



**Der antiproliferative Effekt des RNA-Polymerase I Inhibitors CX-5461 in  
Zellen kolorektaler Karzinomzelllinien auf zellulärer und molekularer  
Ebene**

**The antiproliferative effects of RNA Polymerase I inhibitor CX-5461 in  
colorectal cancer cell lines on a cellular and molecular level**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Klasse Infektion und Immunologie

vorgelegt von  
Konstantin Lukas Uttinger  
aus Nürnberg

Würzburg 2021



**Eingereicht am: 4.11.2021**

Bürostempel

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

**Vorsitzende: Prof. Dr. med. Heike Rittner**

**1. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto**

**2. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Harald Wajant**

**3. Betreuer: Prof. Dr. med. Armin Wiegering**

**Tag des Promotionskolloquiums: 24.3.2022**

**Doktorurkunden ausgehändigt am: .....**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das kolorektale Karzinom	1
1.2	Die Ribosomenbiogenese	3
1.3	CX-5461 als ein Inhibitor der Ribosomenbiogenese	6
1.4	Zum antiproliferativen Effekt von CX-5461	9
1.5	Ziele der Arbeit	11
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>12</b>
2.1	Zelllinien, Zellkulturmedien	12
2.2	Zellkultur	12
2.3	Reagenzien	13
2.4	Kristallviolett-Zellvitalitätsassay	13
2.5	Kristallviolett-Zellvitalitäts-(Kolonie-) Assay	14
2.6	WST-8-Zellvitalitätsassay	14
2.7	JC-1-Zellvitalitätsassay	14
2.8	BrdU-Zellproliferationsassay	15
2.9	EdU-Zellzyklusassay	15
2.10	OPP-Proteinsynthese-Assay	16
2.11	Annexin V-Apoptose-Assay	16
2.12	SA- $\beta$ -Galactosidasefärbung	16
2.13	Immunfluoreszenz-Färbung	17
2.14	RT-qPCR	18
2.15	Western Blot	20
2.16	Massenspektrometrie	21
2.17	Statistik	22
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>23</b>
3.1	Der antiproliferative Effekt von CX-5461: Zellzyklusarrest und seneszenten Zellphänotyp	23
3.2	CX-5461-induzierte Seneszenz: Hemmung der Transkription ribosomaler Nucleinsäuren	31
3.3	CX-5461-induzierte Seneszenz: DNA-Damage-Response (DDR)	34

3.4	CX-5461-induzierte Seneszenz: Die p53-p21-Achse.....	36
3.5	CX-5461-induzierte Seneszenz: nucleäre Akkumulation ribosomaler Proteine und Aktivierung des Rb-Signalwegs.....	38
3.6	Zytoreduktiver Effekt bei CX-5461-induzierten seneszenten Zellen durch Kombination mit Bcl-Inhibitoren.....	40
3.7	Beantwortung der Fragen (Kapitel 1.5).....	46
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>47</b>
4.1	Der antiproliferative Effekt von CX-5461 .....	47
4.2	Durch CX-5461 beeinflusste Signalwege .....	50
4.3	CX-5461 und nucleolärer Stress .....	53
4.4	CX-5461 in Kombination mit Bcl-Inhibitoren .....	56
4.5	Ausblick.....	59
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>70</b>

# Contents

<b>1</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
1.1	Colorectal cancer .....	1
1.2	Ribosome biogenesis .....	3
1.3	CX-5461 as ribosome biogenesis inhibitor .....	6
1.4	The antiproliferative effects of CX-5461 .....	9
1.5	Aims of this thesis.....	11
<b>2</b>	<b>Methods .....</b>	<b>12</b>
2.1	Cell lines and cell medium .....	12
2.2	Cell culture.....	12
2.3	Reagents .....	13
2.4	Crystal violet cell viability assay .....	13
2.5	Crystal violet cell viability colony assay.....	14
2.6	WST-8 cell viability assay .....	14
2.7	JC-1 cell viability assay.....	14
2.8	BrdU cell proliferation assay .....	15
2.9	EdU cell cycle assay .....	15
2.10	OPP proteinsynthesis assay .....	16
2.11	Annexin V apoptosis assay.....	16
2.12	SA- $\beta$ -Galactosidase staining.....	16
2.13	Immune-fluorescence staining .....	17
2.14	RT-qPCR.....	18
2.15	Western blot .....	20
2.16	Mass spectrometry .....	21
2.17	Statistics .....	22
<b>3</b>	<b>Results .....</b>	<b>23</b>
3.1	The antiproliferative effects of CX-5461: Cell cycle arrest and the senescent cellular phenotype.....	23
3.2	CX-5461-induced cellular senescence: Inhibition of ribosomal nucleic acid transcription .....	31

