion bei der Zellzyklus-Kontrolle verlieren, was ebenfalls zu unkontrollierter Zellproliferation führen kann. Onkogene fördern in Kombination mit deaktivierten Tumorsuppressorgenen ungebremstes Zellwachstum und führen zum endgültigen Verlust der Wachstumskontrolle und damit zur neoplastischen Transformation. Auslöser von Mutationen können zahlreiche physikalische, chemische und biologische Faktoren sein (Hanahan D et al., 2011; Weinberg RA, 2014).

Den mehrstufigen Prozess der spontanen kolorektalen Karzinogenese, ausgehend von einer gutartigen Vorläuferläsion der Dickdarm- oder Rektumschleimhaut, dem so genannten Adenom, zu einem invasiven Karzinom, haben Vogelstein und Fearon in der »Adenom-Karzinom-Sequenz« beschrieben (Fearon ER, Vogelstein B, 1990). Die Schlüsselmutation der Adenom-Karzinom-Sequenz ist im *APC*<sup>1</sup>-Gen lokalisiert, einem Tumorsuppressorgen, das die Proliferation des Epithels der Darmkrypten auf die Zellen des Kryptenbodens beschränkt (van de Wetering M et al., 2002). Bei einer Mutation des *APC*-Gens proliferieren die Epithelzellen der gesamten Darmkrypte. So entstehen zunächst

---

<sup>1</sup>Abkürzung für »Adenomatous polyposis coli«. Das APC-Protein ist Bestandteil des Wnt-Signalweges und an der negativen Regulation der zellulären Konzentration von  $\beta$ -Catenin beteiligt, das im Zellkern an den Transkriptionsfaktor TCF bindet und aktiviert. APC bildet mit anderen Proteinen einen Degradationskomplex für  $\beta$ -Catenin und stellt damit einen Regulator der Transkription dar.

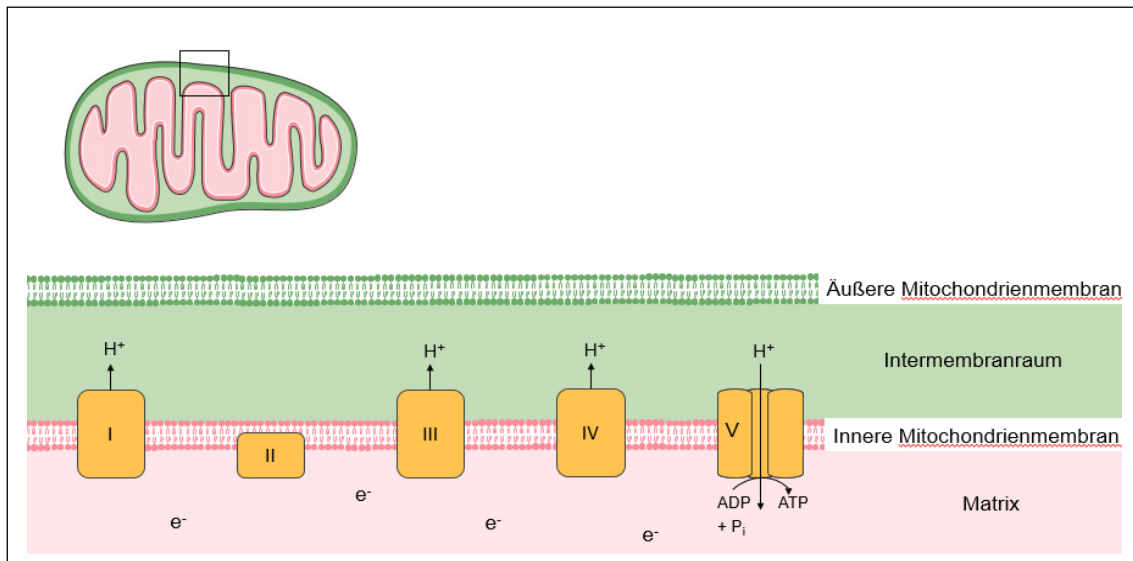
Verzweigungen, sogenannte Sprossen, die sich zu Adenomen weiterentwickeln. Am Übergang zum malignen Adenokarzinom sind das Protoonkogen *KRAS*<sup>2)</sup> und Mutationen im Tumorsuppressorgen *TP53* beteiligt (Fearon ER et al., 1990). Der mit ca. 60 % überwiegende Teil der kolorektalen Karzinome entwickelt sich über die Adenom-Karzinom-Sequenz (Tannapfel A et al., 2010).

## **1.2 AUFBAU, FUNKTION, URSPRUNG VON MITOCHONDRIEN UND IHRE BEDEUTUNG FÜR DIE MALIGNEN TRANSFORMATION**

Mitochondrien sind von einer Doppelmembran umgebene semiautonome Organellen, die als Kraftwerke der Zelle an ihrer Atmungskette Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) herstellen. Die Atmungskette, die in der inneren Mitochondrienmembran verankert ist, besteht aus fünf Proteinkomplexen, wobei die Elektronen durch die ersten vier Komplexe, die Redoxsysteme darstellen, fließen. Drei der vier Komplexe arbeiten zusätzlich als Protonenpumpen (Komplexe I, III, IV) und nutzen die Energie des Elektronenflusses, um Protonen durch die innere Mitochondrienmembran in den Intermembranraum zu transportieren (Abbildung 1.1). Die Ungleichverteilung von Protonen führt zum Aufbau eines pH-Gradienten und eines elektrischen Transmembranpotentials, dessen protonenmotorische Kraft die Synthese von ATP durch Komplex V (ATP-Synthase) ermöglicht (Rich PR et al., 2010). Diese Form der ATP-Bildung wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet im Ggs. zur Substratkettenphosphorylierung der Glykolyse. Ohne näher ins Detail zu gehen, beruht das Prinzip der oxidativen Phosphorylierung auf der Übertragung von Elektronen auf molekularen Sauerstoff. Chemisch handelt es sich hierbei um die so genannte Knallgasreaktion ( $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ ). Bei dieser starken exothermen Reaktion werden pro Mol gebildetes Wasser 285,6 kJ Energie frei. Die Zelle nutzt diese Reaktion unter strikt kontrollierten Bedingungen (»biologische Knallgasreaktion«).

---

<sup>2)</sup> Abkürzung für »Kirsten rat sarcoma« Virus. Hierbei handelt es sich um ein GTP-bindendes Protein, das für die Proliferation von Krebszellen von großer Bedeutung ist.



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette.** Über 3 der hier stark vereinfacht dargestellten 5 Komplexe der Atmungskette werden Protonen in den Intermembranraum transportiert, gleichzeitig bleiben Elektronen in der mitochondrialen Matrix zurück. Dies führt zur Bildung eines polarisierten Membranpotentials  $\Delta\psi$  an der inneren Mitochondrienmembran (elektrochemischer Potentialgradient). Der Protonengradient verfügt über ein ausreichend großes Potential, um die oxidative Phosphorylierung von ADP zu ATP durch die ATP-Synthase (Komplex V) zu ermöglichen. Eigener Entwurf nach Literaturangaben.

Neben der Bildung von ATP regulieren Mitochondrien auch den intrinsischen Weg zur Induktion von Apoptose (Hardwick JM et al., 2013; Xiong S et al., 2014). Hierbei nimmt das im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisierte Cytochrom c, das über Komplex III, der Cytochrom c-Reduktase, reduziert wird, eine Schlüsselrolle ein: Durch Apoptosesignale gelangt Cytochrom c in das Zytosol, wo es APAF-1 (*»apoptotic peptidase-activating factor 1«*) aktiviert (Green DR, 2005; Hardwick JM et al., 2013). Der Komplex aus Cytochrom c und aktivierten APAF-1-Molekülen wird auch als Apoptosom bezeichnet, das Procaspase 9 bindet und zu Caspase 9 aktiviert. Caspase 9 wiederum aktiviert die Apoptose auslösenden Effektorcaspasen 3 und 7 (Xiong S et al., 2014).

Nach der Endosymbiontenhypothese, einem Erklärungsmodell zur Entstehung der eukaryotischen Zelle, stammen die semiautonomen Mitochondrien (und Plastiden der Pflanzenzelle) von ehemals freilebenden Prokaryoten ab, die als einzige Zellorganellen über eine eigene Erbinformation verfügen (Andersson SGE et al., 1999; Emelyanov VV, 2001). Die mitochondriale DNA (mtDNA)

codiert für 22 tRNAs, zwei rRNAs (sie sind Teil der mitochondrialen Ribosomen) und für 13 der insgesamt 90 Proteine, die die Atmungskettenkomplexe<sup>3)</sup> bilden.

Zusätzlich zur eigenen Erbinformation verfügen Mitochondrien auch über eine eigene Proteinbiosynthese. Die mtDNA wird von der mitochondrialen RNA-Polymerase in mRNA transkribiert und die genetische Information an den mitochondrialen Ribosomen in eine Polypeptidkette translatiert (Skrtic M et al., 2011; Wallace DC, 2012; Kuzmenko AV et al., 2013). Mitochondriale Ribosomen unterscheiden sich von zytosolischen Ribosomen. So bestehen mitochondriale Ribosomen aus einer 28S-Untereinheit und einer 39S-Untereinheit, wohingegen zytosolische Ribosomen aus einer kleinen 40S-Untereinheit und einer großen 60S-Untereinheit bestehen; d. h. eukaryotische Ribosomen sind größer als mitochondriale Ribosomen. Mitochondriale Ribosomen weisen eine größere Ähnlichkeit mit prokaryotischen Ribosomen auf, die sich aus einer 30S-Untereinheit und einer 50S-Untereinheit zusammensetzen (Lamb R et al., 2015).

Inwieweit Mitochondrien an der Krebsentstehung beteiligt sind, ist weiterhin unzureichend verstanden und wird kontrovers diskutiert (Errichiello E et al., 2017). Die mtDNA transformierter Zellen weist zahlreiche Mutationen auf, die zu Veränderungen bei der mitochondrialen Proteinbiosynthese sowie an der Atmungskette führen (Polyak K et al., 1998; Abu-Amero KK et al., 2005). Noch ist nicht geklärt, ob Mutationen in der mtDNA die Entstehung von Krebs auslösen, oder Krebs die Mutationsrate in mtDNA erhöht (Errichiello E et al., 2017). Auch Proteine des Citratzyklus können in Krebszellen mutiert sein, obwohl diese Enzyme ausschließlich nukleär kodiert sind. Zusätzlich zu solchen funktionellen Mutationen in den Mitochondrien wurden bei zahlreichen Krebsarten auch Änderungen in der Anzahl der Mitochondrien («numerische Alterationen») beobachtet (Chandra D et al., 2011). Dass Krebszellen auf funktionelle Mitochondrien angewiesen sind, bestätigen Experimente mit transformierten Zellen, deren mtDNA mit Ethidiumbromid eliminiert wurde. Diese Zellen weisen

---

<sup>3)</sup> 7 der 45 Proteine für Komplex I; 1 der 11 Proteine für Komplex III; 3 der 13 Proteine für Komplex IV und 2 der 17 Proteine für Komplex V. Die Proteine von Komplex II sind nukleär kodiert, sodass dieser als einziger über keine mitochondrial kodierten Proteine verfügt (Wallace DC, 2012).



ein verringertes Zellwachstum, eine geringere Koloniebildung (als Maß der Malignität) und eine geringere Angehrate *in vivo* auf (Morais R et al., 1994; Cavalli LR et al., 1997; Magda D et al., 2008; Tan AS et al., 2015).

### 1.3 DER ENERGIESTOFFWECHSEL MALIGNER ZELLEN

Dass transformierte Zellen einen veränderten Stoffwechsel aufweisen, beschrieb bereits 1923 der deutsche Physiologe Otto Warburg (Warburg O et al., 1923). Er stellte fest, dass Tumoren auch in Gegenwart von Sauerstoff eine starke Bildung von Milchsäure<sup>4)</sup> aufweisen (der so genannte Warburg-Effekt), während in normalen Geweben die Bildung von Milchsäure durch Sauerstoff gehemmt wird (Pasteur-Effekt).

Voraussetzung für eine starke Laktatbildung stellt eine aktive Glykolyse dar. Bei diesem Stoffwechselweg, über den nahezu sämtliche biologische Systeme verfügen, handelt es sich um eine im Zytosol der Zelle lokalisierte mehrstufige Abfolge enzymatischer Reaktionen, bei der Glukose zu Pyruvat (teil)oxidiert wird und gleichzeitig ATP und Reduktionsäquivalente in Form von  $\text{NADH}+\text{H}^+$  gebildet werden. Da der Großteil der aus Glukose nutzbaren Energie sich noch im Pyruvat befindet, wird dieser Metabolit von der Zelle weiter verstoffwechselt. Während die Oxidation von Glukose zu Pyruvat ohne Sauerstoff auskommt, ist für die weitere Oxidation von Pyruvat im Citratzyklus, der ebenfalls in den Mitochondrien lokalisiert ist, Sauerstoff erforderlich. Hierzu wird Pyruvat bzw. Acetyl-CoA zuerst zu Kohlendioxid oxidiert und die freiwerdenden Elektronen auf Reduktionsäquivalente ( $\text{NADH}+\text{H}^+$  und  $\text{FADH}_2$ ) übertragen. Diese und die in der Glykolyse gebildeten Reduktionsäquivalente übergeben ihre Elektronen an die Atmungskette, die ihrerseits diese stufenweise auf molekularen Sauerstoff überträgt (Kapitel 1.2). Durch diese oxidative Phosphorylierung werden ca. 30 Moleküle ATP pro Molekül Glukose gebildet. Das ist 15mal mehr ATP als in der Glykolyse durch Teiloxidation von Glukose gewonnen wird. Steht molekularer Sauerstoff als Akzeptor für Elektronen aus der Atmungskette (Kapitel 1.2) nicht zur

---

<sup>4)</sup> Bei den in der Zelle vorherrschenden physiologischen Bedingungen liegt Milchsäure zum größten Teil in Form ihres Anions, dem Laktat, vor.

Verfügung, ist die Zelle gezwungen, um eine Blockade der Glykolyse zu verhindern, die anfallenden Reduktionsäquivalente aus der Glykolyse auf andere Weise zu reoxidieren. Hierzu verbleibt Pyruvat im Zytosol und wird selbst zum Akzeptor für die Elektronen von  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . Dabei wird Pyruvat zu Laktat reduziert und reoxidiertes  $\text{NAD}^+$  kann als Elektronenakzeptor erneut in der Glykolyse eingesetzt werden. Diese Reaktion wird von der Laktatdehydrogenase, die nicht Bestandteil der Glykolyse ist, katalysiert. Die bei soliden Tumoren häufig vorherrschende Unterversorgung mit Sauerstoff erfordert eine weitestgehend auf die Glykolyse beschränkte ATP-Produktion, die den Energiebedarf der Krebszelle sichern kann (Pelicano H et al., 2006; Vander Heiden MG et al., 2009; Locasale JW et al., 2011). Hierzu wird der Glukoseumsatz der Glykolyse erhöht (hyperaktive Glykolyse), was mit einer starken Laktatbildung einhergeht und als Anpassung an Sauerstoffmangel oder Hypoxie gesehen wird (Bailey KM et al., 2012).

Als Ursache für die starke Laktatbildung durch Tumoren nahm Otto Warburg eine »Schädigung« der Atmung an (Warburg O, 1956). Bereits seinerzeit rief diese Aussage Widerspruch hervor (Weinhouse S et al., 1956). Neuere Untersuchungen belegen, dass Tumoren über funktionelle Mitochondrien verfügen (Fantin VR et al., 2006; Weinberg F et al., 2009; Moreno-Sanchez R et al., FEBS J 2007), die sie in die Lage versetzen, Substrate wie Glutamin, Laktat und Ketonkörper oxidativ zu verstoffwechseln (Reitzer LJ et al., 1979; Deberardinis RJ et al., 2008; Bonuccelli G et al., 2010). So wurde bei Zellen der akuten myeloischen Leukämie ein erhöhter Sauerstoffverbrauch im Vergleich zu gesunden Zellen nachgewiesen, der auf eine erhöhte Aktivität der Atmungskette hindeutet (Skrtic M et al., 2011). Die Fähigkeit zur Oxidation zahlreicher Energieträger ändert aber nichts an der Tatsache, dass Tumoren häufig eine starke Abhängigkeit vom Energieträger Glukose zeigen. Das hängt u. a. mit der bereits erwähnten Tatsache zusammen, dass Glukose der einzige Energieträger ist, der auch in Hypoxie verstoffwechselt werden kann, was eine in soliden Tumoren häufig zu findende Situation darstellt (McKeown SR, 2014).

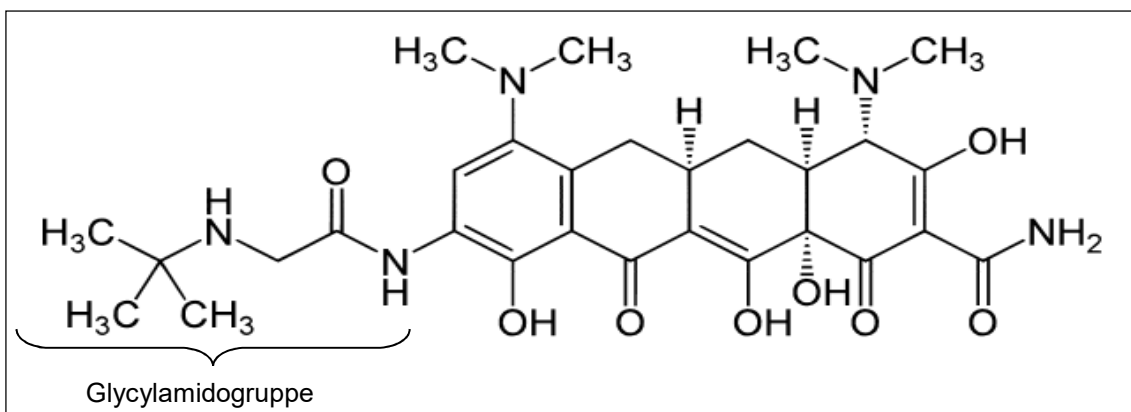
#### 1.4 ANTIPROLIFERATIVE EFFEKTE VON ANTIBIOTIKA BEI TUMORZELLEN

Nach der Endosymbiontenhypothese besteht Grund zu der Annahme, dass die zur Therapie bakterieller Infektionen eingesetzten Antibiotika, die die bakterielle Proteinbiosynthese durch Bindung an prokaryotische Ribosomen hemmen, auch mitochondriale Ribosomen aufgrund der Ähnlichkeit zwischen prokaryotischen und mitochondrialen Ribosomen schädigen können (Kapitel 1.2). So haben Skrtic et al. an Leukämiezellen zeigen können, dass das Antibiotikum Tigecyclin (Abbildung 1.2) an mitochondriale Ribosomen bindet (Skrtic M et al., 2011), damit das Andocken von tRNAs verhindert und die Translation zum Stillstand kommt (Bauer G et al., 2004; Olson MW et al., 2006). In den Mitochondrien von Tigecyclin behandelten Zelllinien wurde eine verminderte Enzymaktivität (Substratumsatz pro Zeit) der Atmungskettenkomplexe I und IV nachgewiesen (Skrtic M et al., 2011), zu deren Aufbau auch mitochondrial-kodierte Proteine beitragen (Kapitel 1.2). Im Gegensatz dazu war kein durch Tigecyclin verursachter Verlust der Enzymaktivität für Komplex II, der sich ausschließlich aus nukleär kodierten Proteinen zusammensetzt, nachzuweisen. Die Daten von Skrtic lassen somit einen Zusammenhang zwischen der Hemmung der mitochondrialen Proteinbiosynthese und einer eingeschränkten Enzymaktivität der Atmungskettenkomplexe I und IV, die den größten Anteil an mitochondrial kodierten Proteinen aufweisen (s. Fußnote 3), vermuten (Skrtic M et al., 2011).

Lamb et al. testeten als eine der Ersten erfolgreich den antiproliferativen Effekt von vier Antibiotika aus der Gruppe der Makrolide, Tetracycline, Glycylcycline und Chloramphenicol bei verschiedenen Tumor- und Krebsstammzellen (Lamb R et al., 2015). Besonders effektiv war dabei Tigecyclin, ein von der amerikanischen Food and Drug Administration zugelassenes Breitbandantibiotikum zur Behandlung von komplizierten Infektionen der Haut, Weichteile und des Abdomens, das einen antiproliferativen Effekt bei Zellen unterschiedlicher Tumorentitäten *in vitro* bzw. *in vivo* aufweist wie der akuten und chronischen myeloischen Leukämie (Skrtic M et al., 2011; Lu Z et al., 2017), beim Magenkarzinom (Tang C et al., 2014), Cervixkarzinom (Li H et al., 2015), Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (Ren A et al., 2015), Gliom (Yang R et al., 2016),

Neuroblastom (Zhong X et al., 2016), Melanom (Hu H et al., 2016), nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (Jia X et al., 2016), hepatozellulären Karzinom (Tan J et al., 2017) und Nierenzellkarzinom (Wang B et al., 2017). Auch synergistische Effekte mit Standardchemotherapeutika konnten für Tigecyclin gezeigt werden (Skrtic M et al., 2011; Li H et al., 2015; Fu X et al., 2017; Wang B et al., 2017).

Die für Antibiotika relevante Frage nach der Entwicklung von Resistenzen wurde für Tigecyclin ebenfalls an Tumorzellen untersucht. Für Zellen, die weniger als 30 Tage mit Tigecyclin behandelt wurden, konnte bisher keine Resistenzentwicklung beobachtet werden (Tang C et al., 2014; Hu H et al., 2016; Wang B et al., 2017) im Gegensatz zu Inkubationszeiten von 4 Monaten (Jhas B et al., 2013).



**Abbildung 1.2: Die Strukturformel für Tigecyclin.** Tigecyclin ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Glycylcycline, das bei Resistenzen gegenüber Tetrazyklinen eingesetzt wird. Glycylcycline verfügen im Gegensatz zu Tetrazyklinen über eine Glycyamidogruppe an Position 9 des D-Rings, mit der sie besonders fest an die kleine Untereinheit prokaryotischer Ribosomen binden. Strukturformel aus Wikipedia. Die Seite zu Tigecyclin wurde am 16.11.2017 aufgerufen.

## 1.5 ZIELE

Der bei unterschiedlichen Tumorentitäten nachgewiesene antiproliferative Effekt von Tigecyclin (Kapitel 1.4) lässt eine Überprüfung der Wirksamkeit vom Tigecyclin an Zellen des kolorektalen Karzinoms sinnvoll erscheinen, zumal für diesen Tumor noch keine Daten hierzu vorliegen. Deshalb wurde in dieser Arbeit der antiproliferative Effekt von Tigecyclin an den fünf humanen kolorektalen Karzinomzelllinien HCT116, Colo678, Colo741, LS174T und RKO untersucht.