3.3	CX-5461-induced cellular senescence: DNA-Damage-Response (DDR).....	34
3.4	CX-5461-induced cellular senescence: The p53-p21 axis .....	36
3.5	CX-5461-induced cellular senescence: Nuclear accumulation of ribosomal proteins and activation of the Rb signal.....	38
3.6	CX-5461-induced cellular senescence: cytoreductive effects in CX-5461-induced senescent cells in combination with Bcl-inhibitors .....	40
3.7	Evaluation of aims of this thesis (Chapter 1.5).....	46
<b>4</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>47</b>
4.1	The antiproliferative effects of CX-5461 .....	47
4.2	CX-5461-influenced molecular signaling .....	50
4.3	CX-5461 and nucleolar stress.....	53
4.4	CX-5461 in combination with Bcl-inhibitors .....	56
4.5	Future aspects .....	59
<b>5</b>	<b>Summary.....</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>References .....</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>Appendix.....</b>	<b>70</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom ist die häufigste bösartige Tumorerkrankung des Gastrointestinaltrakts des Menschen (Torre et al., 2015; Sung et al., 2021). Jährlich werden weltweit ca. 2 Millionen neue Fälle diagnostiziert, während ca. 900 000 Menschen im selben Zeitraum daran versterben (Brenner et al., 2014; Sung et al., 2021).

Der Großteil der kolorektalen Karzinome entsteht über einen Zeitraum von mehreren Jahren in einer Abfolge, die als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet wird (Fearon, Vogelstein, 1990). Diese so genannten sporadischen kolorektalen Karzinome entwickeln sich aus normalem (nicht-transformiertem) Darmepithel durch klonal akkumulierende Zellen, die verschiedene Mutationen tragen und ein dysplastisches Darmepithel bilden, aus dem ein Adenom mit dysreguliertem und lokal verdrängendem Wachstum entsteht als Vorstufe zum invasiv wachsenden und metastasierungsfähigen Karzinom. Bei 70 % der sporadischen kolorektalen Karzinome liegt beim Übergang vom Adenom zum Karzinom eine Mutation in einem Gen vor, das als „Adenomatöse Polyposis Coli“ oder APC bezeichnet wird und für das Tumorsuppressorprotein APC kodiert (Fearon, 2011; Brenner et al., 2014). Mutiertes APC (-Protein) hat seine Fähigkeit verloren, das Protein  $\beta$ -Catenin zu hemmen, das im pro-proliferativen Signalweg Wnt<sup>1</sup>) als Mitglied eines Transkriptionsfaktor-Komplexes die Aktivierung proliferationsinduzierender Gene im Zellkern kontrolliert (Schneikert, Behrens, 2007). Weitere relevante Mutationen beim Übergang vom Adenom zum Karzinom stellen in aller Regel eine aktivierende Mutation im Onkogen *KRAS*<sup>2</sup>) und eine deaktivierende Mutation im Tumorsuppressorgen *TP53*<sup>3</sup>) dar (Fearon, 2011).

---

<sup>1</sup> Der Wnt-Signalweg ist entscheidend an der regelmäßigen und koordinierten Erneuerung des Darmepithels beteiligt. Durch Wnt-abhängige Wachstumsfaktoren wird eine Kaskade aktiviert, die die Expansion von epithelialen Stammzellen in den Krypten des Darms und das gezielte Absterben von Darmepithelzellen kontrolliert (Schneikert, Behrens, 2007).

<sup>2</sup> Die Ras-Familie ist eine Gruppe G-Protein-gekoppelter Kinasen, die als nachgelagerte („downstream“) Effektoren verschiedener Wachstumsfaktoren fungieren und pro-proliferativ wirken. Ein Mitglied dieser Gruppe, *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma virus*), ist in ca. 40 % der kolorektalen Karzinome des Menschen mutiert und überaktiv (Fearon, 2011).

<sup>3</sup> Das Gen *TP53* kodiert für das Protein p53, ein Schlüsselprotein bei der transkriptionellen Regulation Zellzyklus-regulierender Faktoren. Im Fall von Zellstress aktiviert p53 Zellzyklusarrest oder Apoptose. Verliert p53 seine Funktion, kann die Zelle unkontrolliert proliferieren. Somit weist p53 Eigenschaften eines Tumorsuppressors auf (Fridman, Lowe, 2003).

Neben der chirurgischen Therapie als die Hauptsäule der lokalen Tumorthherapie des kolorektalen Karzinoms wird die medikamentöse Tumorthherapie spätestens ab dem Zeitpunkt einer Lymphknotenmetastasierung zum Teil des Therapieregimes (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Deutsche Krebsgesellschaft, 2019). Bei der medikamentösen Therapie wird zwischen der klassischen zytostatischen Therapie, vor allem mit Fluoropyrimidinen und Platin-basierten Substanzen (Yee, 2018), und der gezielten Krebstherapie ("targeted therapy") unterschieden (Stintzing et al., 2009).

Für die klassischen zytostatischen Therapeutika wurde lange Zeit angenommen, dass ihr Hauptmechanismus darin zu sehen ist, Schäden an der DNA – hierzu zählen z. B. Strangbrüche – zu verursachen und damit entsprechende Signalwege zu aktivieren, die zur Behebung des Schadens DNA-reparierende Mechanismen in Gang setzen. Bleibt die Ursache ihrer Aktivierung unbeseitigt, wird die Tumorzelle in den programmierten Zelltod (Apoptose) überführt (Drygin et al., 2010).

Erste Indizien, dass die Induktion von Apoptose durch DNA-reparierende Mechanismen nicht als der Hauptmechanismus klassischer Zytostatika gesehen werden kann, kamen aus dem Vergleich von Cisplatin, ein Platin-haltiges Zytostatikum, mit seinem Analogon Transplatin. Beide aktivieren DNA-reparierende Mechanismen, aber nur Cisplatin zeigt einen inhibierenden Effekt auf das Tumorwachstum. Der wesentliche Unterschied auf molekularer Ebene zwischen Cisplatin und Transplatin war die Fähigkeit zur Hemmung der Synthese ribosomaler RNA (Jordan, Carmo-Fonseca, 1998). Da Cisplatin hierzu in der Lage ist und damit auch die Ribosomenbiogenese (Kapitel 1.2) negativ beeinflusst, Transplatin aber nicht über diese Fähigkeit verfügt, konnte die Ursache für den zytostatischen Effekt von Cisplatin nicht (ausschließlich) in der Aktivierung DNA-reparierender Mechanismen liegen, sondern musste in der Hemmung der Ribosomenbiogenese zu suchen sein. Auch für andere Vertreter klassischer Chemotherapeutika wie 5-Fluorouracil und Methotrexat wurde ein negativer Einfluss auf die Ribosomenbiogenese nachgewiesen (Burger et al., 2010; Brighenti et al., 2015).



Dass die Ribosomenbiogenese ein tumorspezifisches Target für einen generell neuen Ansatz zu einer gezielten Tumorthherapie ("targeted therapy") sein könnte (Burger et al., 2010; Brighenti et al., 2015; Ferreira et al., 2020; Schmidt et al., 2020), sollte in der vorliegenden Arbeit an Zellen des kolorektalen Karzinoms untersucht werden.

## 1.2 Die Ribosomenbiogenese

Die Ribosomenbiogenese findet in sämtlichen eukaryotischen Zellen in stark konservierten Syntheseschritten im Nucleolus<sup>4</sup>) und zum Teil im Zytoplasma statt (Abbildung 1.1). Ribosomen, Orte der Proteinbiosynthese, bestehen aus ribosomaler RNA (rRNA) und ribosomalen Proteinen, abgekürzt als RPs bezeichnet (Kressler et al., 2010).

Die für die rRNA kodierenden ribosomalen DNA-Abschnitte (rDNA) setzen sich aus repetitiven Genabschnitten zusammen, die im Tandem mit hohen Transkriptionsraten abgelesen werden (Kobayashi, 2014). Das erste durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase I (Pol I) gebildete (Präkursor-) Transkript wird als 47S-Prä-rRNA bezeichnet, das einer Prozessierung unterliegt, bei der bestimmte Abschnitte wie die am 5'- und 3'-Ende gelegenen "*external transcribed spacers*" (ETS) entfernt werden und die 45S-Prä-rRNA als stabileres Produkt entsteht (Popov et al., 2013). Die 45S-Prä-rRNA wird in weiteren Schritten zu den „funktionellen“ rRNAs 18S, 28S und 5,8S prozessiert, die zu den Bestandteilen der Ribosomen zählen.