Die Ergebnisse der Publikationen zu Tigecyclin lassen erkennen, dass der antiproliferative Effekt von Tigecyclin gegenüber transformierten Zellen deutlich ausgeprägter ist als bei normalen Zellen (Skrtic M et al., 2011; Jia X et al., 2016; Yang R et al., 2016; Fu X et al., 2017; Lu Z et al., 2017; Tan J et al., 2017). Der Grund für diese Selektivität wird in einer stärkeren Abhängigkeit maligner Zellen vom oxidativen Stoffwechsel gesehen, um ihre gesteigerte Zellproliferation zu erhalten. Dies scheint zumindest für Leukämiezellen gesichert (Skrtic M et al., 2011), nicht aber für kolorektale Karzinomzellen. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit der antiproliferative Effekt von Tigecyclin zusätzlich an humanen dermalen Fibroblasten (NHDF-p) als nicht transformierte Kontrollzellen überprüft werden.

Auch sollte der antiproliferative Effekt von Tigecyclin in einer Mehrtagekultur mit kolorektalen Karzinomzellen untersucht werden. Hierfür wurden kolorektale Karzinomzellen sowohl zeitlich begrenzt für drei Tage als auch verlängert für sieben Tage mit Tigecyclin inkubiert. Mit der verlängerten Inkubation sollte untersucht werden, ob der antiproliferative Effekt von Tigecyclin reversibel ist, d. h. die Zellen nach Auswaschen von Tigecyclin aus den Zellkulturen wieder zu wachsen beginnen. Hierzu liegen für kolorektale Karzinomzellen aktuell keine Ergebnisse vor im Gegensatz zu Zellen anderer Tumorentitäten wie dem Melanom (Hu H et al., 2016), Magenkarzinom (Tang C et al., 2014) und Nierenzellkarzinom (Wang B et al., 2017).

Untersuchungen am Nierenzellkarzinom, hepatozellulären Karzinom und bei der akuten myeloischen Leukämie konnten synergistische Effekte zwischen Tigecyclin und Standardchemotherapeutika zeigen (Skrtic M et al., 2011; Fu X et al., 2017; Tan J et al., 2017; Wang B et al., 2017). Zu dieser klinisch relevanten Fragestellung sollten in der vorliegenden Arbeit ebenfalls entsprechende Untersuchungen mit kolorektalen Karzinomzellen durchgeführt werden. Hierzu wurden die beiden für die Therapie des kolorektalen Karzinoms zur Verfügung stehenden Standardchemotherapeutika 5-Fluoruracil und Oxaliplatin mit Tigecyclin kombiniert.

## **2 FRAGEN**

---

- 1. Weist Tigecyclin einen antiproliferativen Effekt bei kolorektalen Karzinomzellen auf? Ist dieser reversibel?**
- 2. Welche Qualität (Zytostase, Zytotoxizität) weist der antiproliferative Effekt von Tigecyclin auf? Verstärkt Tigecyclin den antiproliferativen Effekt von 5-Fluoruracil und Oxaliplatin?**
- 3. Wird durch Tigecyclin die Funktion der Atmungskette beeinflusst und führt dies zum programmierten Zelltod?**

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 ZELLINIEN UND ZELLKULTUR

Die für diese Arbeit verwendeten kolorektalen Karzinomzelllinien und Kontrollzellen sind in Tabelle 3.1 aufgelistet. Alle Zellen wachsen adhärent und waren zum Zeitpunkt der Untersuchung frei von Mykoplasmen.

**Tabelle 3.1: Übersicht über die verwendeten kolorektalen Karzinomzelllinien.** Nicht transformierte, dermale Fibroblasten wurden als Kontrolle eingesetzt.

Zelllinie	KRAS-, p53-Status	Bezugsquelle
Colo678	KRAS <sup>Mut</sup> , p53 <sup>WT</sup>	DSMZ <sup>3)</sup> , Kat.-Nr.: ACC 194
Colo741	KRAS <sup>?</sup> , p53 <sup>Mut</sup>	ECACC <sup>1)</sup> , Kat.-Nr.: 93052621
HCT116	KRAS <sup>Mut</sup> , p53 <sup>WT</sup>	DSMZ, Kat.-Nr.: ACC 357
LS174T	KRAS <sup>Mut</sup> , p53 <sup>WT</sup>	ATCC <sup>2)</sup> , Kat.-Nr.: CL - 188
RKO	KRAS <sup>?</sup> , p53 <sup>WT</sup>	ATCC, Kat.-Nr.: CRL- 2577
NHDF-p	KRAS <sup>WT</sup> , p53 <sup>WT</sup>	Promo Cell, Kat.-Nr.: 12350

<sup>1)</sup> European Collection of Authenticated Cell Cultures, Salisbury/UK (<http://www.phculturecollections.org.uk/collections/ecacc.jsp>); <sup>2)</sup> American Type Culture Collection ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)); <sup>3)</sup> Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig ([www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)). WT=Wildtyp, Mut=Mutiert, ?=Status für KRAS und p53 konnte nicht geklärt werden. Literatur: Liu Y, Bodmer WF. Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103(4): 976-981. Medico E, Russo M et al. The molecular landscape of colorectal cancer cell lines unveils clinically actionable kinase targets. Nat Commun. 2015; 6: 7002. doi: 10.1038/ncomms8002. NHDF-p: Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF) juvenile foreskin (NHDF-p).

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mittlerer Größe (Greiner Bio-One GmbH) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> (in wasserdampfgesättigter Atmosphäre) in einem Zellinkubator (NU-5500, NuAire, USA) bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde alle drei bis vier Tage gewechselt. Die maximale Anzahl an Zellpassagen betrug 14.

**Tabelle 3.2: Übersicht der verwendeten Kulturmedien.**

Zelllinie	Nährmedium	D-Glukose	Bezugsquelle /Kat.-Nr.
Colo678 Colo741 LS174T RKO	RPMI 1640	11 mmol/L	Gibco / 22409-031
HCT116	McCoy	17 mmol/L	Gibco / 26600-080
NHDF-p	FGM 2 <sup>1)</sup>	8,0 mmol/L	PromoCell®, Heidelberg / C23020

<sup>1)</sup> FGM 2: Fibroblast Growth Medium 2.

Die Kulturmedien (Tabelle 3.2) wurden mit folgenden Zusätzen versehen (in Klammern jeweils die Endkonzentration): Penicillin G (100 U/mL), Streptomycin (100 µg/mL; Kat.-Nr.: 15140122 (Pen/Strep)), L-Glutamin (2 mmol/L; Kat.-Nr.: 25030081), 2-Mercaptoethanol (50 µmol/L; Kat.-Nr.: 11360070 ), Natriumpyruvat (1 mmol/L), nicht-essentielle Aminosäuren (1 %, Kat.-Nr.: 11140050) sowie 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS, Kat.-Nr.: 10270-106); alle Reagenzien von Gibco, ThermoFisher Scientific. Humane Fibroblasten wurden in »Fibroblast Growth Medium 2« mit 8 mmol/L Glukose, 2,0 % FCS, 1,0 % Penicillin und Streptomycin sowie mit den beiden humanen Wachstumsfaktoren Fibroblastenwachstumsfaktor (1,0 ng/mL) und insulinähnlicher Wachstumsfaktor (5,0 µg/mL) kultiviert.

### **3.2 ZELLERNTE**

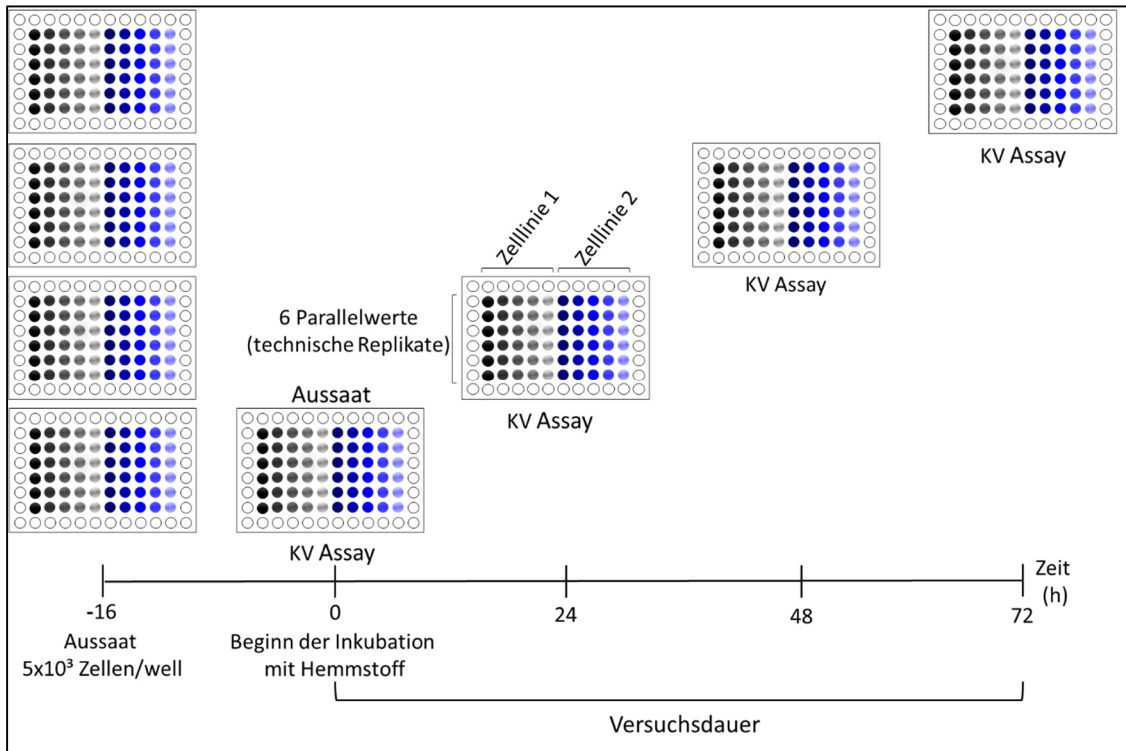
Für die Zellernte wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und die Zellen mit 5 mL 0,05 % Trypsin in HBSS (HyClone, GE Healthcare Life Sciences, Kat.-Nr.: SH30236.01) für 10 Minuten inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit 50 mL PBS (»phosphate buffered saline«; Gibco, ThermoFisher Scientific, Kat.-Nr.: 70013-016) aufgenommen und für 6 Minuten bei 397 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in einem definierten Volumen von RPMI 1640 resuspendiert und die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (Marienfeld GmbH, Kat.-Nr. 0640010). Hierzu wurden die Zellen mit 0,04 % (Endkonzentration) Trypanblau (Sigma-Aldrich, Kat.-Nr.: T8154) gefärbt.

### **3.3 EXPERIMENTELLES DESIGN**

In Zellkulturschalen mit 96 Vertiefungen (Greiner Bio-One, Kat.-Nr.: 655180) wurden jeweils  $5 \times 10^3$  Zellen in einem Endvolumen von 200 µL pro Vertiefung pipettiert und über Nacht in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert. Für jede Verdünnungsstufe an Tigecyclin (von  $10^{-7}$  bis  $10^{-4}$  mol/L) wurden bis zu 6 Parallelwerte (technische Replikate) und 3 Versuchswiederholungen (biologische Replikate) angesetzt. Zur Normalisierung der Anzahl vitaler Zellen auf die Ausgangszellzahl wurde nach 16 Stunden in Kultur jeweils die Aussaat mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. In den Versuchsansätzen wurde nach 16 Stunden



das Medium abgesaugt und jeweils 200  $\mu\text{L}$  RPMI 1640 (1 % FCS) pro Vertiefung mit Tigecyclin hinzugegeben. Die Zellkulturschalen wurden anschließend für 24, 48 oder 72 Stunden in einem  $\text{CO}_2$ -Inkubator bei 21 % Sauerstoff kultiviert und die Anzahl vitaler Zellen mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt.



**Abbildung 3.1: Versuchsaufbau zur Messung Tigecyclin-vermittelter antiproliferativer Effekte.** Die Anzahl vitaler Zellen wurde 24, 48 und 72 Stunden nach Beginn der Inkubation mit Tigecyclin mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und auf die Aussaat normalisiert. Eigener Entwurf.

### 3.4 KRISTALLVIOLETT-ASSAY

Der Kristallviolett-Assay ist ein kolorimetrischer Test zum Nachweis vitaler Zellen. Kristallviolett bindet an die DNA der Zellen und der Anteil an gebundenem Farbstoff verhält sich proportional zur Zellzahl. Zur Durchführung des Assays wurde das Medium aus der Zellkulturschale abgesaugt und die Zellen mit 100  $\mu\text{L}$  Methanol pro Vertiefung fixiert. Nach 10 Minuten wurde der Überstand entfernt und 100  $\mu\text{L}$  Kristallviolett-Lösung (0,25 % (w/v) in PBS/25 % (v/v) Methanol; Sigma-Aldrich, Kat.-Nr.: C32675-25g) pro Vertiefung für 10 Minuten hinzugegeben. Nicht gebundener Farbstoff wurde durch viermaliges Spülen der Zellkulturschale mit destilliertem Wasser ausgewaschen und die Zellkulturschale

anschließend 30 Minuten unter dem Abzug getrocknet. Mit 200 µL 10 % Essigsäure (Sigma-Aldrich) pro Vertiefung wurde der gebundene Farbstoff in Lösung gebracht (30 Minuten auf einem Wippschüttler) und die optische Dichte mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm quantifiziert (Flick DA et al., 1984).

### 3.5 BESTIMMUNG DER VERDOPPLUNGSZEIT DER ZELLINIEN

Die Verdopplungszeit »g« wurde mit folgender Formel berechnet:

$$g = \frac{\log 2 * \Delta t}{\log N - \log N_0}$$

$\Delta t$ : Dauer der Zellen in Kultur ( $t_n - t_0$ );  $N_0$ : Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt  $t_0$ ;  $N$ : Anzahl der Zellen zum Ablesezeitpunkt  $t_n$ .

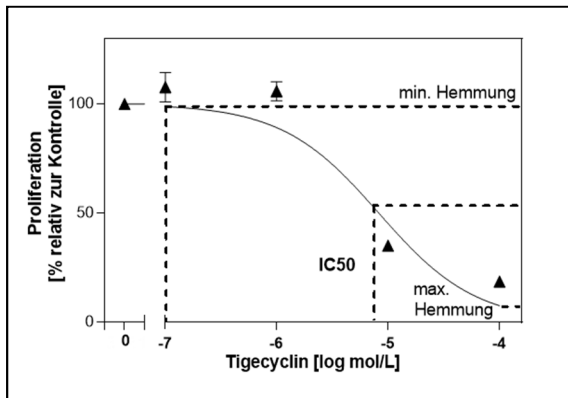
### 3.6 STAMMLÖSUNGEN

Zur Herstellung einer 1 mmol/L Stammlösung wurden 5 mg Tigecyclinhydrat ( $585,65 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$ ; Sigma-Aldrich, Kat.-Nr.: 1229002-07-6) in 8,5 mL in RPMI 1640 Medium (1 % FCS) und 12 % DMSO (Sigma-Aldrich, Kat.-Nr.: D5879) gelöst. Die Stammlösung wurde bei 4°C aufbewahrt. 5-Fluoruracil (5-FU) und Oxaliplatin (Zentralapotheke des Universitätsklinikums Würzburg) lagen in einer Stammlösung von 50 mg/mL ( $130,08 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$ ) bzw. 1 mg/mL ( $397,29 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$ ) vor.

### 3.7 BESTIMMUNG DER HALBMAXIMALEN INHIBITORISCHEN KONZENTRATION VON TIGECYCLIN

Die halbmaximale inhibitorische Konzentration oder  $IC_{50}$  gibt die Konzentration an Tigecyclin an, bei der 50 % der maximalen Wirkstärke erreicht wird (Sebaugh JL, 2011). Um den  $IC_{50}$ -Wert zu ermitteln, wurden die Zellen in einem Konzentrationsbereich von  $10^{-4}$  bis  $10^{-7}$  mol/L Tigecyclin inkubiert (Kapitel 3.3). Zur Lösung von Tigecyclin wurde DMSO verwendet (Kapitel 3.6). Ein möglicher Einfluss von DMSO (max. 1,2 % bei 100 µmol/L Tigecyclin) auf die Zellproliferation wurde ausgeschlossen (Abbildung 10.2). Die Anzahl an vitalen Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay (Kapitel 3.4) bestimmt und prozentual zur Kontrolle angegeben (Berechnung mit dem Statistikprogramm GraphPad

Prism 6.0). Hierzu wird aus der maximalen und minimalen Hemmung der Zellproliferation der  $IC_{50}$ -Wert ermittelt (Abbildung 3.2).



**Abbildung 3.2: Graphische Darstellung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ).** Zusammenhang zwischen minimaler, maximaler und halbmaximaler ( $=IC_{50}$ ) Hemmkonzentration. Aufgrund des sigmoiden Kurvenverlaufs kann ausschließlich der  $IC_{50}$  als exakt zu berechnende Größe für die Bestimmung des antiproliferativen Effektes herangezogen werden. Berechnet wurde der  $IC_{50}$  (Ergebnisse) mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 6.0. Eigener Entwurf.

### 3.8 FLUORESZENZMIKROSKOPIE

Die Funktion der Atmungskette wurde mit dem kationischen, lipophilen Farbstoff JC-1<sup>5)</sup> überprüft (»Mitochondria Staining Kit«, Sigma-Aldrich, Kat.-Nr. CS0390). JC-1 ist für die Mitochondrienmembran permeabel und bildet bei einer funktionellen Atmungskette (mit einem elektrochemischen (polarisierten) Potentialgradienten) innerhalb der Mitochondrien rot fluoreszierende „J-Aggregate“. Ist die Atmungskette defekt, depolarisiert das mitochondriale Membranpotential, die „J-Aggregate“ können sich nicht ausbilden und JC-1 bleibt als grün fluoreszierendes Monomer vorliegen (Reers M et al., 1991).

$5 \times 10^5$  Zellen wurden über Nacht auf Objektträger in RPMI 1640 (10 % FCS) oder FGM 2 (Tabelle 3.2) ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit Tigecyclin in RPMI 1640 (1 % FCS) für 24 Stunden inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit JC-1 gefärbt. Dazu wurde pro Quadratcentimeter Wachstumsfläche 0,2 mL JC-1-Färbelösung (1 mg/mL in DMSO und 1:200 verdünnt) eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde Valinomycin (1  $\mu$ L einer 1 mg/mL Stammlsg.) verwendet, das als Ionophor Kalium ( $K^+$ )-Ionen durch die Mitochondrienmembran transportiert wird und damit zu einer Depolarisierung des Membranpotentials führt (Inai Y et al., 1997). Die

<sup>5)</sup> 5,5',6,6'-Tetrachlor-1,1',3,3'-Tetraethyl-benzimidazolcarbocyanin-Iodid.

Zellen wurden für 20 Minuten im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C kultiviert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen und Zugabe von RPMI 1640 (1 % FCS) wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (BZ 9000, Keyence) analysiert.

### 3.9 WESTERN BLOT

Jeweils 1x10<sup>6</sup> Zellen wurden in 100 µL Lysepuffer (Tabelle 3.3) mit Ultraschall (Bandelin Sonoplus HD 2070) bei einer Amplitude von 30 % zweimal für jeweils 30 Sekunden lysiert.

**Tabelle 3.3: Zusammensetzung des verwendeten Lyse-Puffers (1 % SDS, pH 7,6).** Reagenzien von Sigma-Aldrich.

Komponente	Endkonzentration
HEPES (238,3 g x mol <sup>-1</sup> )	25 mmol/L
EDTA (372,2 g x mol <sup>-1</sup> )	2 mmol/L
NaF (42,0 g x mol <sup>-1</sup> )	25 mmol/L
SDS (288,4 g x mol <sup>-1</sup> )	10 %

Der Proteingehalt von Mess- und Standardproben wurde mit dem BCA-Proteinassay von Pierce™ (ThermoFisher Scientific, Kat.-Nr.: 23227) bei 570 nm bestimmt. Die Proben (jeweils 15 µg) wurden mit ca. 10 µL Lämmli-Puffer (Tabelle 3.4) vermischt und bei 99°C für 5 Minuten denaturiert und anschließend auf das Gel (Bio-Rad, Kat.-Nr.: 456-1084) aufgetragen. Zusätzlich wurden 3 µL vorgefärbter Proteinmarker (Protein Marker V, PeqLab VWR, Kat.-Nr.: 272210) für den Größenbereich von 10 bis 250 kDa aufgetragen.

**Tabelle 3.4: Zusammensetzung des Auftragepuffers nach Laemmli (4x, pH 6,8).** Reagenzien von Sigma-Aldrich.

Komponente (Ausgangskonz.)	Volumen/ml (Endkonz.)
Tris-HCl (0,5 mmol/L)	0,25 mL (0,125 mmol/L)
SDS (10 %)	0,4 mL (4 %)
2-Mercaptoethanol (>99 %)	0,05 mL (ca. 5 %)
Glycerol (99,5 %)	0,2 mL (19,9 %)
Bromphenolblau (0,1 %)	0,1 mL (0,01 %)

Die Proben wurden bei 100 V für 1 Stunde im Gel aufgetrennt (Tabelle 3.5) und mit Towbin-Puffer (Tabelle 3.5) bei 170 mA für 90 Minuten auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schüll) übertragen. Die Membran wurde für 1 Stunde in TBS-T (Tris-buffered-saline with tween 20) (Tabelle 3.5) mit 5 % Milchpulver inkubiert und danach 3mal mit TBS-T gewaschen.

**Tabelle 3.5: Zusammensetzung vom SDS-Laufpuffer (pH 8,3), Transfer-Puffer n. Towbin (pH 8,3) und TBS (pH 7,6).** Reagenzien von Sigma-Aldrich.