Ribosomen eukaryotischer Zellen bestehen aus einer 40S und 60S ribosomalen Untereinheit, die jeweils unterschiedliche rRNAs und unterschiedliche Anteile an RPs<sup>5</sup>)

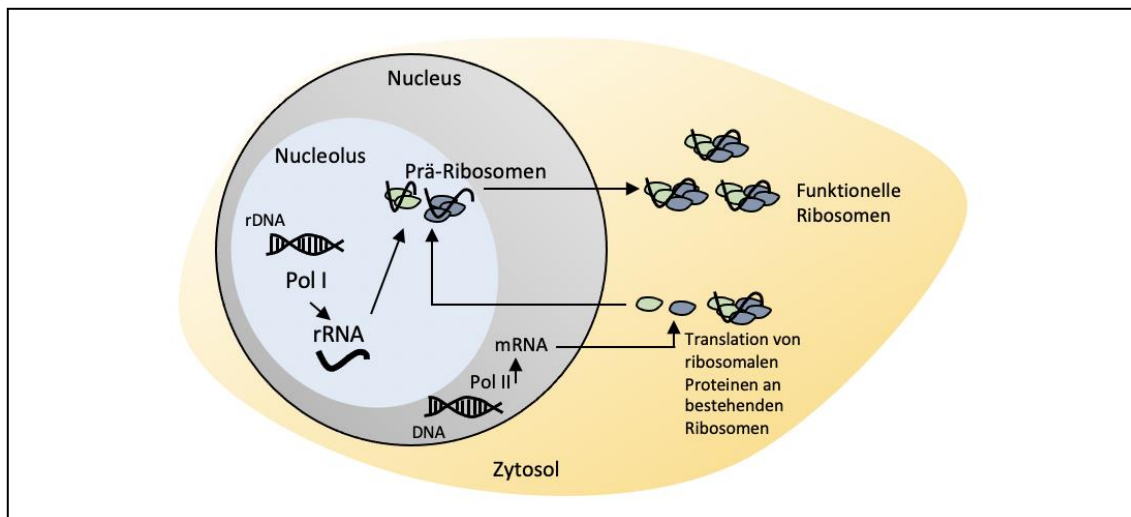
---

<sup>4</sup> Der Nucleolus ist ein funktionelles Subkompartiment des Nucleus und kann bereits mit einer Hämalaun/Eosin (H&E)-Färbung lichtmikroskopisch sichtbar gemacht werden und so vom Nucleus abgegrenzt werden. Grund für die Anfärbbarkeit ist der hohe Proteingehalt des Nucleolus, hauptsächlich durch aus dem Zytoplasma stammende ribosomale Proteine. Zusätzlich ist der Nucleolus der Ort der Synthese ribosomaler RNA (rRNA) durch die DNA-abhängige RNA Polymerase I (Pol I) und der Bildungsort der beiden ribosomalen Untereinheiten 40S und 60S (Prä-Ribosomen), die sich im Zytoplasma zu funktionellen Ribosomen zusammenlegen (Derenzini et al., 2009).

<sup>5</sup> Die 40S-Untereinheit besteht aus 32 RPs und der 18S rRNA, die 60S-Untereinheit aus 47 RPs und der 28S, 5,8S und 5S rRNA (Brighenti et al., 2015).

aufweisen (Kressler et al., 2010). Die rRNAs<sup>6)</sup> werden mit den aus dem Zytosol importierten RPs im Nucleolus zu den beiden ribosomalen Untereinheiten 40S und 60S („Prä-Ribosomen“) zusammengefügt, die, exportiert ins Zytosol, dort funktionelle Ribosomen bilden (Abbildung 1.1). Die Messenger-RNA (mRNA) mit der genetischen Information für jeweils eine der zahlreichen RPs wird von der RNA-Polymerase II (Pol II) transkribiert und an Ribosomen im Zytosol translatiert.