Puffer	Komponente	Endkonzentration
SDS-Laufpuffer	Tris ultrapure (121,4 g x mol <sup>-1</sup> ) Glycin (75,1 g x mol <sup>-1</sup> ) SDS (288,4 g x mol <sup>-1</sup> )	3,1 g/L 14,4 g/L 1,0 g/L
Towbin-Puffer	Tris ultrapure Glycin (75,1 g x mol <sup>-1</sup> ) Methanol (>99,8 %)	25 mmol/L 152 mmol/L 20 %
TBS (10x)	Tris ultrapure NaCl HCl (1 mol/L) nach Verdünnung Tween 20 zugeben	24,2 g/L 80 g/L 38 ml/L (0,04 mol/L) 0,05-1,0 %

Die Primärantikörper (Tabelle 3.6) wurden über Nacht bei 4°C auf einem Wippschüttler im Dunkeln inkubiert. Am Folgetag wurde die Nitrocellulosemembran 3-mal mit TBS-T (s. oben) gewaschen, der Sekundärantikörper (polyclonal-goat-anti-rabbit-Immuoglobulin, HRP-konjugiert<sup>6)</sup>, Dako, Kat.-Nr.: E0432) in einer Verdünnung von 1:10.000 in TBS-T hinzugegeben und für 1 Stunde einem Wippschüttler im Dunkeln inkubiert. Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden wurde die mit TBS-T gewaschene Nitrocellulosemembran für jeweils 1 Minute in den ECL-Lösungen 1 und 2 (GE Healthcare Europe GmbH, Kat.-Nr.: 2232) inkubiert und die Chemolumineszenz detektiert (ChemiDoc, Bio-Rad).

<sup>6)</sup> HRP: Abkürzung für horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase).

**Tabelle 3.6: Übersicht über die im Western Blot verwendeten Primärantikörper.**

Antikörper	Hersteller	Bestell-Nr.	Verdünnung
Caspase 3	CST <sup>1)</sup>	#9662	1:1000
Cleaved Caspase 3	CST	#9661	1:500
Caspase 9	CST	#9502	1:1000
Cleaved Caspase 9	CST	#9505	1:1000
LC3-I + -II	AbD <sup>2)</sup>	AHP 2167T	1:250

<sup>1)</sup> Cell Signaling Technology, <sup>2)</sup> AbD SeroTec, Bio-Rad.

Zusätzlich wurden GAPDH oder  $\beta$ -Aktin mit den entsprechenden monoklonalen Antikörpern (GAPDH: Sigma Aldrich, Kat.-Nr.: G9295 bzw.  $\beta$ -Aktin: Sigma Aldrich, Kat.-Nr.: A3854) in einer Verdünnung von 1:10.000 als interner Standard nachgewiesen.

### **3.10 AUSWERTUNG UND STATISTIK**

Messdaten wurden mit Excel (Office 2013, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) und GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) ausgewertet. Mehrfachvergleiche mit einer Variablen wurden mit ANOVA (und dem Bonferroni post Test) durchgeführt. Das Signifikanzniveau P wurde auf 0,05 festgelegt. Die Fluoreszenzbilder wurden mit Hilfe des Programms »BZ-II-Analyzer« (Keyence) ausgewertet.

## 4 ERGEBNISSE

---

### 4.1 CHARAKTERISIERUNG DER ZELLINIEN

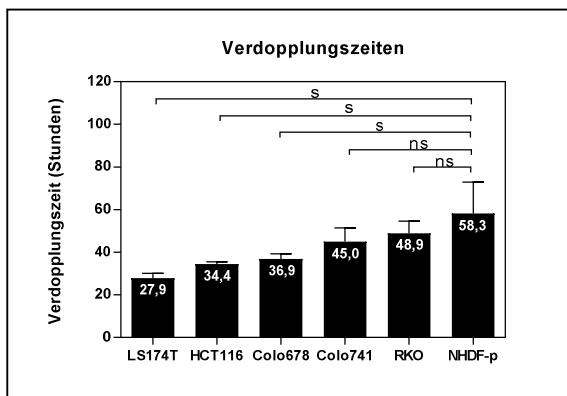
Für jede Zelllinie wurde die halbmaximale inhibitorische Konzentration oder  $IC_{50}$  an Tigecyclin bestimmt. Dabei gilt, je höher der  $IC_{50}$  von Tigecyclin für eine Zelllinie ist, desto geringer das Ansprechen der Zellen auf den antiproliferativen Effekt von Tigecyclin. Zur Bestimmung des  $IC_{50}$  wurden die Zellen mit Tigecyclin in einem Konzentrationsbereich von  $10^{-7}$  bis  $10^{-4}$  mol/L für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Mit dem Kristallviolett-Assay wurde der Anteil vitaler Zellen bestimmt und auf den Anteil vitaler Zellen der Kontrolle (kein Tigecyclin) normalisiert. Die Berechnungen hierzu wurden mit dem Analyseprogramm GraphPad Prism 6.0 durchgeführt und das Ergebnis graphisch als sigmoider Kurvenverlauf dargestellt (Abbildung 10.1). Die für die fünf kolorektalen Karzinomzelllinien und Fibroblasten bestimmten  $IC_{50}$ -Werte für Tigecyclin sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

**Tabelle 4.1: Der antiproliferative Effekt von Tigecyclin bei kolorektalen Karzinomzellen und dermalen Fibroblasten (NHDF-p).** Die  $IC_{50}$  Werte ( $\mu\text{mol/L}$ ) für Tigecyclin sind als Mittelwert und 95 % Konfidenzintervall [in Klammern] für eine Inkubationszeit von 72 Stunden (für 48 Stunden s. Tabelle 10.1 im Anhang) von drei unabhängigen Versuchen (biologische Replikate) mit jeweils sechs technischen Replikaten angegeben.

Colo678	Colo741	HCT116	LS174T	RKO	NHDF-p
8,3 [6,6-11,9]	8,3 [4,7-14,8]	5,6 [3,7-8,6]	17,9 [13,2-24,1]	29,6 [18,1-48,6]	64,5 [52,5-74,8]

Der stärkste antiproliferative Effekt von Tigecyclin mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 5,6  $\mu\text{mol/L}$  war bei HCT116 Zellen und der schwächste mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 29,6  $\mu\text{mol/L}$  bei RKO Zellen nachzuweisen (Tabelle 4.1). Insgesamt war der antiproliferative Effekt von Tigecyclin stärker (und zwar um den Faktor 2-12) bei den untersuchten kolorektalen Karzinomzellen als bei Fibroblasten. Basierend auf den  $IC_{50}$ -Werten (Tabelle 4.1) wurden für die nachfolgenden Untersuchungen folgende Konzentrationen an Tigecyclin festgelegt: 15  $\mu\text{mol/L}$  für Colo678 und Colo741, 10  $\mu\text{mol/L}$  für HCT116, 25  $\mu\text{mol/L}$  für LS174T, 50  $\mu\text{mol/L}$  für RKO und 75  $\mu\text{mol/L}$  für Fibroblasten. Bei der Festlegung der Standardkonzentrationen an Tigecyclin wurde die Breite des Konfidenzintervalls berücksichtigt.

Auch die Verdopplungszeit als Maß für die Zellproliferation wurde für die fünf kolorektalen Karzinomzelllinien und Fibroblasten bestimmt. Hierzu wurden  $5 \times 10^3$  Zellen pro Vertiefung einer Zellkulturschale mit 96 Vertiefungen ausgesät, bis zu 72 Stunden inkubiert und die Anzahl vitaler Zellen mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Aus diesen Daten wurden die Verdopplungszeiten berechnet (Abbildung 4.1).



**Abbildung 4.1: Bestimmung der Zellproliferation.** Die Verdopplungszeiten sind in Stunden (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) von bis zu drei unabhängigen Versuchen angegeben. Kolorektale Karzinomzellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS und Fibroblasten (NHDF-p) in »Fibroblast Growth Medium 2« mit 2 % FCS inkubiert. Die Anzahl vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt (Kapitel 3.4). »ns«: nicht signifikant, »s«: signifikant ( $P < 0,05$ , Kapitel 3.10).

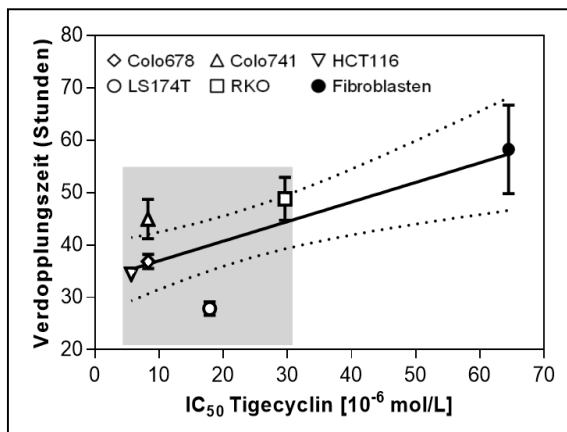
**Tabelle 4.2: Bestimmung der Zellproliferation.** Die Verdopplungszeiten sind in Stunden (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) von bis zu drei unabhängigen Versuchen angegeben. Die kolorektalen Karzinomzellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS und die Fibroblasten in »Fibroblast Growth Medium 2« mit 2 % FCS inkubiert. Die Anzahl vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt.

Colo678	Colo741	HCT116	LS174T	RKO	NHDF-p
36,9 $\pm 1,9$	45,0 $\pm 5,3$	34,4 $\pm 0,9$	27,9 $\pm 1,9$	48,9 $\pm 4,1$	58,3 $\pm 12,0$

Ein Vergleich der Verdopplungszeiten zeigt, dass kolorektale Karzinomzellen schneller wachsen als Fibroblasten (Abbildung 4.1). Die am schnellsten wachsende Zelllinie war LS174T mit einer Verdopplungszeit von  $27,9 \pm 1,9$  Stunden, gefolgt von HCT116 mit einer Verdopplungszeit von  $34,4 \pm 0,9$  Stunden. Die am langsamsten wachsende Karzinomzelllinie war RKO mit einer Verdopplungszeit von  $48,9 \pm 4,1$  Stunden neben Fibroblasten mit einer Verdopplungszeit von  $58,3 \pm 12,0$  Stunden. Die in Tabelle 4.2 angegebenen Verdopplungszeiten für LS174T, HCT116 und Colo678 unterschieden sich signifikant von der Verdopplungszeit für Fibroblasten ( $P < 0,05$ ).



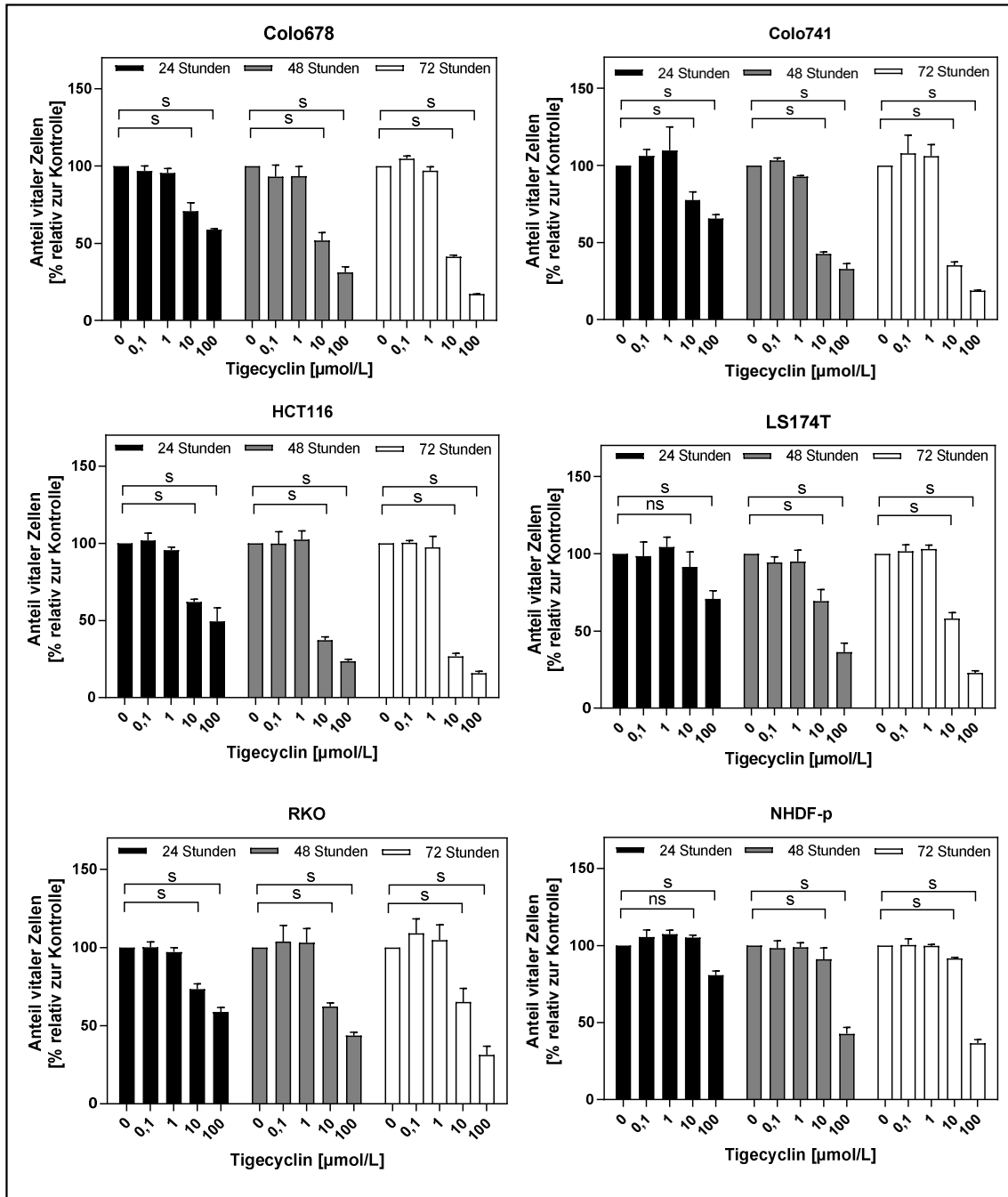
Werden die Werte für Verdopplungszeiten (Abbildung 4.1) und  $IC_{50}$  (Tabelle 4.1) in ein Diagramm übertragen (Abbildung 4.2), so deutet sich ein positiver Zusammenhang zwischen der Verdopplungszeit und dem  $IC_{50}$  einer Zelllinie an. Das würde bedeuten, dass der antiproliferative Effekt von Tigecyclin in langsam wachsenden Zellen geringer ist als in schnell wachsenden Zellen (Abbildung 4.2). Diese Aussage bleibt aufgrund der geringen Anzahl an untersuchten Zelllinien zum jetzigen Zeitpunkt eine Vermutung.



**Abbildung 4.2: Zusammenhang zwischen  $IC_{50}$  und Verdopplungszeit.** Die Daten deuten darauf hin, dass der antiproliferative Effekt von Tigecyclin ( $IC_{50}$ ) durch das Zellwachstum beeinflusst wird. Die Werte (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) basieren auf bis zu drei unabhängigen Versuchen. Dargestellt sind die Regressionsgerade (durchgezogene Linie) mit dem 95 % Konfidenzintervall (gepunktete Linien). Im grauen Bereich liegen die Werte für die kolorektalen Karzinomzelllinien mit einem  $IC_{50} < 30 \mu\text{mol/L}$  und einer Verdopplungszeit  $< 50$  Stunden.  $R^2 = 0,45$  und  $P = 0,0033$ .

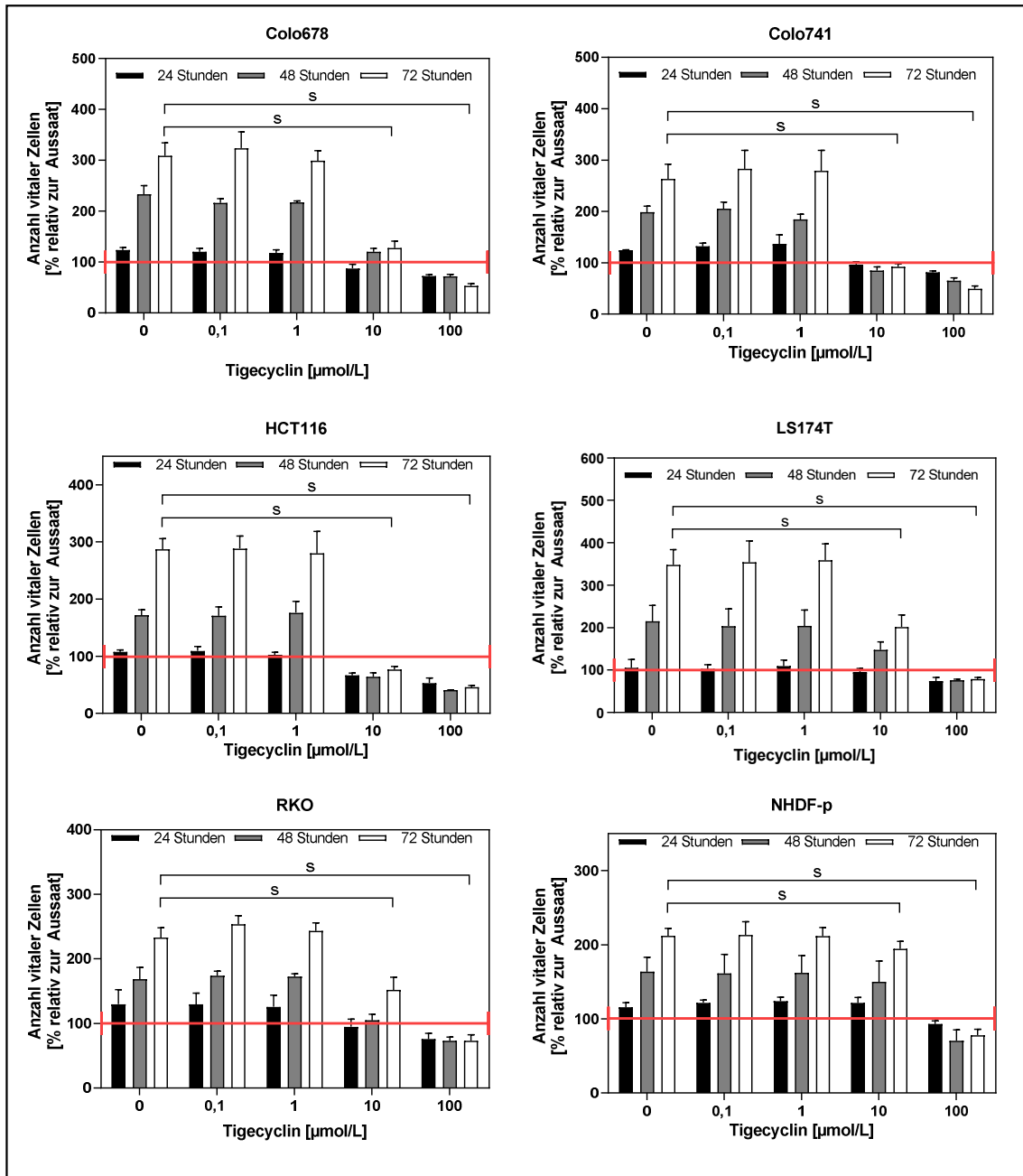
## 4.2 DER ANTIPROLIFERATIVE EFFEKT VON TIGECYCLIN

Die Stärke des antiproliferativen Effekts von Tigecyclin nahm mit Dauer der Inkubationszeit erwartungsgemäß zu, sodass nach 72 Stunden der stärkste hemmende Effekt auf die Zellproliferation zu messen war (Abbildung 4.3). Die Untersuchungen ergaben, dass der antiproliferative Effekt von Tigecyclin bei kolorektalen Karzinomzellen ab einer Konzentration von  $10 \mu\text{mol/L}$  für die drei Inkubationszeitpunkte (24, 48, 72 Stunden) eindeutig nachzuweisen war (Abbildung 4.3). Dagegen war bei Fibroblasten der antiproliferative Effekt von Tigecyclin bei dieser Konzentration ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) wesentlich geringer. So betrug die Abnahme vitaler Zellen ca. 9 % und liegt damit im Schwankungsbereich der Messungen zwischen biologischen Replikaten, der sich im Bereich von 15 % bewegt (nicht gezeigt). Bei einer Konzentration von  $100 \mu\text{mol/L}$  Tigecyclin war der antiproliferative Effekt am stärksten (Abbildung 4.3). Höhere Konzentrationen an Tigecyclin wurden nicht getestet.



**Abbildung 4.3: Der antiproliferative Effekt von Tigecyclin.** Die Werte (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) basieren auf drei unabhängigen Versuchen mit bis zu sechs technischen Replikaten. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Tigecyclin für 24, 48 oder 72 Stunden inkubiert. Die Anzahl vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und auf die Kontrolle (kein Tigecyclin (0)) normalisiert (=100 %). »s«: signifikant;  $P < 0,05$  (Kapitel 3.10). Zur Lösung von Tigecyclin wurde DMSO verwendet (Kapitel 3.6). Ein möglicher Einfluss von DMSO (max. 1,2 % bei 100  $\mu\text{mol/L}$  Tigecyclin) auf die Zellproliferation wurde im Vorfeld ausgeschlossen (Abbildung 10.2).

Die Berechnung der Anzahl vitaler Zellen normalisiert auf die Aussaat erlaubt den Nachweis von zytotoxischen und zytostatischen Effekten (Abbildung 4.4).



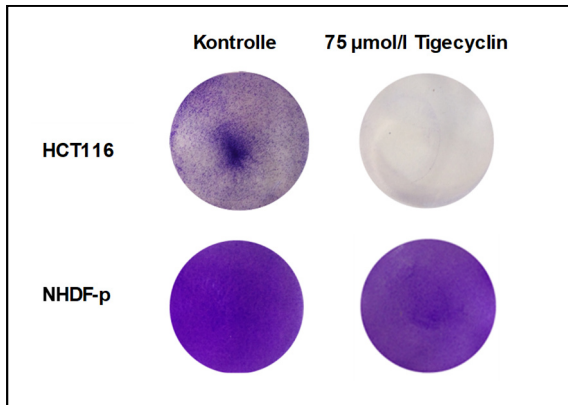
**Abbildung 4.4: Nachweis Tigecyclin-induzierter zytostatischer und zytotoxischer Effekte.** Die Werte (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) basieren auf drei unabhängigen Versuchen mit bis zu sechs technischen Replikaten. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Tigecyclin für 24, 48 oder 72 Stunden inkubiert. Die anschließende Ermittlung der Anzahl vitaler Zellen erfolgte mit dem Kristallviolett-Assay und ist relativ zur Aussaat ( $5 \times 10^3$  Zellen, entsprechen 100 % (Querstrich)) im Graphen angegeben. »s«: signifikant;  $P < 0,05$  (Kapitel 3.10). Der antiproliferative Effekt von Tigecyclin wurde mit der Methode der direkten Zellzählung zusätzlich bestätigt (Abbildung 10.3).

In dieser Arbeit wurde eine auf die Aussaat normalisierte relative Zellzahl zwischen 85 % und 115 % als nicht-relevante biologische Größe bewertet

(»normale« Schwankung). Dieser Cutoff oder Grenzwert basiert auf Schwankungen bei der Bestimmung der Zellzahl zwischen biologischen Replikaten (nicht gezeigt). Das bedeutet, dass ab einer Abnahme vitaler Zellen um mehr als 15 % von der Aussaat (=100 %) ein zytotoxischer Effekt vorliegt. Ein zytotoxischer Effekt von Tigecyclin war bei 100  $\mu\text{mol/L}$ , der höchsten in dieser Arbeit getesteten Konzentration, nachzuweisen. Bei dieser Konzentration an Tigecyclin traten zelltoxische Effekte auch bei Fibroblasten auf. Für HCT116 waren zelltoxische Effekte bereits bei 10  $\mu\text{mol/L}$  Tigecyclin nachzuweisen (Abbildung 4.4).

Zytostatische Effekte führen zu einer verzögerten Zunahme an vitalen Zellen. Um diese erkennen zu können, wurden ebenfalls Grenzwerte definiert, die auf Schwankungen bei der Bestimmung der Zellzahl zwischen biologischen Replikaten basieren. Der untere Grenzwert zum Nachweis zytostatischer Effekte liegt bei 115 % vitaler Zellen (also um 15 % über der Aussaat) und der obere Grenzwert bei 15 % unterhalb der Zellzahl der unbehandelten Kontrolle (also  $x-15\%$ ). Ein zytostatischer Effekt von Tigecyclin wurde bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/L}$  beobachtet (Ausnahme: HCT116). Die Ergebnisse belegen somit einen starken antiproliferativen Effekt von Tigecyclin bei kolorektalen Karzinomzellen. Dabei sind konzentrationsabhängig zytostatische bzw. zytotoxische Effekte nachzuweisen.

Zusätzlich wurde der zytotoxische Effekt von Tigecyclin visualisiert. Hierzu wurden  $1 \times 10^6$  Zellen von HCT116 und Fibroblasten in eine Zellkulturschale mit sechs Vertiefungen ausgesät und mit 75  $\mu\text{mol/L}$  Tigecyclin inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurden die Zellen mit Methanol fixiert und anschließend mit Kristallviolett angefärbt und sichtbar gemacht (Abbildung 4.5). Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse für HCT116 und Fibroblasten. Für HCT116 war nach 72 Stunden ein zytotoxischer Effekt von Tigecyclin nachzuweisen, während bei gleicher Konzentration für Fibroblasten kein Unterschied zwischen unbehandelter Kontrolle und mit Tigecyclin behandelten Zellen zu erkennen war (Abbildung 4.5).



**Abbildung 4.5 Der antiproliferative Effekt von Tigecyclin.** Jeweils  $1 \times 10^6$  HCT116-Zellen und Fibroblasten (NHDF-p) wurden für 72 Stunden mit  $75 \mu\text{mol/L}$  Tigecyclin inkubiert. Bei dieser Konzentration an Tigecyclin waren bei Fibroblasten kaum antiproliferative Effekte nachzuweisen (geringe Abnahme der Farbeintensität), während bei HCT116 der antiproliferative Effekt von Tigecyclin eindeutig zelltoxische Eigenschaften aufwies (Tabelle 4.1). Die Zellen waren derart geschädigt, dass sie ihre Adhärenz verloren und mit Kristallviolett daher nicht nachweisbar waren (Kapitel 3.4). Je intensiver die Violett-färbung, desto

größer der Anteil an vitalen Zellen (und umgekehrt). Eine Konzentration von  $100 \mu\text{mol/L}$  Tigecyclin war für die getesteten Zelllinien sämtlich zelltoxisch (Abbildung 4.4). Repräsentatives Farbeergebnis von zwei unabhängigen Versuchen.

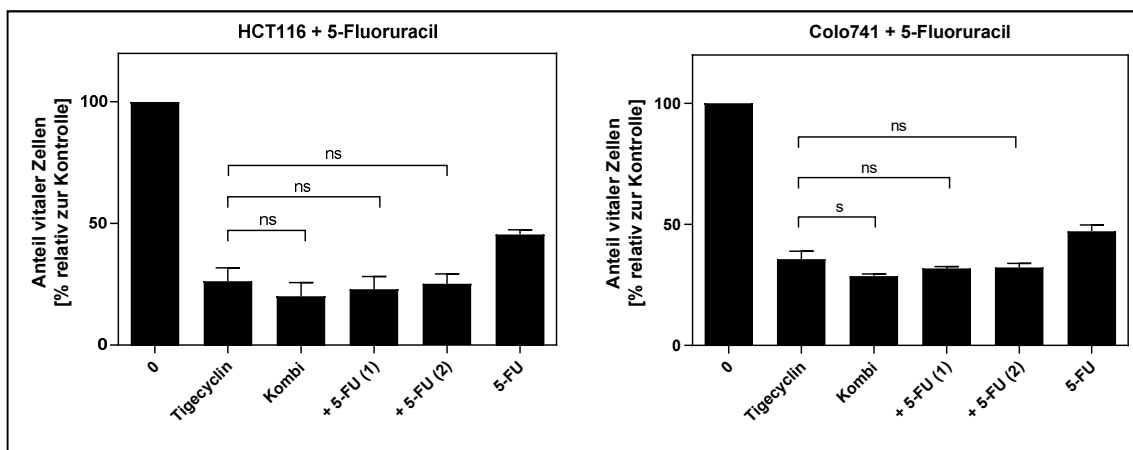
### 4.3 DER ANTIPROLIFERATIVE EFFEKT VON TIGECYCLIN IN KOMBINATION MIT 5-FU ODER OXALIPLATIN

Untersuchungen an verschiedenen Tumorentitäten (Leukämien, Nierenzellkarzinom und Hepatozelluläres Karzinom) haben synergistische Effekte durch Kombination von Tigecyclin mit Standardchemotherapeutika zeigen können (Skrtic M et al., 2011; Fu X et al., 2017; Tan J et al., 2017; Wang B et al., 2017). Um zu prüfen, ob Tigecyclin den antiproliferativen Effekt gängiger, zur Therapie des kolorektalen Karzinoms eingesetzter Chemotherapeutika verstärkt, wurde Tigecyclin mit 5-FU und Oxaliplatin kombiniert. Beide Chemotherapeutika induzieren DNA-Schäden (Longley DB et al., 2003; Mohelnikova-Duchonova B et al., 2014). Zum jetzigen Zeitpunkt sind keine Hinweise aus der Literatur bekannt, dass Tigecyclin zu einer Verstärkung der antiproliferativen Effekte von 5-FU und Oxaliplatin führt.

Für die Kombinationsversuche wurden die kolorektalen Karzinomzelllinien mit einer Konzentration von  $15 \mu\text{mol/L}$  Tigecyclin zusammen mit  $5 \mu\text{mol/L}$  5-FU für 72 Stunden inkubiert (Abbildung 4.6). Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay ermittelt und im Vergleich zur Kontrolle ausgewertet (Kapitel 3.3). Die halbmaximal inhibitorische Konzentration von  $5 \mu\text{mol/L}$  5-FU für kolorektale Karzinomzellen wurde in Vorversuchen bestimmt (nicht gezeigt). Der antiproliferative Effekt von Tigecyclin bzw. 5-FU war nachzuweisen, doch blieb

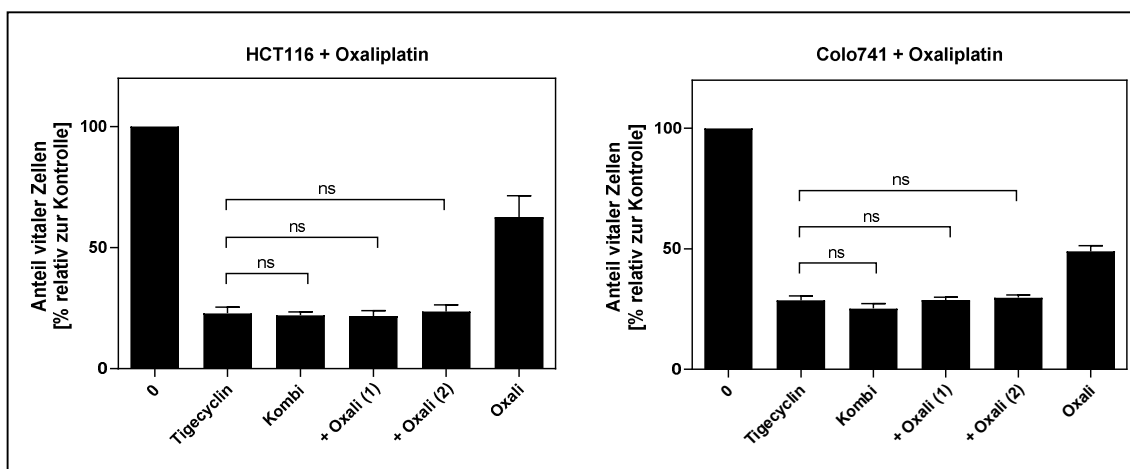
ein stärkerer antiproliferativer Effekt durch die Kombination beider Substanzen aus (Abbildung 4.6).

Um die Notwendigkeit einer Vorbehandlung von HCT116 und Colo741 mit Tigecyclin zur Steigerung des antiproliferativen Effektes von 5-FU untersuchen zu können, wurden die Zellen zuerst mit 15  $\mu\text{mol/L}$  Tigecyclin für 24 bzw. 48 Stunden inkubiert und anschließend mit 5  $\mu\text{mol/L}$  5-FU für weitere 48 bzw. 24 Stunden kultiviert (sodass die Gesamtinkubationsdauer von 72 Stunden konstant gehalten wurde). Auch diese Strategie, die auf der Vorstellung beruht, Tumorzellen durch eine Vorbehandlung mit Tigecyclin empfindlicher gegenüber Chemotherapeutika zu machen, führte zu keiner Steigerung des antiproliferativen Effektes von 5-FU. (Abbildung 4.6).



**Abbildung 4.6: Tigecyclin verstärkt nicht den antiproliferativen Effekt von 5-FU.** Die Werte (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) basieren auf 3 voneinander unabhängigen Versuchen mit bis zu 6 technischen Replikaten. Die Zellen aller Versuchsgruppen wurden insgesamt für 72 Stunden kultiviert, die Anzahl vitaler Zellen mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und die Ergebnisse auf die unbehandelte Kontrolle (»0«) berechnet. Verglichen wurden 15  $\mu\text{mol/L}$  Tigecyclin (Tigecyclin), 5  $\mu\text{mol/L}$  5-Fluoruracil (5-FU) und die Kombination aus Tigecyclin (15  $\mu\text{mol/L}$ ) und 5-FU (5  $\mu\text{mol/L}$ ) für 72 Stunden (Kombi). Auch eine Vorinkubation mit Tigecyclin (15  $\mu\text{mol/L}$ ) für 48 Stunden vor der Inkubation (zusätzlich) mit 5  $\mu\text{mol/L}$  5-FU (+5-FU (1)) für weitere 24 Stunden sowie eine Vorinkubation mit Tigecyclin für 24 Stunden vor der Inkubation mit 5-FU für weitere 48 Stunden (+5-FU (2)) führten zu keiner Verstärkung des antiproliferativen Effektes. Der für Colo741 gefundene Unterschied zwischen Tigecyclin und der Kombination (Kombi) ist zwar signifikant (»s«,  $P < 0,05$ ), wird aber als biologisch nicht relevant angesehen (s. auch Kapitel 4.2 zur Festlegung von Cutoffs zur Beurteilung des antiproliferativen Effektes von Tigecyclin). »ns«: nicht signifikant. Hinweis: Die Untersuchungen für HCT116 wurden zuerst bei der Konzentration von 10  $\mu\text{mol/L}$  Tigecyclin für HCT116 durchgeführt (Tabelle 4.1); hierunter wurde kein synergistischer Effekt gemessen (nicht gezeigt). Die Konzentration an Tigecyclin wurde daher auf 15  $\mu\text{mol/L}$  erhöht und für die nachfolgenden Versuche beibehalten.

Ähnliche Ergebnisse wie mit 5-FU wurden auch mit 1  $\mu\text{mol/L}$  Oxaliplatin erzielt (Abbildung 4.7). Die halbmaximale inhibitorische Konzentration von Oxaliplatin für kolorektale Karzinomzellen wurde ebenfalls in Vorexperimenten bestimmt (nicht gezeigt). Auch hier führte eine Vorbehandlung der Zellen mit Tigecyclin zu keiner zusätzlichen Steigerung des antiproliferativen Effekts von Oxaliplatin im Sinne einer Chemosensibilisierung (Abbildung 4.7). Die Ergebnisse für die drei nicht gezeigten kolorektalen Zelllinien zu den Kombinationsversuchen waren identisch.



**Abbildung 4.7: Tigecyclin verstärkt nicht den antiproliferativen Effekt von Oxaliplatin.** Die Werte (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) basieren auf drei voneinander unabhängigen Versuchen mit bis zu sechs technischen Replikaten. Die Zellen aller Versuchsgruppen wurden insgesamt für 72 Stunden kultiviert, die Anzahl vitaler Zellen mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und die Ergebnisse auf die unbehandelte Kontrolle ( $\gg 0$ ) berechnet. Verglichen wurden 15  $\mu\text{mol/L}$  Tigecyclin (Tigecyclin), 1  $\mu\text{mol/L}$  Oxaliplatin (Oxali) und die Kombination aus Tigecyclin (15  $\mu\text{mol/L}$ ) und Oxaliplatin (1  $\mu\text{mol/L}$ ) für 72 Stunden (Kombi). Auch eine Vorinkubation mit Tigecyclin (15  $\mu\text{mol/L}$ ) für 48 Stunden vor der Inkubation (zusätzlich) mit 1  $\mu\text{mol/L}$  Oxaliplatin für weitere 24 Stunden (+Oxali (1)) sowie eine Vorinkubation mit Tigecyclin für 24 Stunden vor der Inkubation (zusätzlich) mit Oxaliplatin für weitere 48 Stunden (+Oxali (2)) führten zu keiner Verstärkung des antiproliferativen Effekts. »ns«: nicht signifikant, »s«: signifikant;  $P < 0,05$  (Kapitel 3.10). Siehe auch Kommentar zu Abbildung 4.6.

#### 4.4 DER ANTIPROLIFERATIVE EFFEKT VON TIGECYCLIN IN DER MEHRTAGEKULTUR

Mit der verlängerten Kulturdauer von drei Tage (Abbildungen 4.3 und 4.4) auf sieben Tage (Abbildungen 4.8 und 4.9) sollte überprüft werden, ob der antiproliferative Effekt von Tigecyclin über den gesamten Zeitraum nachzuweisen ist oder die Zellen ihre Proliferationsfähigkeit zurückerhalten. Auch sollte für diesen Zeitraum untersucht werden, ob die Zellproliferation wiedereinsetzt, nachdem Tigecyclin nach einer Inkubationszeit von drei Tagen aus den Versuchsansätzen

entfernt wurde. Dazu wurde zu den Inkubationszeiten von drei, fünf und sieben Tagen die Anzahl vitaler Zellen mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt.

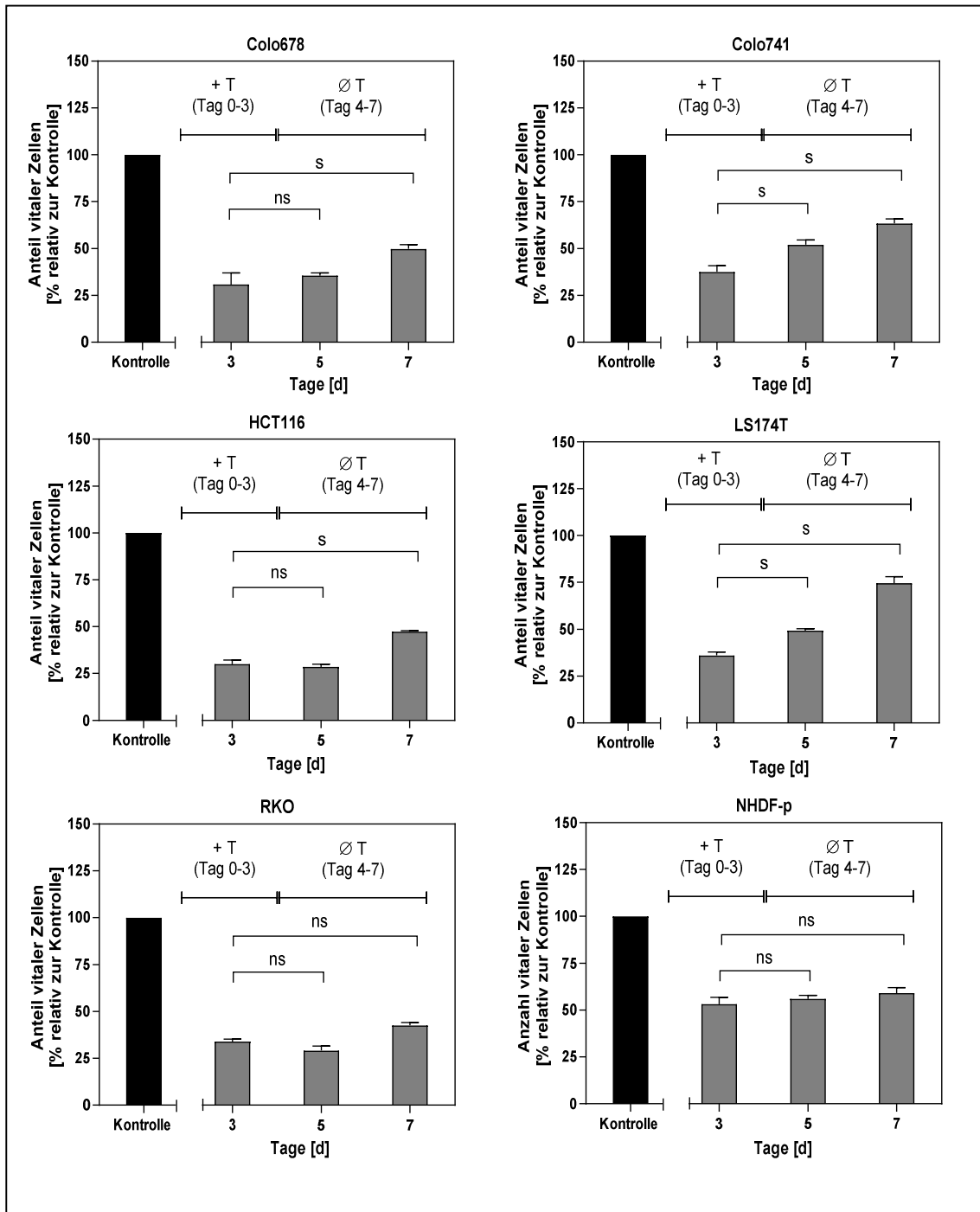
Für die in den Abbildungen 4.3 und 4.4 dargestellten Ergebnisse wurden  $5 \times 10^3$  Zellen pro Vertiefung einer Zellkulturschale mit 96 Vertiefungen ausgesät und mit den in Kapitel 4.1 festgelegten Konzentrationen an Tigecyclin inkubiert (Ausnahme: HCT 116 mit  $15 \mu\text{mol/L}$ ; s. Kommentar zu Abbildung 4.6). An Tag 3 wurden die mit Tigecyclin behandelten Zellen nach dem Mediumwechsel in zwei Versuchsgruppen unterteilt: Während die eine Hälfte der Zellen weiter mit Tigecyclin inkubiert wurde, wurde die andere Hälfte in Tigecyclin-freiem Medium kultiviert; beide Gruppen wurden bis Tag 7 kultiviert. Die Ergebnisse sind entsprechend den Versuchsbedingungen in Abbildung 4.8 und 4.9 dargestellt. Diese sind im Einzelnen:

**(1) Zellen, die bis Tag 3 mit Tigecyclin inkubiert wurden.** Wie erwartet, war der antiproliferative Effekt von Tigecyclin für diesen Zeitraum eindeutig (Abbildung 4.8) und ist als Bestätigung der bisherigen Ergebnisse zu werten (Abbildung 4.3). Der Anteil vitaler Zellen verringerte sich bei den kolorektalen Zelllinien um mehr als 50 % (Abbildung 4.8).

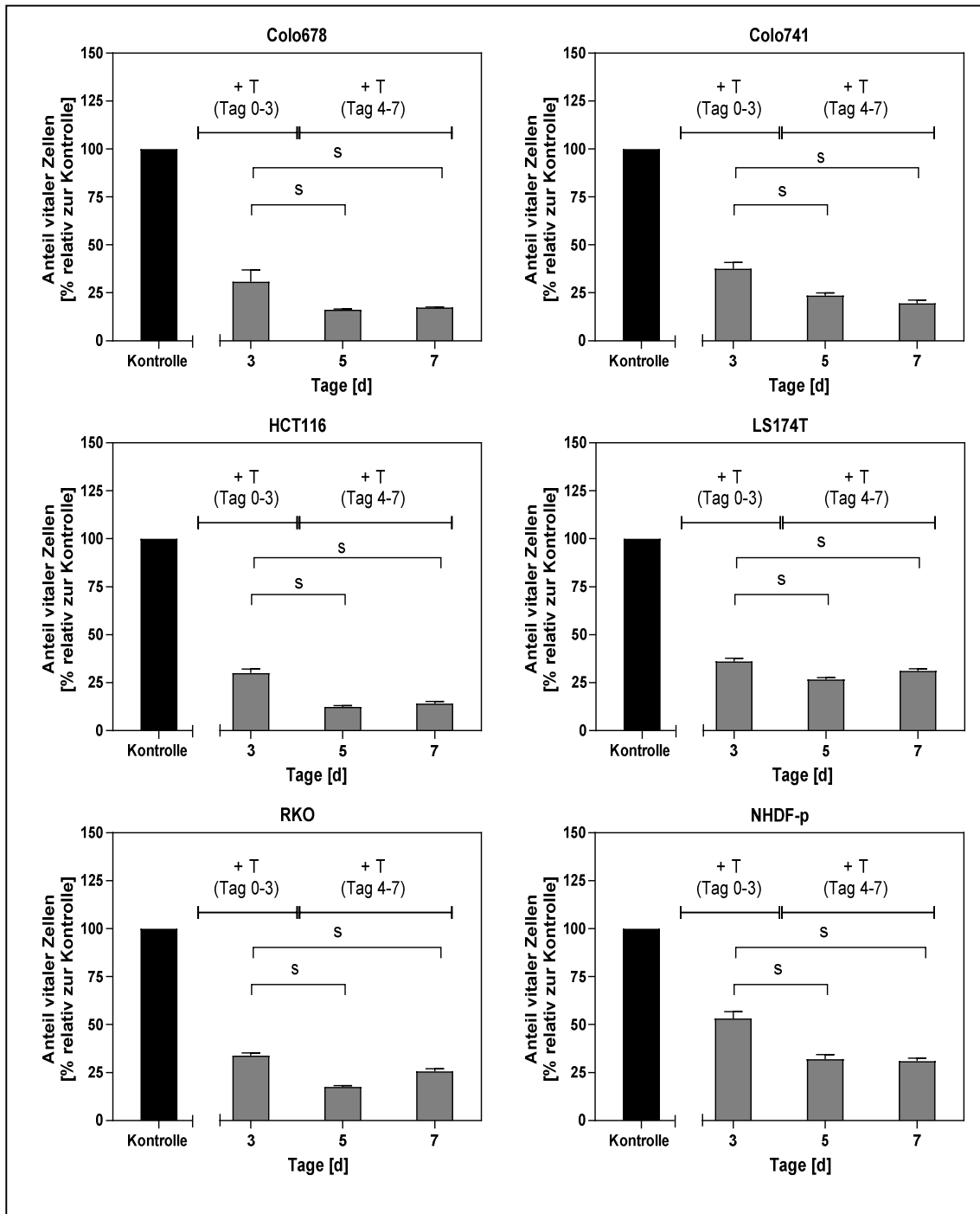
**(2) Zellen, die bis Tag 3 mit Tigecyclin inkubiert und danach ohne Tigecyclin ( $\emptyset$  T) bis Tag 7 weiter kultiviert wurden.** Die Zellproliferation lag zwar weiterhin deutlich unter der unbehandelten Kontrolle, doch war eine Zunahme vitaler Tumorzellen an Tag 5 und Tag 7 um bis zu 25 % unverkennbar. Die nach Entfernen von Tigecyclin aus dem Zellkulturüberstand einsetzende Zellproliferation erscheint für schnell wachsende Zellen der Zelllinien Colo678, Colo741, HCT116 und LS174T (s. hierzu auch die Verdopplungszeiten der kolorektalen Zelllinien in Tabelle 4.2) stärker als für die langsam wachsenden Zellen der Zelllinie RKO und NHDF-p (Abbildung 4.8). Das Ergebnis zeigt, dass Tumorzellen ihre Proliferation wiederaufnehmen, sobald Tigecyclin aus den Zellkulturen entfernt wird. Dies lässt auf die Notwendigkeit einer dauerhaften Präsenz von Tigecyclin schließen, um den antiproliferativen Effekt aufrecht zu erhalten.