Die Ribosomenbiogenese beansprucht einen Großteil der zellulären Energiereserven (Warner, 1999). Die hohe Transkriptionsrate der rDNA führt bereits in nicht-transformierten Zellen dazu, dass neu synthetisierte rRNAs den größten Anteil an der zellulären RNA ausmachen (Popov et al., 2013). In Tumorzellen muss die stark erhöhte Zellproliferation durch eine gesteigerte („hyperaktive“) Ribosomenbiogenese gewährleistet werden (Penzo et al., 2019). Nur so können Tumorzellen ihre "replikative Immortalität" als tumorspezifisches Charakteristikum (ein „Hallmark of Cancer“) aufrechterhalten (Hanahan, Weinberg, 2011).



**Abbildung 1.1: Die Ribosomenbiogenese eukaryotischer Zellen.** Eigener Entwurf erstellt nach Informationen von u. a. Kressler et al., 2010. Zur Erklärung siehe Text.

<sup>6)</sup> Die drei rRNAs, die aus der 45S-Prä-rRNA prozessiert werden (5.8S, 18S, 28S) und die 5S rRNA, die von der DNA-abhängigen RNA Polymerase III transkribiert wird (Costanzo et al., 2001).

In der Literatur häufen sich Hinweise, dass neoplastische Zellen durch einen Verlust von Regulationsmechanismen nicht nur eine gesteigerte (hyperaktive), sondern auch eine fehlgesteuerte (dysregulierte) Ribosomenbiogenese zeigen (Diesch et al., 2014). Ursache hierfür sind u. a. Onkogene, die an der Dysregulation der Ribosomenbiogenese während der neoplastischen Transformation beteiligt sind. So bewirkt u. a. eine Mutation im *MYC*-Gen<sup>7</sup>, die auch im kolorektalen Karzinom häufig auftritt (Marmol et al., 2017), dass das mutierte Protein MYC die Aktivität der rDNA transkribierenden Pol I direkt positiv beeinflusst (Dai, Lu, 2008; Tsoi et al., 2017).

Die Erkenntnis, dass Tumorzellen eine erhöhte und dysregulierte Ribosomenbiogenese aufweisen (Diesch et al., 2014), legt nahe, diese Besonderheit der Tumorzelle als Grundlage für eine Tumorthherapie zu nutzen (Drygin et al., 2010). Diese Möglichkeit überrascht aufgrund der Universalität der Ribosomenbiogenese, doch scheinen tatsächlich Ausmaß und „Qualität“ der Ribosomenbiogenese – hyperaktiv und dysreguliert in der Tumorzelle, „normal“ und reguliert in der nicht-transformierten Zelle – den entscheidenden Unterschied auszumachen, der für eine spezifische Hemmung der Ribosomenbiogenese in der Tumorzelle relevant ist (Brighenti et al., 2015).

Dass eine hyperaktive, dysregulierte Ribosomenbiogenese auch von prognostischer Relevanz sein kann, wurde für das kolorektale Karzinom gezeigt. So haben Patienten mit einer Überexpression der 45S-Prä-rRNA (s. oben) im Tumorgewebe (als Zeichen einer gesteigerten Ribosomenbiogenese) ein deutlich schlechteres Überleben als Patienten, deren Tumorgewebe keine gesteigerte Expression der 45S-Prä-rRNA aufweist (Tsoi et al., 2017).

---

<sup>7</sup> Das *MYC*-Gen kodiert für c-MYC (oder MYC), ein Onkoprotein, das Zell-Wachstum, Proliferation und Apoptose reguliert. Es fördert Zellwachstum, indem es in die Transkription von Zellzyklus-regulierender Gene eingreift. Viele Zielstrukturen von MYC sind an der Proteinsynthese der Zelle beteiligt, unter anderem auch ribosomale Untereinheiten. Einen Gegenspieler von MYC stellt p21 dar (Arabi et al., 2005).

### 1.3 CX-5461 als ein Inhibitor der Ribosomenbiogenese

Die Möglichkeit zu einer selektiven Hemmung der Ribosomenbiogenese in Tumorzellen hat die Suche nach geeigneten Kandidaten angestoßen. Mit CX-5461 wurde eine niedermolekulare Substanz, ein *small molecule*, identifiziert, die über diese Eigenschaft verfügt und für die orale Einnahme geeignet ist (Drygin et al., 2011; Haddach et al., 2012).