**Zellen, die bis Tag 7 mit Tigecyclin inkubiert wurden (inkl. Mediumwechsel an Tag 3).** Die erneute Zugabe von Tigecyclin mit dem Mediumwechsel führte zu einer Steigerung des antiproliferativen Effektes. So lag für die kolorektale Zelllinie Colo741 der Anteil vitaler Zellen an Tag 5 bei 24 % und an Tag 7 bei 20 % (Abbildung 4.9). Zudem löste der an Tag 3 durchgeführte Mediumwechsel keinen Proliferationsschub bei Tigecyclin-behandelten Zellen aus im Ggs. zu unbehandelten Zellen (nicht gezeigt).



**Abbildung 4.8: Der antiproliferative Effekt von Tigecyclin in der Mehrtagekultur.** Die Zellen wurden bis Tag 3 mit Tigecyclin inkubiert (+T). An Tag 3 erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen wurden mit Tigecyclin-freiem Medium bis Tag 7 weiterkultiviert (∅ T). Die Anzahl vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und auf die unbehandelte Kontrolle (=100 %) normalisiert. Die Werte (Mittelwert ± Standardabweichung) basieren auf drei voneinander unabhängigen Versuchen mit bis zu sechs technischen Replikaten. »ns«: nicht signifikant, »s«, signifikant, P < 0,05 (Kapitel 3.10). Der Anteil vitaler Zellen der unbehandelten Kontrolle wurde an den Tagen 3, 5 und 7 bestimmt. Im Diagramm ist Tag 7 gezeigt.



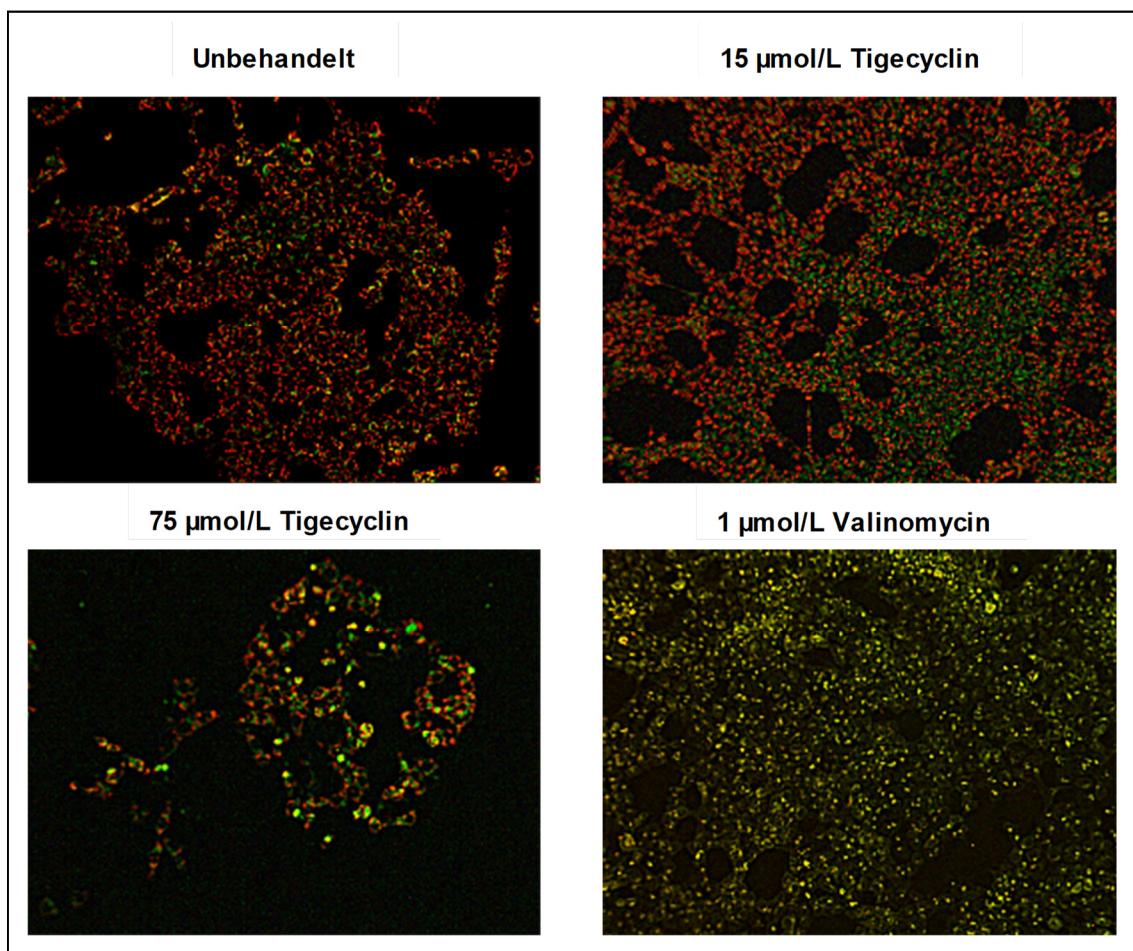
**Abbildung 4.9: Der antiproliferative Effekt von Tigecyclin in der Mehrtagekultur.** Die Zellen wurden für sieben Tage mit Tigecyclin kultiviert. An Tag 3 erfolgte ein Mediumwechsel bei dem die Zellen erneut mit Tigecyclin bis Tag 7 inkubiert wurden. Die Anzahl vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und auf die Kontrolle (=100 %) normalisiert. Die Werte (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) basieren auf drei voneinander unabhängigen Versuchen mit bis zu sechs technischen Replikaten. »ns«: nicht signifikant, »s«, signifikant;  $P < 0,05$  (Kapitel 3.10). Der Anteil vitaler Zellen der unbehandelten Kontrolle wurde an den Tagen 3, 5 und 7 bestimmt. Im Diagramm ist Tag 7 gezeigt.

#### **4.5 DIE WIRKUNG VON TIGECYCLIN AUF DIE ATMUNGSKETTE**

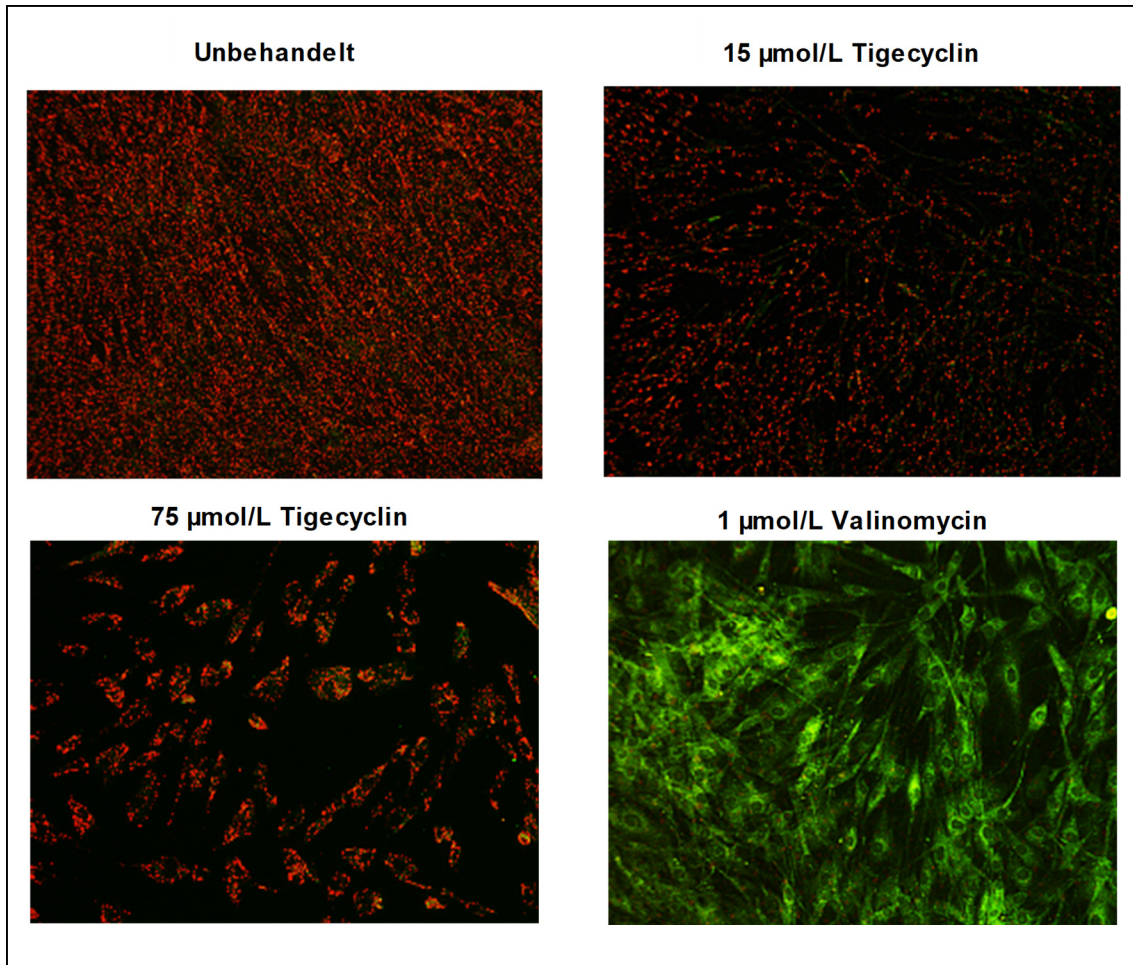
Tigecyclin bindet an mitochondriale Ribosomen und hemmt die Proteinbiosynthese mitochondrial kodierter, am Aufbau der Atmungskettenkomplexe beteiligter Proteine, wodurch sich die Aktivität der Atmungskettenkomplexe verringert (Kapitel 1.4). Ziel der Untersuchungen am Fluoreszenzmikroskop war zu klären, ob Tigecyclin tatsächlich zu einer Beeinträchtigung der Atmungskette führt. Als Indikatorfarbstoff zur Prüfung der Funktion der Atmungskette wurde JC-1 verwendet. In der Matrix unbeschädigter Mitochondrien mit einem intakten, elektrochemischen (und polarisierten) Potentialgradienten (Abbildung 1.1) bildet JC-1 rot-fluoreszierende J-Aggregate, während bei einem zerstörten elektrochemischen (und depolarisierten) Potentialgradienten die Bildung von J-Aggregaten ausbleibt und JC1 als grün-fluoreszierende Monomere vorliegt (Kapitel 3.8).

Für die Versuche wurden jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen von HCT116 und Fibroblasten ausgesät und für 24 Stunden mit  $15 \mu\text{mol/L}$  und  $75 \mu\text{mol/L}$  Tigecyclin inkubiert (Abbildung 4.5). Anschließend wurden die mit JC-1 gefärbten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Fluoreszenzbilder (Abbildung 4.10 und 4.11) wurden mit dem Programm »BZ-II-Analyzer«, Unterprogramm »Hybrid Cell Count« (Keyence) ausgewertet und die Ergebnisse mit dem Programm GraphPad Prism 6 grafisch dargestellt (Abbildung 4.12). Die Fluoreszenzbilder von HCT116 (Abbildung 4.10) und Fibroblasten (Abbildung 4.11) zeigen, dass der Anteil grün fluoreszierender Monomere mit steigender Tigecyclin-Konzentration zunahm, d. h. Tigecyclin tatsächlich das mitochondriale Membranpotential konzentrationsabhängig depolarisiert. Dabei war der Anstieg grüner Fluoreszenz bei HCT116 stärker als bei Fibroblasten (Abbildung 4.11). So war für HCT116 bei  $15 \mu\text{mol/L}$  Tigecyclin eine Zunahme von grüner Fluoreszenz von 23 % und bei  $75 \mu\text{mol/L}$  Tigecyclin von 47 % im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen nachzuweisen. Bei Fibroblasten dagegen stieg die grüne Fluoreszenz bei  $15 \mu\text{mol/L}$  Tigecyclin um 16 % und bei  $75 \mu\text{mol/L}$  Tigecyclin um 27 % im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen an.

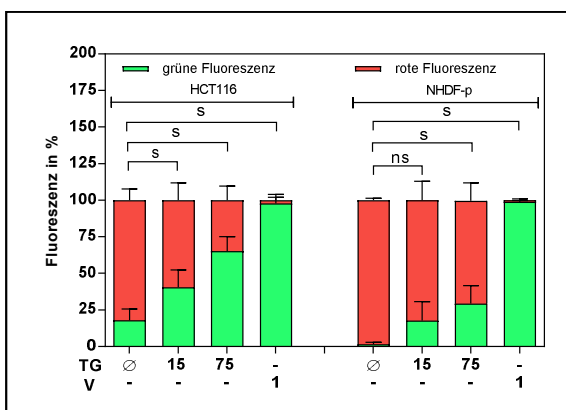
Die quantitative Auswertung der Daten (Abbildung 4.12) deutet darauf hin, dass Tigecyclin die Funktion der mitochondrialen Atmungskette durch Auslösen einer Depolarisierung beeinträchtigt, mit negativen Konsequenzen für die ATP-Bildung (nicht gemessen). Des Weiteren zeigen die Daten, dass bei HCT116 mit höheren Konzentrationen an Tigecyclin (75  $\mu\text{mol/L}$ ) die Anzahl an Zellen mit depolarisierter Atmungskette in den Mitochondrien stärker ansteigt als bei Fibroblasten. Die Ergebnisse zur Mitochondrienfunktion bestätigen die Daten zur Zellproliferation und Zellvitalität, dass der antiproliferative Effekt von Tigecyclin bei HCT116 deutlich stärker auftritt als bei Fibroblasten (Abbildung 4.3 und 4.4).



**Abbildung 4.10: Der Effekt von Tigecyclin auf das mitochondriale Membranpotential kolorektaler Karzinomzellen.**  $5 \times 10^5$  Zellen (HCT116) wurden für 24 Stunden mit Tigecyclin inkubiert und anschließend die Zellen mit dem Farbstoff JC-1 gefärbt (Kapitel 3.8). Als Positivkontrolle wurden Zellen (HCT116) mit 1  $\mu\text{mol/L}$  Valinomycin inkubiert (wenige Sekunden). Grün fluoreszierende Zellen weisen eine Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials auf, rot fluoreszierende Zellen weisen dagegen ein intaktes, polarisiertes Membranpotential auf. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen.



**Abbildung 4.11: Der Effekt von Tigecyclin auf das mitochondriale Membranpotential von Fibroblasten.**  $5 \times 10^5$  Zellen wurden für 24 Stunden mit Tigecyclin inkubiert und mit dem Farbstoff JC-1 gefärbt. Zellen, die mit  $1 \mu\text{mol/L}$  Valinomycin inkubiert waren, wurden als Positivkontrolle eingesetzt. Grün fluoreszierende Zellen weisen eine Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials auf, rot fluoreszierende Zellen weisen dagegen ein intaktes, polarisiertes Membranpotential auf. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen.



zentration angegeben.

**Abbildung 4.12: Ergebnis der Auswertung der Fluoreszenzbilder.** Dargestellt ist der Anteil roter (polarisiertes Membranpotential) und grüner Fluoreszenz (depolarisiertes Membranpotential) für HCT116 und Fibroblasten für  $15 \mu\text{mol/L}$  und  $75 \mu\text{mol/L}$  Tigecyclin (TG). Valinomycin (V) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm BZ-II-Analyser, Unterprogramm »Hybrid Cell Count« (Keyence). »ns«: nicht signifikant, »s«, signifikant,  $P < 0,05$  (Kapitel 3.10). Die Ergebnisse sind als Mittelwert mit Standardabweichung von 2-3 unabhängigen Versuchen pro Kon-

#### 4.6 UNTERSUCHUNGEN ZUM TIGECYCLIN-INDUZIERTEN ZELLTOD

Eine durch Tigecyclin induzierte Depolarisierung der Atmungskette bei kolorektalen Karzinomzellen konnte gezeigt werden (Abbildung 4.12). Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Beeinträchtigung der Atmungskette, die vermutlich den antiproliferativen Effekt von Tigecyclin erklärt, auch zur Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose) führt. Ein gestörter Elektronenfluss an der Atmungskette (Abbildung 1.1) fördert die übermäßige Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die den intrinsischen Weg der Apoptoseinduktion initiieren (Kapitel 1.2).

Bei der intrinsischen Induktion von Apoptose werden bestimmte Enzyme, die Caspasen, aktiviert (Kapitel 1.2). Aufgrund ihrer Proteaseaktivität zählt der Nachweis aktivierter Caspase 3 als starker Hinweis darauf, dass Zellen sich in Apoptose befinden. Der Nachweis einer durch Tigecyclin induzierten Aktivierung von Caspase 3 war bisher erfolglos (Ren A et al., 2015; Yang R et al., 2016).

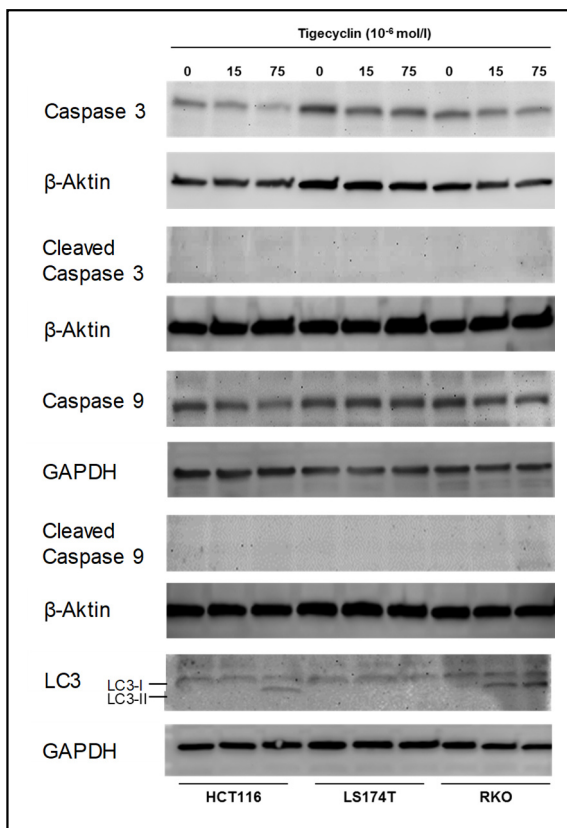
Eine andere Form der Apoptose stellt die Autophagozytose oder Autophagie dar. Diese kann der Apoptose vorausgehen oder als alternativer Weg von der Zelle beschritten werden. Auch hier kommt es zum Abbau zelleigener Strukturen, doch im Gegensatz zur Apoptose durch lysosomale Mechanismen (Tang C et al., 2014). Charakteristisch für Autophagie ist das Auftreten so genannter Autophagosomen, die über das Protein LC3-II verfügen, das sich als Marker für Autophagie etabliert hat (Mizushima N, 2004; Marino G et al., 2014).

Die kolorektalen Zelllinien HCT116, LS174T und RKO wurden im Western Blot untersucht. Hierfür wurden sie für 48 Stunden mit zwei Konzentrationen an Tigecyclin (15 und 75  $\mu\text{mol/L}$ ) inkubiert. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass weder aktivierte (*»cleaved«*) Caspase 9, noch aktivierte Effektor-Caspase 3 nachzuweisen waren (Abbildung 4.13). Damit fehlen eindeutige Hinweise auf eine durch Tigecyclin induzierte intrinsische Apoptose. Dieses Ergebnis findet Bestätigung in der Literatur (Ren A et al., 2015; Yang R et al., 2016).



Der Nachweis von LC3-II bei HCT116 bei einer Konzentration von 75 µmol/L Tigecyclin und bei RKO bereits ab einer Konzentration von 15 µmol/L Tigecyclin (und ebenfalls bei 75 µmol/L) deutet darauf hin, dass Tigecyclin einen auf Autophagozytose basierenden Zelltod induziert. Der fehlende Nachweis von LC3-II bei LS174T überrascht, da dieser bei RKO gelang, obwohl für diese Zelllinie ein höherer IC<sub>50</sub>-Wert für Tigecyclin bestimmt wurde als für LS174T (29,6 vs. 17,9 µmol/L; Tabelle 4.1). Aufgrund der gewählten Konzentrationen an Tigecyclin (15 und 75 µmol/L) für die Untersuchungen zum Zelltod wäre ein Nachweis von LC3-II auch in LS174T zu erwarten gewesen. Eine Erklärung hierzu steht noch aus.

Aufgrund der Komplexität der zur Induktion von Zelltod beteiligten molekularen Mechanismen sind zum jetzigen Zeitpunkt die Ergebnisse hierzu als Hinweis zu werten, dass Tigecyclin den Zelltod durch Autophagie auslöst. Weitere detaillierte Untersuchungen sind aber ohne Frage notwendig.