Der antiproliferative Effekt von CX-5461 wurde bereits erfolgreich *in vitro* an Tumorzellen hämatologischen Ursprungs untersucht, aber auch an Tumorzelllinien solider Tumoren (Cornelison et al., 2017). Die Wirksamkeit von CX-5461 wurde an humanen Tumoren im Xenograft-Mausmodell bestätigt; hierzu erhielten immuninkompetente Mäuse Zellen etablierter Tumorzelllinien (Drygin et al., 2011). Aktuell wird CX-5461 in klinischen Studien getestet mit ersten Ergebnissen aus einer Phase-I-Studie, die eine gute Verträglichkeit zeigen bei geringen Nebenwirkungen aus dem dermatologischen Formkreis, die gut therapierbar waren (Khot et al., 2019).

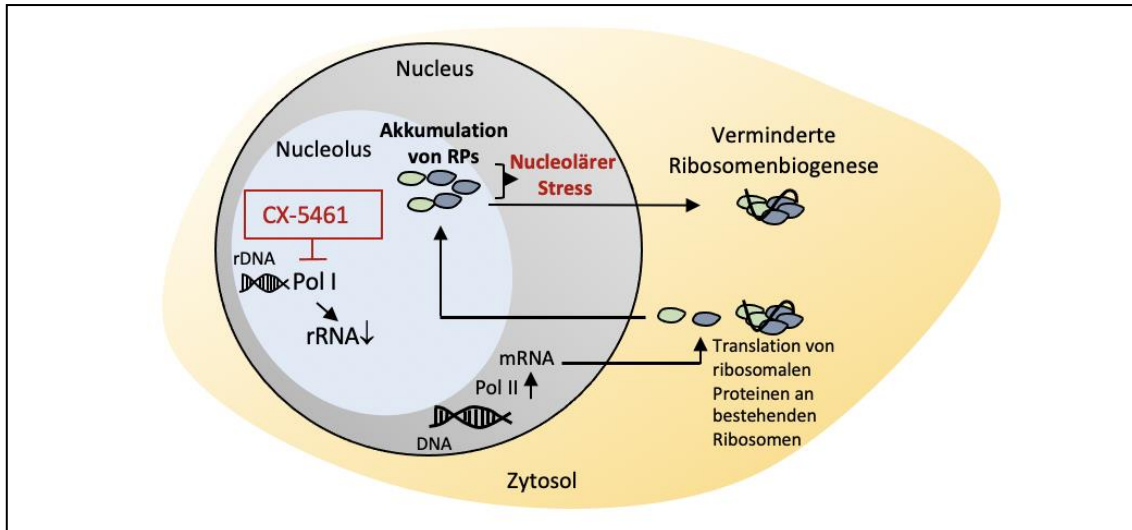
Der antiproliferative Effekt von CX-5461 hat seinen Auslöser in der spezifischen Hemmung der Pol I und ein damit einhergehender Mangel an rRNAs als wichtiger funktioneller Bestandteil (neben RPs) von Ribosomen führt zu einer Akkumulation von RPs in den Nucleoli (Abbildung 1.2 und 1.3).

Wird ein dynamischer Prozess wie die Ribosomenbiogenese, der auf eine kontinuierlich abgestimmte Zufuhr an rRNAs und RPs angewiesen ist, gestört, so führt dies in der Zelle zu Stress wie jede Abweichung vom physiologischen Normalzustand. Der durch CX-5461 ausgelöste Stress hat seine Ursache im Nucleolus und wird daher als nucleolärer Stress bezeichnet (Brighenti et al., 2015; Nishimura et al., 2015). Die hieran beteiligten relevanten intrazellulären Signalwege werden über p53 und dem Retinoblastom (Rb)-Protein<sup>8</sup> vermittelt (Dick, Rubin, 2013). Beide Signalwege sind außerdem in der Lage,