**Abbildung 4.13: Untersuchungen zur Expression von Caspase 3 und 9, »cleaved« Caspase 3 und 9 als Marker für Apoptose sowie LC3-II als Marker für Autophagie.** Aus Mitochondrien freigesetztes Cytochrom c ist über weitere Schritte an der Spaltung der Initiator-Caspase 9 beteiligt, die dadurch aktiviert wird. Aktivierte Caspase 9 (»cleaved« Caspase 9) aktiviert ihrerseits die Effektor-Caspase 3 (»cleaved« Caspase 3). Die Originalblots sind in Abb. 10.4 gezeigt, Positivkontrollen in Abb. 10.5. An der Entstehung von Autophagosomen (s. Text) wirken Ubiquitin-ähnliche-Proteinkomplexe mit wie z. B. LC3 (»microtubule-associated protein light chain 3«). LC3 wird in Form von pre-LC3 konstitutiv von der Zelle exprimiert und durch die Protease Atg 4 im Cytosol zu LC3-I umgewandelt. Kommt es zur Autophagozytose, bindet LC3-I an die entstehende Autophagosommembran und wird mithilfe von Phosphatidylethanolamin (PE) und Atg 7 zu LC3-II aktiviert. Das Molekulargewicht für Caspase 3 beträgt 35 kDa, für »cleaved« Caspase 3 17 bzw. 19 kDa, für Caspase 9 47 kDa, für »cleaved« Caspase 9 35 kDa, für LC3-I 17 kDa und für LC3-II 14-15 kDa. Gezeigt sind die Ergebnisse eines Versuches. Weitere Informationen zu den Primäranti-

körpern siehe Tabelle 3.6. Die Originalblots sind im Anhang in Abbildung 10.4 aufgeführt.



## 5 BEANTWORTUNG DER FRAGEN

---

### **1. Weist Tigecyclin einen antiproliferativen Effekt bei kolorektalen Karzinomzellen auf? Ist dieser reversibel?**

Für Tigecyclin wurde ein antiproliferativer Effekt bei kolorektalen Karzinomzellen nachgewiesen (Abbildung 4.3 & 4.4). Ein Zusammenhang zwischen der Verdopplungszeit der Zelllinien und der Stärke des antiproliferativen Effektes deutet sich an, bleibt aufgrund der geringen Anzahl an untersuchten Zelllinien jedoch eine Vermutung (Abbildung 4.2). Der Vergleich der halbmaximalen inhibitorischen Konzentrationen zeigt zudem, dass der antiproliferative Effekt von Tigecyclin bei adulten Fibroblasten deutlich geringer ist (Tabelle 4.1). Der antiproliferative Effekt von Tigecyclin war reversibel (Abbildung 4.8).

### **2. Welche Qualität (Zytostase, Zytotoxizität) weist der antiproliferative Effekt von Tigecyclin auf? Verstärkt Tigecyclin den antiproliferativen Effekt von 5-Fluoruracil und Oxaliplatin?**

Der antiproliferative Effekt von Tigecyclin basiert sowohl auf zytostatischen als auch zytotoxischen Eigenschaften (Abbildung 4.4). Bei einer Konzentration von 10 µmol/L Tigecyclin und einer Inkubationszeit von 72 Stunden waren überwiegend zytostatische Effekte (Ausnahme: HCT116) und bei der maximalen Konzentration von 100 µmol/L Tigecyclin zytotoxische Effekte nachzuweisen. Durch Tigecyclin wurde der antiproliferative Effekt von 5-Fluoruracil und Oxaliplatin nicht verstärkt (Abbildung 4.6 & 4.7).

### **3. Wird durch Tigecyclin die Funktion der Atmungskette beeinflusst und führt dies zum programmierten Zelltod?**

Mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1 wurde gezeigt, dass Tigecyclin eine Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials auslöst, was auf eine defekte Funktion der Atmungskette (mit unzureichender ATP-Produktion) hindeutet. Inwieweit dies zum Tod der Zelle führt, konnte nicht eindeutig geklärt werden, auch wenn es Hinweise darauf gibt, dass Tigecyclin Autophagie induziert.

## 6 DISKUSSION

---

Für Antibiotika wie Tigecyclin ist ein antiproliferativer Effekt an Zellen zahlreicher Tumorzelllinien belegt (Skrtic M et al., 2011; Tang C et al., 2014; Li H et al., 2015; Ren A et al., 2015; Yang R et al., 2016; Zhong X et al., 2016; Lu Z et al., 2017; Tan J et al., 2017; Wang B et al., 2017). Erklärt wird dieses interessante Phänomen mit der strukturellen Ähnlichkeit von prokaryotischen und mitochondrialen Ribosomen (Kapitel 1.2). In eukaryotischen Zellen wirkt Tigecyclin über die Hemmung der mitochondrialen Proteinbiosynthese durch Bindung an die kleine Untereinheit (28S) der Ribosomen und führt damit zum Abbruch der Translation (Skrtic M et al., 2011; Lamb R et al., 2015). Inwieweit wesentliche der durch Tigecyclin ausgelösten Effekte, wie die in dieser Arbeit gezeigte Depolarisierung der Atmungskette bei kolorektalen Karzinomzellen, in Zusammenhang mit einer Hemmung der mitochondrialen Translation steht, wird vor dem Hintergrund eigener und Literaturdaten diskutiert. Darüber hinaus wird ein bisher weniger bekannter Wirkmechanismus von Tigecyclin, die direkte Beeinflussung proliferationsfördernder Signalwege, für das kolorektale Karzinom diskutiert.

### 6.1 ZUM ANTIPROLIFERATIVEN EFFEKT VON TIGECYCLIN: SELEKTIVITÄT UND PHARMAKOLOGISCHER SYNERGISMUS

In dieser Arbeit wurde ein antiproliferativer Effekt von Tigecyclin an kolorektalen Karzinomzellen gezeigt. Dabei reichen die gemessenen  $IC_{50}$ -Werte von 5,6 bis 29,6  $\mu\text{mol/L}$  Tigecyclin (Tabelle 4.1), einem Konzentrationsbereich, der auch für andere Tumorzelllinien beschrieben ist (Skrtic M et al., 2011; Lamb R et al., 2015; Jia X et al., 2016; Yang R et al., 2016). Abhängig von der getesteten Zelllinie und der Konzentration an Tigecyclin waren zytostatische und auch zytotoxische Effekte nachzuweisen (Abbildung 4.4). Mit 64,5  $\mu\text{mol/L}$  lag der  $IC_{50}$ -Wert für Tigecyclin bei Fibroblasten deutlich über den  $IC_{50}$ -Werten bei kolorektalen Karzinomzellen, was auf ein empfindlicheres Ansprechen von Tumorzellen auf Tigecyclin im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen hindeutet. Ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/L}$  Tigecyclin war ein signifikanter Rückgang an vitalen Zellen auch bei Fibroblasten nachzuweisen (Abbildung 4.3 und 4.4).

Dieser für kolorektale Karzinomzellen selektivere antiproliferative Effekt von Tigecyclin, der sich aus den eigenen Daten ableiten lässt, ist auch für andere Tumorzelllinien beschrieben (Skrtic M et al., 2011; Yang R et al., 2016; Fu X et al., 2017; Lu Z et al., 2017; Tan J et al., 2017). Nach Fu et al. lässt sich der für Tumorzellen selektive antiproliferative Effekt von Tigecyclin damit erklären, dass transformierte Zellen stärker vom oxidativen Stoffwechsel abhängig sind, als nicht transformierte Zellen (Fu X et al., 2017). Diese Vermutung, die die Autoren auf Basis ihrer Untersuchungen mit Leukämiezellen äußerten, ist mit dem Wirkmechanismus von Tigecyclin vereinbar, der auf der Hemmung der mitochondrialen Proteinbiosynthese mit negativen Auswirkungen auf die Funktion der Atmungskette basiert (Kapitel 6.2). Doch bleibt fraglich, ob dies auch für Tumorzellen gilt, die einen Warburg-Effekt (Kapitel 1.3) aufweisen und sich hierdurch (auf Grundlage einer Forcierung ihrer Glykolyse) bereits von der mitochondrialen Atmungskette unabhängiger gemacht haben. Untersuchungen hierzu werden vermutlich zu differenzierten Erkenntnissen über die von Tigecyclin ausgelösten Effekte bei Tumorzellen mit unterschiedlicher Ausprägung des Warburg-Effektes beitragen.

Von klinischer Relevanz sind ohne Frage Untersuchungen zu möglichen synergistischen Effekten zwischen Tigecyclin und Chemotherapeutika. Belegt sind z. B. synergistische Effekte zwischen Tigecyclin und Paclitaxel (Wang B et al., 2017), Doxorubicin (Fu X et al., 2017), Cytarabin und Daunorubicin (Skrtic M et al., 2011), Cisplatin (Tan J et al., 2017) sowie Vincristin (Fu X et al., 2017). Unabhängig davon, dass die molekularen Grundlagen dieser bestätigten pharmakologischen Synergismen noch weitgehend unbekannt sind und Schlussfolgerungen nicht ohne weiteres auf die eigene Arbeit übertragbar sind, wurde Tigecyclin und zwei Standardchemotherapeutika zur Behandlung des kolorektalen Karzinoms, 5-FU und Oxaliplatin (Leitlinienprogramm Onkologie S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2017) auf mögliche synergistische Effekte untersucht. Die Ergebnisse der Arbeit belegen, dass synergistische Effekte nicht nachweisbar waren (Abbildung 4.6 und 4.7). Zudem bleibt die Feststellung, dass der von Tan et al. beschriebene synergistische Effekt zwischen Tigecyclin und

Cisplatin für Oxaliplatin, einem weiteren Platinderivat mit gleichem Wirkmechanismus (Dasari S et al., 2014), in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Als mögliche Erklärung für dieses widersprüchliche Ergebnis kann der Hinweis angeführt werden, dass Zellen unterschiedlicher Tumorentitäten für die Untersuchungen verwendet wurden: Tan et al. haben Zellen des hepatozellulären Karzinoms eingesetzt und für die vorliegende Arbeit wurden Zellen des kolorektalen Karzinoms untersucht.

## **6.2 ZUM ANTIPROLIFERATIVEN EFFEKT VON TIGECYCLIN: MITOCHONDRIALE PROTEINBIOSYNTHESE UND ATMUNGSKETTE**

Tigecyclin induziert eindeutig antiproliferative Effekte bei kolorektalen Karzinomzellen für eine Inkubationszeit von 72 Stunden (Abbildung 4.3). Um zu prüfen, ob der während dieser Zeit nachweisbare antiproliferative Effekt von Tigecyclin reversibel ist, wurden die Zellen nach diesen 3 Tagen nach einem Mediumwechsel mit und ohne Tigecyclin bis Tag 7 weiterkultiviert (Kapitel 4.4). Die Ergebnisse zeigen, dass nach Entfernen von Tigecyclin aus den Zellkulturen dessen antiproliferativer Effekt zwar abnahm, doch der Anteil vitaler Zellen weiterhin deutlich unterhalb der unbehandelten Kontrolle blieb (Abbildung 4.8). Andererseits war der antiproliferative Effekt von Tigecyclin durch eine weitere Zugabe an Tag 3 zu verstärken (Abbildung 4.9).

Der antiproliferative Effekt von Tigecyclin bei Tumorzellen ist unbestreitbar, der zugrundeliegende Mechanismus aber nicht zweifelsfrei geklärt. Es kann sicher davon ausgegangen werden, dass Tigecyclin an die kleine Untereinheit mitochondrialer Ribosomen bindet und damit die Translation von mitochondrialer DNA (mtDNA) kodierter Proteine hemmt (Kapitel 1.4). Ungeklärt bleibt, ob dies zu Defekten an den Atmungskettenkomplexen führt, wenn die Biosynthese der mitochondrial-kodierten Proteine gestört ist (Kapitel 1.2) und ob dies ein Auslöser für Apoptose darstellt. Mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Tigecyclin zum Zusammenbruch des elektrochemischen Potentialgradienten (Abbildung 1.1) führt (Abbildung 4.10). JC-1 fluoresziert bei unbeschädigten Mitochondrien rot und bei geschädigten Mitochondrien grün

(Kapitel 3.8). Tigecyclin führte bei kolorektalen Karzinomzellen konzentrationsabhängig zu einer Zunahme grün fluoreszierender Zellen; diese Zunahme war bei HCT116-Zellen stärker als bei Fibroblasten (Abbildung 4.9 und 4.10). Dieser für kolorektale Karzinomzellen gezeigte Effekt von Tigecyclin, das Membranpotential der Atmungskette zu depolarisieren (Abbildung 1.1), ist auch für Zellen anderer Tumorentitäten beschrieben (Skrtic M et al., 2011; Jia X et al., 2016; Lu Z et al., 2017; Tan J et al., 2017). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde in Gegenwart von Tigecyclin ein verminderter Sauerstoffverbrauch im Vergleich zu unbehandelten Zellen gemessen (Skrtic M et al., 2011; Jia X et al., 2016; Fu X et al., 2017; Lu Z et al., 2017; Tan J et al., 2017). Auch eine vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (»reactive oxygen species« oder ROS) wurde beobachtet (Fu X et al., 2017; Tan J et al., 2017), wobei andere Arbeiten dies nicht bestätigen konnten (Skrtic M et al., 2011; Lu Z et al., 2017). Bei ROS handelt es sich um die für den Organismus schädliche Form des Sauerstoffs, die durch eine unzureichende Reduktion von molekularem Sauerstoff (Kapitel 1.2) an der Atmungskette entstehen (Li N et al., 2003; Grivennikova VG et al., 2013) und Zellstrukturen wie DNA und Protein zerstören (Smiraglia DJ et al., 2008).

Um zu prüfen, ob der wesentliche Mechanismus von Tigecyclin, die Inhibition der mitochondrialen Proteinbiosynthese, tatsächlich die Expression von Proteinen der Atmungskettenkomplexe (Abbildung 1.1) beeinflusst, wurden die Proteine des Atmungskettenkomplexes IV, der sowohl über mitochondrial als auch nukleär kodierte Proteine verfügt (Kapitel 1.2), untersucht. Dabei zeigte sich, dass durch Tigecyclin die mitochondrial kodierten Cytochrom c-Oxidasen (Cox) 1 und 2 deutlich vermindert exprimiert waren, wohingegen die nukleär kodierte Cytochrom c-Oxidase 4 in ihrer Expression nicht beeinflusst war (Skrtic M et al., 2011; Lu Z et al., 2017). Diese Ergebnisse konnten mit Untersuchungen am Nierenzellkarzinom und hepatozellulären Karzinom bestätigt werden (Tan J et al., 2017; Wang B et al., 2017). Eine Deaktivierung des mitochondrialen Elongationsfaktors Tu (EF-Tu), der die Translation der Proteinbiosynthese ermöglicht, führte ebenfalls zu einer verminderten Expression der Cytochrom c-

Oxidase 1 und 2, nicht aber von der Cytochrom-c-Oxidase 4 (Skrtic M et al., 2011; Wang B et al., 2017).

Zellen der akuten myeloischen Leukämie, die über einen Zeitraum von 4 Monaten mit Tigecyclin-haltigem Medium kultiviert wurden, wiesen eine verminderte Expression der mitochondrial kodierten Proteine der Atmungskette auf, sowie einen verminderten Sauerstoffverbrauch und eine Hochregulierung der Glykolyse. Diese Charakteristika, in denen sich Tigecyclin-behandelte Zellen von unbehandelten unterscheiden, verschwanden, wenn die Zellen ohne Tigecyclin weiterkultiviert wurden (Jhas B et al., 2013; Zhao Y et al., 2013). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass Zellen dem antiproliferativen Effekt von Tigecyclin ausweichen können, wenn sie sich in ihrem Energiestoffwechsel durch Steigerung der Glykolyse von den Mitochondrien unabhängiger machen können (Jhas B et al., 2013; Zhao Y et al., 2013). Dabei sind insbesondere »uncoupling protein 2« (UCP2) und Tumorsuppressorproteine wie p53, dessen Gen (und damit auch das Protein) in mutierter Form auch beim kolorektalen Karzinom vorkommt, von Bedeutung. Sie können die Balance zwischen oxidativen und nicht-oxidativen Stoffwechselwegen steuern (Harper ME et al., 2002; Zhou S et al., 2003; Kondoh H et al., 2005; Bensaad K et al., 2006).

Somit erscheint als logische Konsequenz des durch Tigecyclin induzierten Abbruchs der ribosomalen Proteinbiosynthese mitochondrial kodierter Proteine der Atmungskettenkomplexe eine Beeinträchtigung der Funktion der Atmungskette zu sein. Ein gestörter Elektronentransport kann durch die nicht vollständige Reduktion von Sauerstoff die Entstehung von ROS begünstigen entsprechend der Formel  $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- + \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$  (statt  $4\text{H}^+ + 4\text{e}^- + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$ ). Auch andere für Tigecyclin beschriebene mitochondriale Phänomene wie Depolarisierung des Membranpotentials und verminderter Sauerstoffverbrauch lassen sich ebenfalls als Konsequenz des Wirkmechanismus von Tigecyclin betrachten.

### 6.3 ZUM ANTIPROLIFERATIVEN EFFEKT VON TIGECYCLIN: APOPTOSE UND AUTO-PHAGIE

Mit den bisher zum antiproliferativen Effekt von Tigecyclin an Tumorzellen publizierten Daten kann nicht geklärt werden, ob durch die Tigecyclin-induzierte Depolarisierung des Membranpotentials (Kapitel 6.2) der programmierte Zelltod (Apoptose, Autophagie) induziert wird. Auch die eigenen Daten hierzu belegen nicht eindeutig, dass Tigecyclin Autophagie induziert (Abbildung 4.13). Der für den apoptotischen Zelltod notwendige Nachweis aktivierter Caspasen war im Gegensatz zum Autophagozytosemarker LC3-II erfolglos (Abbildung 4.13).

An Zellen des Magenkarzinoms und der chronisch myeloischen Leukämie wurde die Induktion von Autophagozytose durch Tigecyclin gezeigt (Tang C et al., 2014; Lu Z et al., 2017). Dieser Mechanismus scheint auch durch zahlreiche andere Chemotherapeutika ausgelöst zu werden (Daido S et al., 2004; Opipari AW, Jr. et al., 2004). Kim et al. konnten zeigen, dass die Autophagozytose sowohl von der Proteinbiosynthese als auch von der ATP-Produktion abhängig ist (Kim J et al., 2000). Gesunde Zellen nutzen diesen Mechanismus, um einerseits geschädigte Zellorganellen zu beseitigen, andererseits wird das aus dem Autophagosom freigesetzte zytoplasmatische Material den eigenen Stoffwechselwegen auch zur Energiegewinnung zugeführt (Debnath J et al., 2005; Elmore S, 2007). Mit Tigecyclin behandelte Zellen geraten durch Hemmung der mitochondrialen Proteinbiosynthese und dem dadurch ausgelösten Defekt an der Atmungskette (= Zusammenbruch des elektrochemischen Gradienten und verringerte Produktion von ATP) in eine Stresssituation, in der sie zur Autophagozytose neigen (Kroemer G et al., 2010).

An Zellen der chronischen myeloischen Leukämie (CML) konnten nach Behandlung mit Tigecyclin sowohl der Autophagozytosemarker LC3-II, als auch Spaltprodukte der aktivierten Caspasen 3 und 9 (*»cleaved«* Caspase 3 und 9) nachgewiesen werden (Lu Z et al., 2017). Möglicherweise ist Tigecyclin in der Lage, sowohl Autophagozytose als auch Apoptose auszulösen (Kapitel 4.6). Nach 48 stündiger Inkubation mit Tigecyclin war bei HCT116 und RKO der

Nachweis von Autophagozytose möglich (Abbildung 4.12). Untersuchungen von Maiuri et al. konnten zeigen, dass Autophagozytose der Apoptose vorausgehen kann (Maiuri MC et al., 2007). Basierend auf den Erkenntnissen von Maiuri et al. könnte der in dieser Arbeit gewählte Zeitpunkt (48 Stunden) für einen erfolgreichen Nachweis aktivierter Caspasen möglicherweise zu früh gewesen sein. Gegen diese Annahme spricht, dass bei Zellen der CML bei gleicher Inkubationszeit die Aktivierung von Caspase 3 und 9 im Western Blot nachzuweisen war (Lu Z et al., 2017).

#### **6.4 ZUM ANTIPROLIFERATIVEN EFFEKT VON TIGECYCLIN: BEEINFLUSSUNG PROLIFERATIONSFÖRDERNDER SIGNALWEGE**

Zusätzlich zu den bisher beschriebenen Effekten von Tigecyclin als Konsequenz einer Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese (Kapitel 6.2) wird immer deutlicher, dass Tigecyclin auch wichtige proliferationsfördernde Signalwege direkt beeinflusst.

Untersuchungen am Cervixkarzinom deuten darauf hin, dass Tigecyclin den in Tumorzellen häufig aktiven Wnt-Signalweg (Kapitel 1.1) beeinflusst (Li H et al., 2015). In gesunden Zellen wird dieser Signalweg durch den Liganden „Wnt“ induziert und dadurch der Abbau von  $\beta$ -Catenin (Kapitel 1.1) verhindert, was zu einer verstärkten Zellproliferation führt. Ohne Wnt-Ligand wird  $\beta$ -Catenin über einen Proteinkomplex, den sogenannten Degradationskomplex, abgebaut und die Zellproliferation behindert (Novellademunt L et al., 2015). Mutationen u. a. im APC-Gen (Kapitel 1.1) führen zu einer Erhöhung der zellulären Konzentration an  $\beta$ -Catenin und damit zu einer verstärkten Proliferation von Krebszellen (Novellademunt L et al., 2015). Durch Tigecyclin wurde eine Überexpression von Proteinen des Degradationskomplexes sowie eine Abnahme an  $\beta$ -Catenin beobachtet, was auf eine Suppression des Wnt-Signalweges hinweist (Li H et al., 2015). Dies könnte in Zusammenhang stehen mit einem beobachteten Zellzyklusarrest von Tigecyclin-behandelten Zellen (Ren A et al., 2015; Hu H et al., 2016; Yang R et al., 2016; Zhong X et al., 2016).



Auch eine Interaktion von Tigecyclin mit dem PI3/Akt/mTOR-Signalweg scheint es zu geben, der u. a. auch Autophagozytose induzieren kann (Tang C et al., 2014; Yang R et al., 2016; Zhong X et al., 2016; Lu Z et al., 2017; Wang B et al., 2017). Dieser Signalweg ist bei Krebszellen aufgrund von Mutationen häufig konstitutiv aktiviert und dabei wird über die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) eine Signalkaskade ausgelöst, bei der die Proteinkinase B, auch „Akt“ genannt, aktiviert wird. Akt ist ein Protoonkogen und führt über mehrere Zwischenschritte zur Hemmung des Zelltods und stimuliert direkt als auch indirekt den Zellzyklus. So kommt es durch Aktivierung von mTOR zu einer vermehrten Translation von Zellzyklusproteinen. Interessanterweise ist mTOR ein Suppressor von Autophagie (Akers S et al., 2012). Akt kann auch direkt im Zellzyklus den Übergang von der G1 zur S-Phase stimulieren, indem es die Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3) deaktiviert und somit eine Inaktivierung des Zellzyklusproteins Cyclin D verhindert. GSK-3 ist außerdem Teil des bereits erwähnten Wnt-Signalwegs und kann in seiner deaktivierten Form nicht mehr den Abbau von  $\beta$ -Catenin gewährleisten. Durch Tigecyclin konnte sowohl eine Suppression von Akt (Lu Z et al., 2017), als auch zahlreicher an der Signaltransduktion beteiligter Proteine, wie beispielsweise mTOR (Tang C et al., 2014; Wang B et al., 2017), beobachtet werden. Dies lässt vermuten, dass der antiproliferative Effekt von Tigecyclin u. a. auf der Suppression des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges beruht. Untersuchungen am Neuroblastom konnten zeigen, dass die durch Tigecyclin induzierte Suppression des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs durch Zugabe von IGF-1, einem bekannten Aktivator dieses Zellweges, aufgehoben werden konnte (Zhong X et al., 2016).

Auf Basis der Literaturdaten kann der ursprüngliche Wirkmechanismus von Tigecyclin, die Beeinträchtigung der Atmungskette als Resultat einer Hemmung der mitochondrialen Proteinbiosynthese, um einen weiteren Wirkmechanismus, die negative Beeinflussung proliferationsfördernder Signalwege, ergänzt werden. Dieser zusätzliche Wirkmechanismus von Tigecyclin kann auch für das kolorektale Karzinom relevant sein, da der Wnt-Signalweg für die kolorektale Karzinogenese von grundlegender Bedeutung ist (Kapitel 1.1).

## 7 AUSBLICK

---

Die vielversprechenden Ergebnisse zum antiproliferativen Effekt von Tigecyclin bei transformierten Zellen *in vitro* und *in vivo* (Kapitel 1.4) veranlassten Reed et al. zu einer Phase-I-Studie bei 27 Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML). In der Studie, die in Anlehnung an die antibiotische Anwendung einen Dosisbereich von 50-350 mg/Tag testete, zeigte sich bei keinem der Patienten ein Ansprechen auf die Therapie (Reed GA et al., 2016). Neben den bereits bekannten Nebenwirkungen wie Übelkeit und Erbrechen (Townsend ML et al., 2006) wurde vereinzelt das Auftreten von Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern beobachtet. Beim überwiegenden Teil der Studienteilnehmer traten nur leichte Nebenwirkungen auf.

Nicht nur aufgrund des Ergebnisses der Reed-Studie, sondern auch vor dem Hintergrund einer immer weiter umschgreifenden Antibiotikaresistenz ist der Einsatz von Antibiotika wie Tigecyclin als potentiell Antikrebsmittel kritisch zu hinterfragen. Aber das Wirkkonzept von Substanzen wie Tigecyclin, die duale Hemmung der mitochondrialen Proteinbiosynthese und proliferationsfördernder Signalwege von Krebszellen (Kapitel 6.4), erscheint weiterhin überaus attraktiv und sollte deshalb weiterverfolgt werden – zumal die Grundlage der Spezifität von Tigecyclin für maligne Zellen zumindest für Leukämiezellen gesichert zu sein scheint (Kapitel 6.1). Weiterführende Arbeiten sollten sich, ausgehend von dem hier gezeigten Nachweis der Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials (Abbildung 1.1) bei kolorektalen Karzinomzellen (Abbildung 4.10), mit den Auswirkungen einer solchen Depolarisierung, insbesondere auf die Generierung von ATP, Bildung reaktiver Sauerstoffradikale und den Sauerstoffverbrauch, beschäftigen. Hierzu wären Analysen im Seahorse XFe96 Analyzer (Agilent Technologies) sicherlich sehr vielversprechend. Auch sollten die zum Zelltod führenden Mechanismen im Detail untersucht werden. Hierfür wären Zelllinien, die unterschiedlich stark auf die Induktion intrinsischer Apoptose (Kapitel 4.6) reagieren, sicherlich hilfreich.

## 8 ZUSAMMENFASSUNG

---

In der vorliegenden Arbeit wurde der antiproliferative Effekt des Antibiotikums Tigecyclin an den fünf humanen kolorektalen Karzinomzelllinien HCT116, Colo678, Colo741, LS174T, RKO untersucht.

Der antiproliferative Effekt von Tigecyclin wurde als halbmaximale inhibitorische Konzentration oder  $IC_{50}$  bestimmt. Dabei war der antiproliferative Effekt von Tigecyclin für die untersuchten kolorektalen Karzinomzellen bei einer Inkubationszeit von drei Tagen mit  $IC_{50}$ -Werten von 5,6 bis 29,6  $\mu\text{mol/L}$  stärker als der für Fibroblasten (nicht-transformierte Kontrollzellen) mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 64,5  $\mu\text{mol/L}$ . Zum Nachweis eines antiproliferativen Effektes von Tigecyclin auch bei verlängerten Inkubationszeiten wurde das Medium nach drei Tagen gewechselt und die Zellen mit und ohne Tigecyclin bis Tag 7 weiterkultiviert. Ohne Tigecyclin nahm der antiproliferative Effekt leicht ab und damit der Anteil vitaler Zellen zu. Wurden kolorektale Karzinomzellen kontinuierlich mit Tigecyclin kultiviert, blieb der antiproliferative Effekt über den Zeitraum von sieben Tagen erhalten. Ein synergistischer Effekt zwischen Tigecyclin und 5-Fluoruracil bzw. Oxaliplatin war nicht nachzuweisen. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit dem Farbstoff JC-1 zeigen, dass Tigecyclin zu einem Zusammenbruch des elektrochemischen Potentialgradienten der mitochondrialen Atmungskette führte. Bei höheren Konzentrationen an Tigecyclin (75  $\mu\text{mol/L}$ ) nahm bei HCT116 die Anzahl an Zellen mit defekter Atmungskette in den Mitochondrien stärker zu als bei Fibroblasten. Einen Zusammenhang zwischen Depolarisierung und molekularen Mechanismen des Zelltods herzustellen, gelang bei zwei von fünf Tumorzelllinien (HCT116, RKO) durch Nachweis des Autophagiemarkers LC3-II.

Tigecyclin, das die mitochondriale Proteinsynthese hemmt und zum Translationsabbruch führt, weist antiproliferative Eigenschaften gegenüber kolorektalen Karzinomzelllinien auf. Die molekularen Grundlagen dieses selektiven antiproliferativen Effektes, insbesondere die zum Zelltod führenden, sind im Detail noch unbekannt.

## 9 LITERATURVERZEICHNIS

---

- Abu-Amero KK, Alzahrani AS, Zou M, Shi Y. High frequency of somatic mitochondrial DNA mutations in human thyroid carcinomas and complex I respiratory defect in thyroid cancer cell lines. *Oncogene* 2005; **24(8)**: 1455-1460.
- Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the Regulation of Autophagy: Cross Talk, Shortcuts, and Feedbacks. *Mol Cell Biol* 2012; **32(1)**: 2-11.
- Andersson SGE, Kurland CG. Origins of mitochondria and hydrogenosomes. *Current Opinion in Microbiology* 1999; **2(5)**: 535-541.
- Bailey KM, Wojtkowiak JW, Hashim AI, Gillies RJ. Targeting the metabolic microenvironment of tumors. *Adv Pharmacol* 2012; **65**: 63-107.
- Bauer G, Berens C, Projan SJ, Hillen W. Comparison of tetracycline and tigecycline binding to ribosomes mapped by dimethylsulphate and drug-directed Fe<sup>2+</sup> cleavage of 16S rRNA. *J Antimicrob Chemother* 2004; **53(4)**: 592-599.
- Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E, Vousden KH. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 2006; **126(1)**: 107-120.
- Bonuccelli G, Tsigos A, Whitaker-Menezes D, Pavlides S, Pestell RG, Chiavarina B, Frank PG, Flomenberg N, Howell A, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. Ketones and lactate "fuel" tumor growth and metastasis: Evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism. *Cell Cycle* 2010; **9(17)**: 3506-3514.
- Caballero-Benitez A, Moran J. Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: role of caspase-2. *J Neurosci Res* 2003; **71(3)**: 383-396.
- Cavalli LR, Varella-Garcia M, Liang BC. Diminished tumorigenic phenotype after depletion of mitochondrial DNA. *Cell Growth Differ* 1997; **8(11)**: 1189-1198.
- Chandra D, Singh KK. Genetic insights into OXPHOS defect and its role in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2011; **1807(6)**: 620-625.
- Daido S, Kanzawa T, Yamamoto A, Takeuchi H, Kondo Y, Kondo S. Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer Res* 2004; **64(12)**: 4286-4293.
- Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 2014; **740**: 364-378.
- Deberardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev* 2008; **18(1)**: 54-61.
- Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G. Does Autophagy Contribute To Cell Death? *Autophagy* 2005; **1(2)**: 66-74.
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; **35(4)**: 495-516.
- Emelyanov VV. Rickettsiaceae, rickettsia-like endosymbionts, and the origin of mitochondria. *Biosci Rep* 2001; **21(1)**: 1-17.
- Errichiello E, Venesio T. Mitochondrial DNA variants in colorectal carcinogenesis: Drivers or passengers? *J Cancer Res Clin Oncol* 2017; **143(10)**: 1905-1914.

- Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 2006; **9(6)**: 425-434.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; **61(5)**: 759-767.
- Flick DA, Gifford GE. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods* 1984; **68(1-2)**: 167-175.
- Fu X, Liu W, Huang Q, Wang Y, Li H, Xiong Y. Targeting mitochondrial respiration selectively sensitizes pediatric acute lymphoblastic leukemia cell lines and patient samples to standard chemotherapy. *Am J Cancer Res* 2017; **7(12)**: 2395-2405.
- Green DR. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 2005; **121(5)**: 671-674.
- Grivennikova VG, Vinogradov AD. Mitochondrial production of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* 2013; **78(13)**: 1490-1511.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; **144(5)**: 646-674.
- Hardwick JM, Soane L. Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; **5(2)**.
- Harper ME, Antoniou A, Villalobos-Menuet E, Russo A, Trauger R, Vendemelio M, George A, Bartholomew R, Carlo D, Shaikh A, Kupperman J, Newell EW, Bespalov IA, Wallace SS, Liu Y, Rogers JR, Gibbs GL, Leahy JL, Camley RE, Melamede R, Newell MK. Characterization of a novel metabolic strategy used by drug-resistant tumor cells. *FASEB J* 2002; **16(12)**: 1550-1557.
- Hu H, Dong Z, Tan P, Zhang Y, Liu L, Yang L, Liu Y, Cui H. Antibiotic drug tigecycline inhibits melanoma progression and metastasis in a p21CIP1/Waf1-dependent manner. *Oncotarget* 2016; **7(3)**: 3171-3185.
- Inai Y, Yabuki M, Kanno T, Akiyama J, Yasuda T, Utsumi K. Valinomycin induces apoptosis of ascites hepatoma cells (AH-130) in relation to mitochondrial membrane potential. *Cell Struct Funct* 1997; **22(5)**: 555-563.
- Jhas B, Sriskanthadevan S, Skrtic M, Sukhai MA, Voisin V, Jitkova Y, Gronda M, Hurren R, Laister RC, Bader GD, Minden MD, Schimmer AD. Metabolic adaptation to chronic inhibition of mitochondrial protein synthesis in acute myeloid leukemia cells. *PLoS One* 2013; **8(3)**: e58367.
- Jia X, Gu Z, Chen W, Jiao J. Tigecycline targets non-small cell lung cancer through inhibition of mitochondrial function. *Fundam Clin Pharmacol* 2016; **30(4)**: 297-306.
- Kim J, Klionsky DJ. Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 2000; **69**: 303-342.
- Kondoh H, Leonart ME, Gil J, Wang J, Degan P, Peters G, Martinez D, Carnero A, Beach D. Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer Res* 2005; **65(1)**: 177-185.
- Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 2010; **40(2)**: 280-293.
- Kuzmenko AV, Levitskii SA, Vinogradova EN, Atkinson GC, Haurlyuk V, Zenkin N, Kamenski PA. Protein biosynthesis in mitochondria. *Biochemistry (Mosc)* 2013; **78(8)**: 855-866.

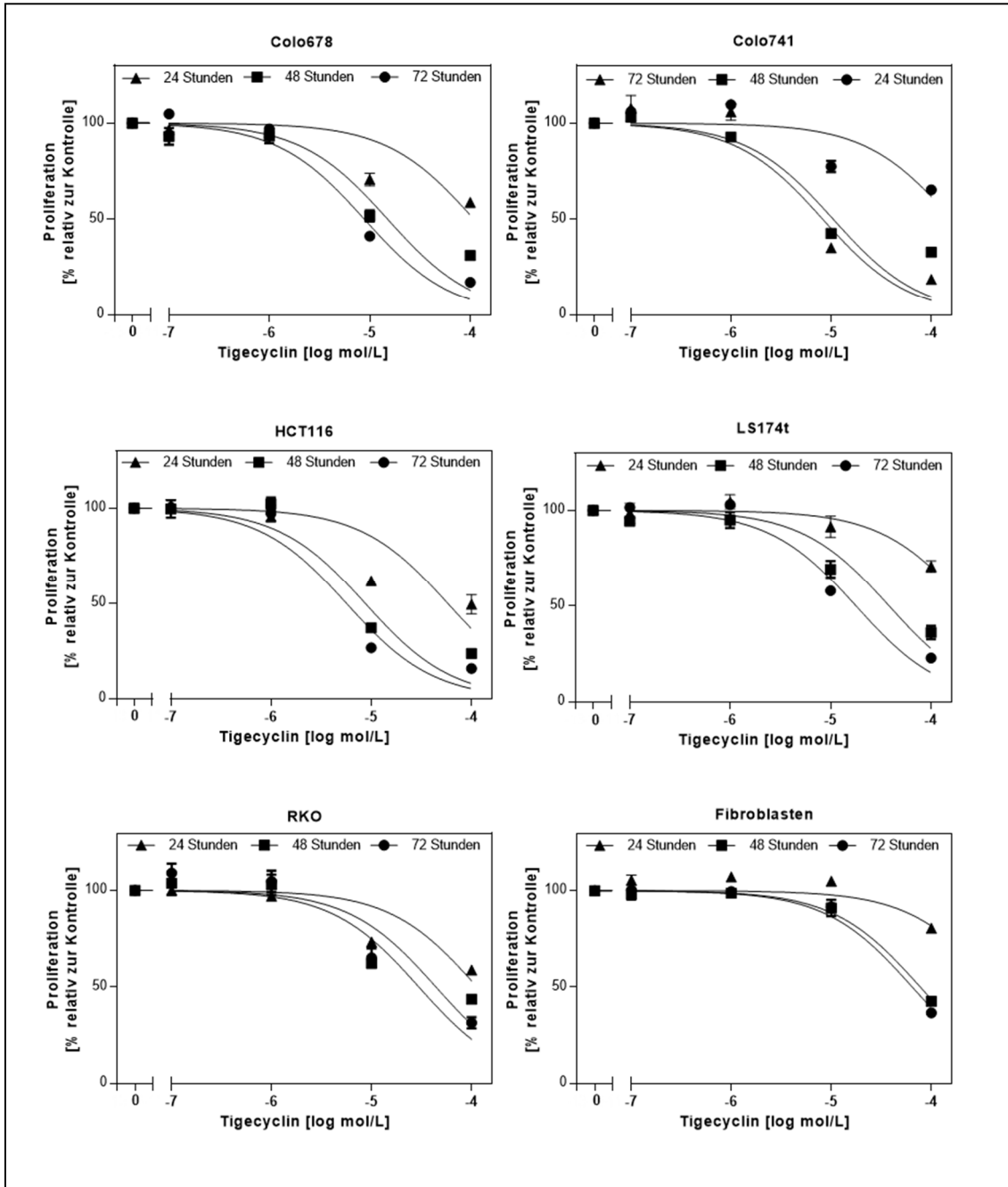
- Lamb R, Ozsvari B, Lisanti CL, Tanowitz HB, Howell A, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. Antibiotics that target mitochondria effectively eradicate cancer stem cells, across multiple tumor types: Treating cancer like an infectious disease. *Oncotarget* 2015; **6(7)**: 4569-4584.
- Leitlinienprogramm Onkologie S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. (2017). Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. (Registrierungsnummer: 021/007OL). <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/> [abgerufen am: 16.11.2017]
- Li H, Jiao S, Li X, Banu H, Hamal S, Wang X. Therapeutic effects of antibiotic drug tigecycline against cervical squamous cell carcinoma by inhibiting Wnt/beta-catenin signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; **467(1)**: 14-20.
- Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson JP. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem* 2003; **278(10)**: 8516-8525.
- Locasale JW, Cantley LC. Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth. *Cell Metab* 2011; **14(4)**: 443-451.
- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003; **3(5)**: 330-338.
- Lu Z, Xu N, He B, Pan C, Lan Y, Zhou H, Liu X. Inhibition of autophagy enhances the selective anti-cancer activity of tigecycline to overcome drug resistance in the treatment of chronic myeloid leukemia. *J Exp Clin Cancer Res* 2017; **36(1)**: 43.
- Magda D, Lecane P, Prescott J, Thiemann P, Ma X, Dranchak PK, Toleno DM, Ramaswamy K, Siegmund KD, Hacia JG. mtDNA depletion confers specific gene expression profiles in human cells grown in culture and in xenograft. *BMC Genomics* 2008; **9**: 521.
- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8(9)**: 741-752.
- Marino G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; **15(2)**: 81-94.
- McKeown SR. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. *Br J Radiol* 2014; **87(1035)**: 20130676.
- Mizushima N. Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36(12)**: 2491-2502.
- Mohelnikova-Duchonova B, Melichar B, Soucek P. FOLFOX/FOLFIRI pharmacogenetics: the call for a personalized approach in colorectal cancer therapy. *World J Gastroenterol* 2014; **20(30)**: 10316-10330.
- Morais R, Zinkewich-Peotti K, Parent M, Wang H, Babai F, Zollinger M. Tumor-forming ability in athymic nude mice of human cell lines devoid of mitochondrial DNA. *Cancer Res* 1994; **54(14)**: 3889-3896.
- Moreno-Sanchez R, Rodriguez-Enriquez S, Marin-Hernandez A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J* 2007; **274(6)**: 1393-1418.
- Novellasmunt L, Antas P, Li VS. Targeting Wnt signaling in colorectal cancer. A Review in the Theme: Cell Signaling: Proteins, Pathways and Mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015; **309(8)**: C511-521.

- Olson MW, Ruzin A, Feyfant E, Rush TS, 3rd, O'Connell J, Bradford PA. Functional, biophysical, and structural bases for antibacterial activity of tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50(6)**: 2156-2166.
- Opipari AW, Jr., Tan L, Boitano AE, Sorenson DR, Aurora A, Liu JR. Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2004; **64(2)**: 696-703.
- Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 2006; **25(34)**: 4633-4646.
- Polyak K, Li Y, Zhu H, Lengauer C, Willson JK, Markowitz SD, Trush MA, Kinzler KW, Vogelstein B. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nat Genet* 1998; **20(3)**: 291-293.
- Reed GA, Schiller GJ, Kambhampati S, Tallman MS, Douer D, Minden MD, Yee KW, Gupta V, Brandwein J, Jitkova Y, Gronda M, Hurren R, Shamas-Din A, Schuh AC, Schimmer AD. A Phase 1 study of intravenous infusions of tigecycline in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer Med* 2016; **5(11)**: 3031-3040.
- Reers M, Smith TW, Chen LB. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry* 1991; **30(18)**: 4480-4486.
- Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem* 1979; **254(8)**: 2669-2676.
- Ren A, Qiu Y, Cui H, Fu G. Tigecycline exerts an antitumoral effect in oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 2015; **21(5)**: 558-564.
- Rich PR, Marechal A. The mitochondrial respiratory chain. *Essays Biochem* 2010; **47**: 1-23.
- Sebaugh JL. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharm Stat* 2011; **10(2)**: 128-134.
- Skrtec M, Sriskanthadevan S, Jhas B, Gebbia M, Wang X, Wang Z, Hurren R, Jitkova Y, Gronda M, Maclean N, Lai CK, Eberhard Y, Bartoszko J, Spagnuolo P, Rutledge AC, Datti A, Ketela T, Moffat J, Robinson BH, Cameron JH, Wrana J, Eaves CJ, Minden MD, Wang JC, Dick JE, Humphries K, Nislow C, Giaever G, Schimmer AD. Inhibition of mitochondrial translation as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2011; **20(5)**: 674-688.
- Smiraglia DJ, Kulawiec M, Bistulfi GL, Gupta SG, Singh KK. A novel role for mitochondria in regulating epigenetic modification in the nucleus. *Cancer Biol Ther* 2008; **7(8)**: 1182-1190.
- Tan AS, Baty JW, Dong LF, Bezawork-Geleta A, Endaya B, Goodwin J, Bajzikova M, Kovarova J, Peterka M, Yan B, Pesdar EA, Sobol M, Filimonenko A, Stuart S, Vondrusova M, Kluckova K, Sachaphibulkij K, Rohlena J, Hozak P, Truksa J, Eccles D, Haupt LM, Griffiths LR, Neuzil J, Berridge MV. Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA. *Cell Metab* 2015; **21(1)**: 81-94.
- Tan J, Song M, Zhou M, Hu Y. Antibiotic tigecycline enhances cisplatin activity against human hepatocellular carcinoma through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; **483(1)**: 17-23.
- Tang C, Yang L, Jiang X, Xu C, Wang M, Wang Q, Zhou Z, Xiang Z, Cui H. Antibiotic drug tigecycline inhibited cell proliferation and induced autophagy in gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; **446(1)**: 105-112.

- Tannapfel A, Neid M, Aust D, Baretton G. The origins of colorectal carcinoma: specific nomenclature for different pathways and precursor lesions. *Deutsches Ärzteblatt* 2010; **107(43)**: 760-766.
- Townsend ML, Pound MW, Drew RH. Tigecycline: a new glycylycylcline antimicrobial. *Int J Clin Pract* 2006; **60(12)**: 1662-1672.
- van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Battle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 2002; **111(2)**: 241-250.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; **324(5930)**: 1029-1033.
- Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; **12(10)**: 685-698.
- Wang B, Ao J, Yu D, Rao T, Ruan Y, Yao X. Inhibition of mitochondrial translation effectively sensitizes renal cell carcinoma to chemotherapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; **490(3)**: 767-773.
- Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; **123(3191)**: 309-314.
- Warburg O, Minami S. Versuche an Überlebendem Carcinomgewebe. *Klinische Wochenschrift* 1923; **2(17)**: 776-777.
- Weinberg F, Chandel NS. Mitochondrial metabolism and cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2009; **1177**: 66-73.
- Weinberg RA. *The Biology of Cancer*. Garland Science 2014.
- Weinhouse S, Warburg O, Burk D, Schade AL. On Respiratory Impairment in Cancer Cells. *Science* 1956; **124(3215)**: 267-272.
- Xiong S, Mu T, Wang G, Jiang X. Mitochondria-mediated apoptosis in mammals. *Protein Cell* 2014; **5(10)**: 737-749.
- Yang R, Yi L, Dong Z, Ouyang Q, Zhou J, Pang Y, Wu Y, Xu L, Cui H. Tigecycline Inhibits Glioma Growth by Regulating miRNA-199b-5p-HES1-AKT Pathway. *Mol Cancer Ther* 2016; **15(3)**: 421-429.
- Zhao Y, Butler EB, Tan M. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell Death Dis* 2013; **4**: e532.
- Zhong X, Zhao E, Tang C, Zhang W, Tan J, Dong Z, Ding HF, Cui H. Antibiotic drug tigecycline reduces neuroblastoma cells proliferation by inhibiting Akt activation in vitro and in vivo. *Tumour Biol* 2016; **37(6)**: 7615-7623.
- Zhou S, Kachhap S, Singh KK. Mitochondrial impairment in p53-deficient human cancer cells. *Mutagenesis* 2003; **18(3)**: 287-292.



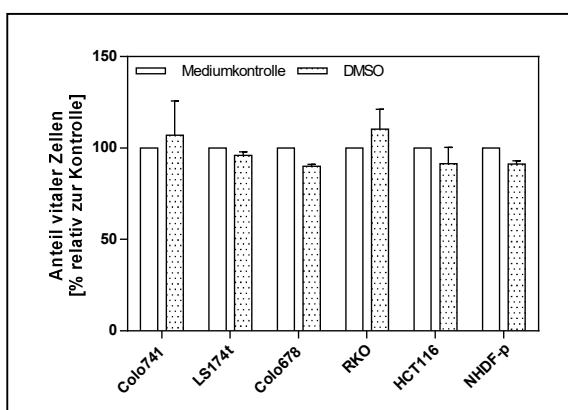
## 10 APPENDIX



**Abbildung 10.1: Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte von Tigecyclin für kolorektale Karzinomzelllinien und Fibroblasten.** Für jeden der drei Zeitpunkte (24, 48 und 72 Stunden) wurde der IC<sub>50</sub>-Wert anhand von drei unabhängigen Versuchen mit jeweils sechs technischen Replikaten ermittelt. Die Zellen wurden mit Konzentrationen von 10<sup>-4</sup> bis 10<sup>-7</sup> mol/L Tigecyclin inkubiert. Die Erstellung der Graphen und Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte erfolgte mit Prism 6. In Ergänzung zu Tabelle 4.2.

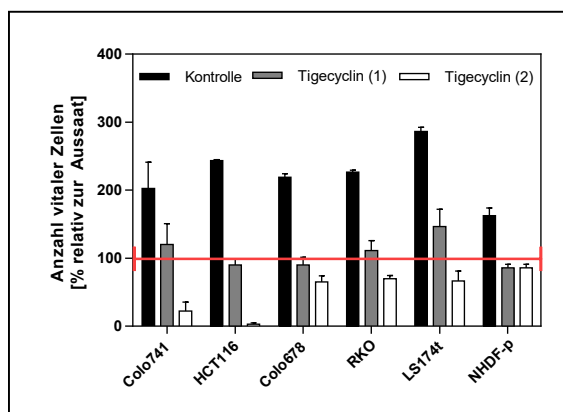
**Tabelle 10.1: Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte von Tigecyclin für kolorektale Karzinomzelllinien und Fibroblasten.** Die IC<sub>50</sub>-Werte (Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall, 95% KI) in µmol/L basieren auf drei unabhängigen Versuchen mit jeweils sechs technischen Replikaten (s. auch Abbildung 10.1).

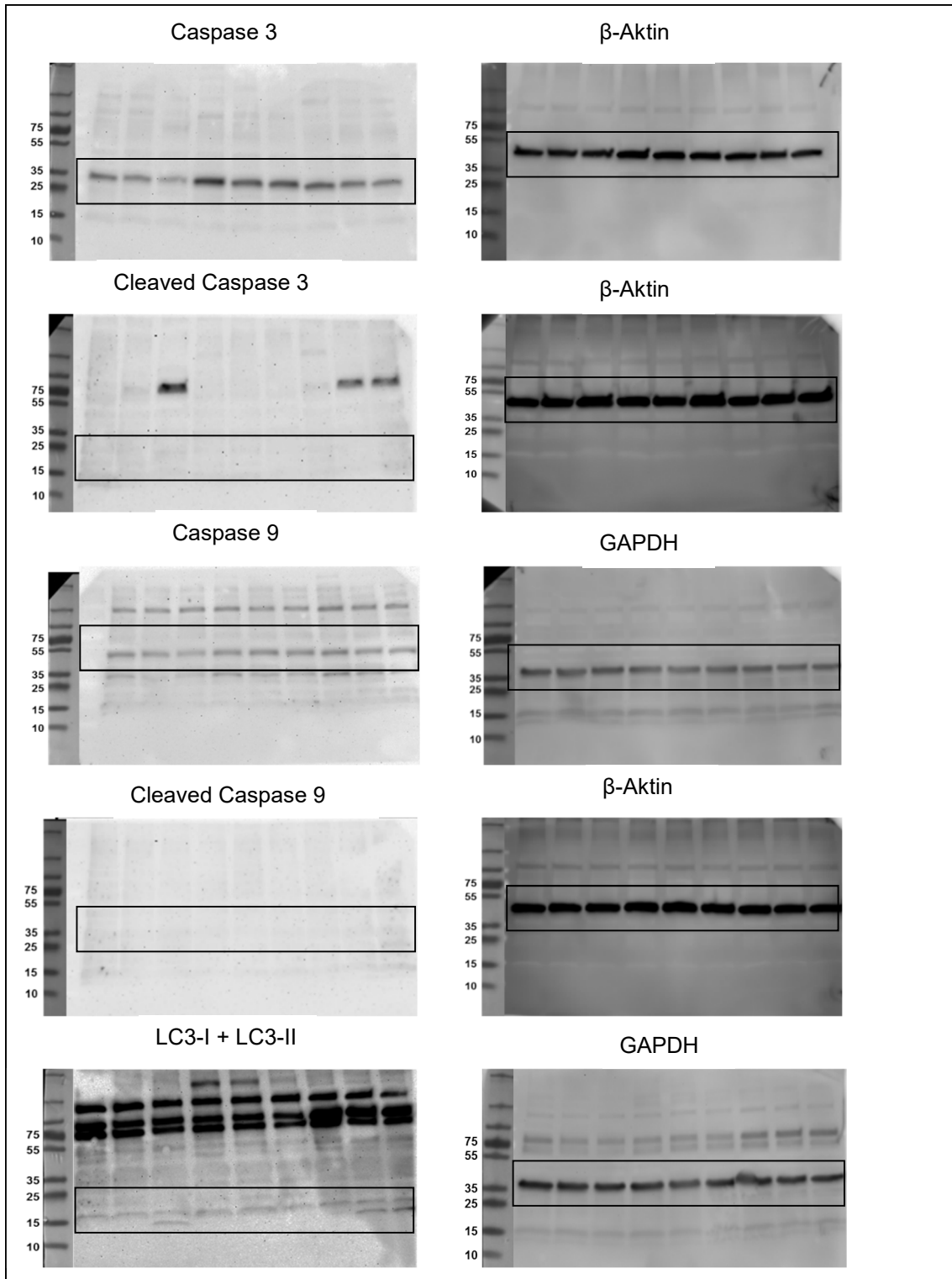
Zelllinie	IC <sub>50</sub> (48 Stunden)		IC <sub>50</sub> (72 Stunden)	
	Mittelwert	95 % KI	Mittelwert	95 % KI
Colo741	10,5	6,2 -17,9	8,3	4,7-14,8
Colo678	15,1	9,0-24,0	8,3	6,6-11,9
HCT116	8,7	5,3-14,2	5,6	3,7- 8,6
LS174T	38,1	25,9-56,3	17,9	13,2-24,1
RKO	43,9	24,4-78,9	29,6	18,1-48,6
NHDF-p	77,5	64,2- 93,7	64,5	52,5-74,8



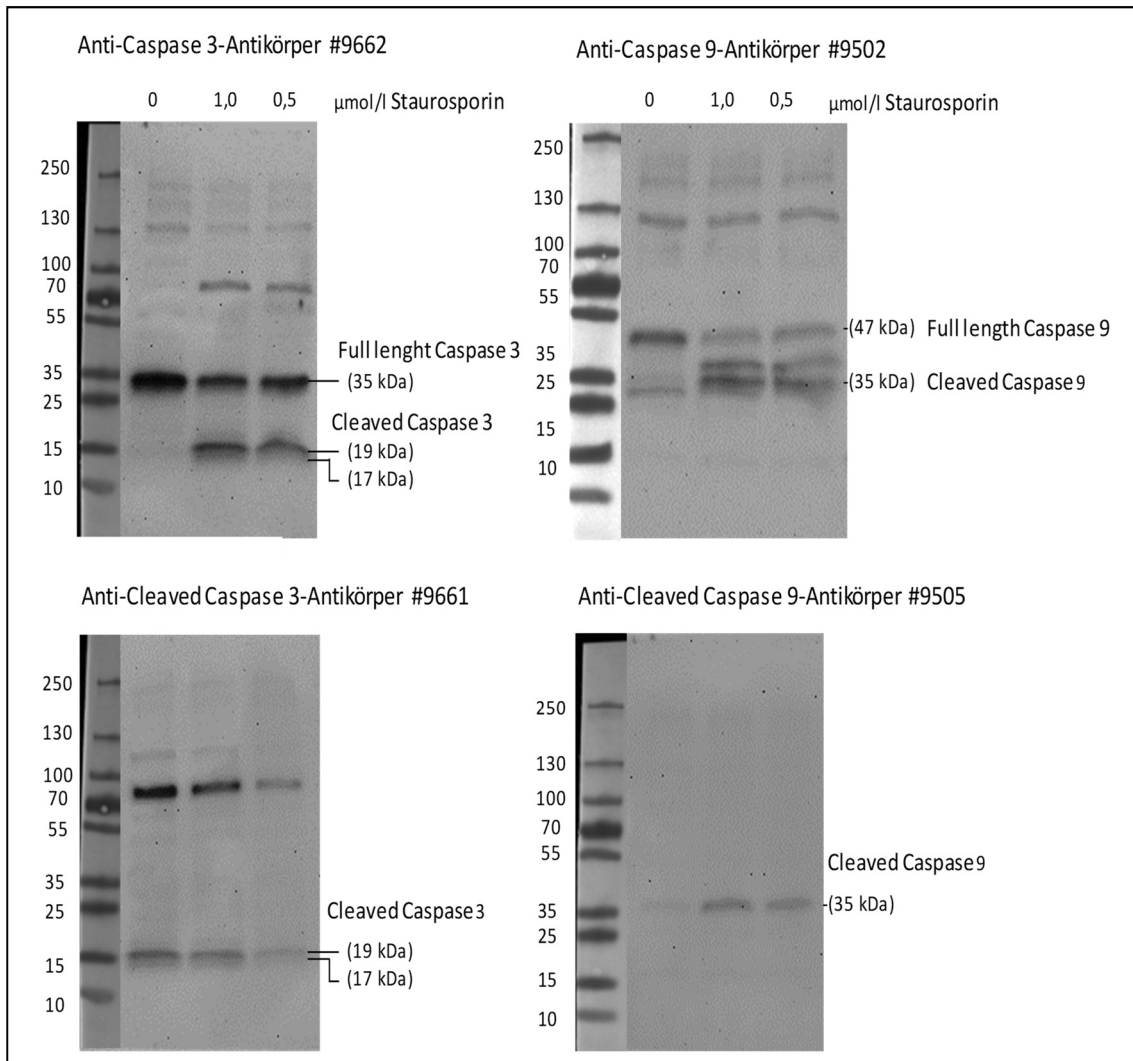
**Abbildung 10.2: Ausschluss eines zytotoxischen Effekts durch DMSO (Dimethylsulfoxid).** Alle Zelllinien wurden mit 1,2 % DMSO (Dimethylsulfoxid) für 72 Stunden inkubiert. Diese in Zellassays dieser Arbeit höchste Konzentration an DMSO wurde bei einer Konzentration von 100 µmol/L Tigecyclin erreicht (Kapitel 3.6). Die Werte stammen aus drei unabhängigen Versuchen mit bis zu sechs technischen Replikaten und sind auf die Kontrolle (100 %) bezogen. Bei keiner Zelllinie wurde ein Effekt von DMSO auf das Zellwachstum beobachtet.

**Abbildung 10.3: Bestimmung des antiproliferativen Effekts von Tigecyclin durch Zellzählung nach 48 Stunden.** In Zellkulturflaschen wurden  $1 \times 10^6$  Zellen ausgesät und für 48 Stunden mit Tigecyclin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit der Neubauer Zählkammer gezählt. Die Werte (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) basieren auf bis zu drei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei technischen Replikaten (Wiederholung der Zellzählung mit neu befüllter Zählkammer). Die Ergebnisse sind in Bezug zur Aussaat (100 %) dargestellt. Die Zellen wurden mit zwei verschiedenen Konzentrationen an Tigecyclin inkubiert: Die erste Konzentration (Tigecyclin (1)) entspricht den in Kapitel 4.1 festgelegten Werten, bei der zweiten Konzentration (75 µmol/L Tigecyclin (2)) handelt es sich um den obersten Konfidenzintervall zum IC<sub>50</sub>-Wert für Fibroblasten (Tabelle 4.1). In Ergänzung zu Abbildung 4.4.





**Abbildung 10.4: Originalaufnahmen der Western Blots (in Ergänzung zu Abb. 4.13).** Gezeigt sind Caspase 3 (35 kDa), »cleaved« Caspase 3 (17+19 kDa), Caspase 9 (47kDa), »cleaved« Caspase 9 (35 kDa), LC3-I und LC3-II (17 bzw. 15 kDa).  $1 \times 10^6$  Zellen wurden für 48 Stunden mit Tigecyclin inkubiert. Primärantikörper: Tabelle 3.6. Die Abbildung 4.12 dargestellten Ausschnitte entsprechen den eingerahmten Bereichen. Links: Proteinmarker („prestained“ Proteinmarker von Peqlab, VWR Life Science) im Größenbereich 10-250 kDa.



**Abbildung 10.5: Originalaufnahmen von Western Blots zum Nachweis von »cleaved« Caspasen (Positivkontrollen in Ergänzung zu Abbildung 4.13).** Gezeigt ist der Nachweis von Caspase 3 (35 kDa), »cleaved« Caspase 3 (17+19 kDa), Caspase 9 (47 kDa), »cleaved« Caspase 9 (35 kDa) mit den entsprechenden Antikörpern von Cell Signaling Technology (Tabelle 3.6). Hierzu wurden  $1 \times 10^6$  HeLa-Zellen mit 0,5 und 1  $\mu\text{mol/l}$  Staurosporin für 3 Stunden behandelt. Staurosporin, ein natürlich vorkommendes Alkaloid, das vom Pilz *Streptomyces staurospore* produziert wird, stellt einen potenten Apoptoseinduktor dar (Caballero-Benitez A et al., 2003). Primärantikörper: Tabelle 3.6. Links: Proteinmarker („prestained“ Proteinmarker von Peqlab, VWR Life Science) im Größenbereich 10-250 kDa (Kapitel 3.9).

## 11 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette. ....	3
Abbildung 1.2: Die Strukturformel für Tigecyclin. ....	8
Abbildung 3.1: Versuchsaufbau zur Messung Tigecyclin-vermittelter antiproliferativer Effekte. 13	
Abbildung 3.2: Graphische Darstellung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ). .....	15
Abbildung 4.1: Bestimmung der Zellproliferation. ....	20
Abbildung 4.2: Zusammenhang zwischen $IC_{50}$ und Verdopplungszeit. ....	21
Abbildung 4.3: Der antiproliferative Effekt von Tigecyclin. ....	22
Abbildung 4.4: Nachweis Tigecyclin-induzierter zytostatischer und zytotoxischer Effekte. ....	23
Abbildung 4.5 Der antiproliferative Effekt von Tigecyclin. ....	25
Abbildung 4.6: Tigecyclin verstärkt nicht den antiproliferativen Effekt von 5-FU. ....	26
Abbildung 4.7: Tigecyclin verstärkt nicht den antiproliferativen Effekt von Oxaliplatin. ....	27
Abbildung 4.8: Der antiproliferative Effekt von Tigecyclin in der Mehrtagekultur. ....	30
Abbildung 4.9: Der antiproliferative Effekt von Tigecyclin in der Mehrtagekultur. ....	31
Abbildung 4.10: Der Effekt von Tigecyclin auf das mitochondriale Membranpotential kolorektaler Karzinomzellen. ....	33
Abbildung 4.11: Der Effekt von Tigecyclin auf das mitochondriale Membranpotential von Fibroblasten. ....	34
Abbildung 4.12: Ergebnis der Auswertung der Fluoreszenzbilder. ....	34
Abbildung 4.13: Untersuchungen zur Expression von Caspase 3 und 9, »cleaved« Caspase 3 und 9 als Marker für Apoptose sowie LC3-II als Marker für Autophagie. ....	36
Abbildung 10.1: Bestimmung der $IC_{50}$ -Werte von Tigecyclin für kolorektale Karzinomzelllinien und Fibroblasten. ....	53
Abbildung 10.2: Ausschluss eines zytotoxischen Effekts durch DMSO (Dimethylsulfoxid). ....	54
Abbildung 10.3: Bestimmung des antiproliferativen Effekts von Tigecyclin durch Zellzählung nach 48 Stunden. ....	54
Abbildung 10.4: Originalaufnahmen der Western Blots (in Ergänzung zu Abb. 4.13). ....	55
Abbildung 10.5: Originalaufnahmen von Western Blots zum Nachweis von »cleaved« Caspasen (Positivkontrollen in Ergänzung zu Abbildung 4.13). ....	56

## 12 TABELLENVERZEICHNIS

---

Tabelle 3.1: Übersicht über die verwendeten kolorektalen Karzinomzelllinien.....	11
Tabelle 3.2: Übersicht der verwendeten Kulturmedien.....	11
Tabelle 3.3: Zusammensetzung des verwendeten Lyse-Puffers (1 % SDS, pH 7,6).....	16
Tabelle 3.4: Zusammensetzung des Auftragepuffers nach Laemmli (4x, pH 6,8).....	16
Tabelle 3.5: Zusammensetzung vom SDS-Laufpuffer (pH 8,3), Transfer-Puffer n. Towbin (pH 8,3) und TBS (pH 7,6).....	17
Tabelle 3.6: Übersicht über die im Western Blot verwendeten Primärantikörper.....	18
Tabelle 4.1: Der antiproliferative Effekt von Tigecyclin bei kolorektalen Karzinomzellen und dermalen Fibroblasten (NHDF-p).....	19
Tabelle 4.2: Bestimmung der Zellproliferation.....	20
Tabelle 10.1: Bestimmung der IC <sub>50</sub> -Werte von Tigecyclin für kolorektale Karzinomzelllinien und Fibroblasten.....	54

## Publikationsverzeichnis

---

Diese Arbeit wurde in Teilen bei den 19. Chirurgischen Forschungstagen in Würzburg, 08.-10. Sept. 2016, vorgestellt und liegt als publiziertes Abstract vor:

**L. Löwer**, M. Hofmann, B. Mühling, S. Gahn, C.-T. Germer, A. Wiegering, C. Otto. Inhibition of mitochondrial translation as a new therapeutic anti-cancer strategy for human colorectal cancer cells. *Eur Surg Res.* 2015; 55: 220. doi: 10.1159/00043

## Danksagung

---

Die vorliegende Arbeit wurde in der Experimentellen Chirurgie der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Würzburg der Julius-Maximilians-Universität unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. C. Otto angefertigt. Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. C.-T. Germer bedanken.

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. C. Otto für das interessante Thema, die zuverlässige und nachhaltige wissenschaftliche Betreuung, sowie für seine freundliche Unterstützung, kritischen Ratschläge und Hilfsbereitschaft bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Den Mitarbeitern und Doktoranden der Experimentellen Chirurgie danke ich für die freundliche Unterstützung sowie das angenehme Arbeitsklima. Frau Mühling, Frau Hofmann und Frau Koospal danke ich insbesondere für die geduldige Einarbeitung und die Anleitung bei der Durchführung der Versuche. Frau Gahn danke ich für die Bereitstellung der Fibroblastenkulturen sowie ihre stetige freundliche Hilfsbereitschaft.

Bei Frau Chodnevsckaja möchte ich mich für die Unterstützung bei der Auswertung der Fluoreszenz-Versuche ganz herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Norbert Neckel, deren liebevolle moralische und wissenschaftliche Unterstützung diese Arbeit erst ermöglichten.

Auch möchte ich mich herzlich bei Herrn Kruspe bedanken, dessen freundschaftliche wissenschaftliche Unterstützung zu dieser Arbeit mit beigetragen hat.



# Lebenslauf

---

## Persönliche Daten:

---

Name: Linda Löwer  
Geburtsdatum/ -ort: 31.07.1991 in Hamburg  
Familienstand: ledig

## Ausbildung:

---

05/2018 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Charité Berlin  
04/2017 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Universität Würzburg  
08/2013 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Universität Würzburg  
08/2014 – 01/2015 Auslandssemester, Universidad de Guadalajara, Mexiko  
08/2013 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Universität Würzburg  
2010 Abitur am Wilhelm - Gymnasium Hamburg

## Praktisches Jahr:

---

12/2017 – 04/2018 Neurologie, Schlosspark - Klinik Charlottenburg, Berlin  
09/2017 – 12/2017 Chirurgie, Bundeswehrkrankenhaus Berlin  
05/2017 – 09/2017 Innere Medizin, Wenckebach-Klinikum, Berlin

Berlin, 30.07.2018

Linda Löwer