---

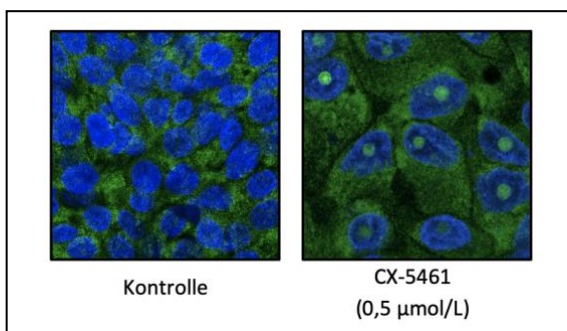
<sup>8</sup> Das Retinoblastom (Rb)-Protein kontrolliert den Zellzyklus, indem es an E2F, eine Familie von Transkriptionsfaktoren, bindet und damit deren Funktion supprimiert. E2F ist an der Regulation des Zellzyklus beteiligt und vermittelt den Übergang aus der G1-Phase in die S-Phase. Aktives (dephosphoryliertes) Rb inaktiviert E2F und löst damit einen Zellzyklusarrest aus (Dick, Rubin, 2013). Rb wird unter anderem durch Cyclin-abhängige Kinasen phosphoryliert und damit inaktiviert (Lessard et al., 2018).

eine irreversible Form des Zellzyklusarrest, bekannt als zelluläre Seneszenz, auszulösen (Drygin et al., 2011; Nishimura et al., 2015; Lessard et al., 2018).



**Abbildung 1.2: Die Hemmung der Ribosomenbiogenese durch CX-5461.** Eigener Entwurf erstellt nach Informationen von u. a. Nishimura et al. (2015). Zur Erläuterung siehe Text.

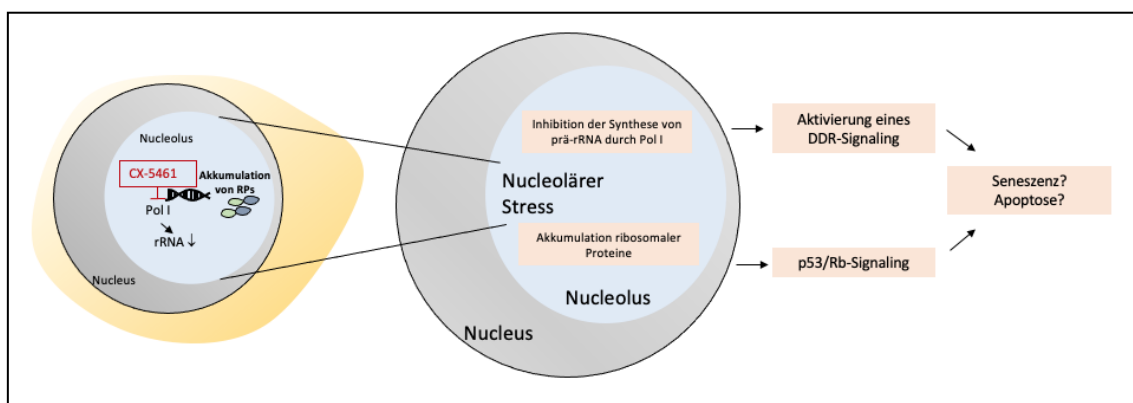
Die nucleoläre Akkumulation von RPs, Konsequenz einer durch CX-5461 vermittelten Pol I-Inhibition, ist immunhistologisch in kolorektalen Karzinomzellen nachweisbar (Abbildung 1.3) und mit dem molekularen Bild einer gestörten Ribosomenbiogenese vereinbar (Abbildung 1.2).



**Abbildung 1.3: Akkumulation ribosomaler Proteine im Zellkern CX-5461-behandelter Zellen.** Die linke Teilabbildung zeigt unbehandelte und die rechte mit 0,5 µmol/L CX-5461 für 7 Tage inkubierte LS174t-Zellen. Blau: DAPI (Kernfärbung). Grün: ribosomale RPL29-Proteine (Wild et al., 2010). Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung bei 100-facher Vergrößerung. Konfokale Mikroskopie-Aufnahme (Otto et al., 2021).

Der durch CX-5461 ausgelöste nucleoläre Stress (Abbildung 1.2) aktiviert auch Signalwege, deren Gemeinsamkeit darin besteht, DNA-reparierende Mechanismen in Gang zu setzen (van Sluis, McStay, 2019). Solche Signalwege werden als „DNA-Damage-Response“ (DDR) bezeichnet und sollen Manifestierungen von Mutationen in der DNA verhindern (Negi, Brown, 2015b; Quin et al., 2016). Das zur Aktivierung eines zum DDR führenden Schadensbild reicht von der Modifikation einer einzelnen Base bis zum DNA-Doppelstrangbruch. Kann der Schaden nicht repariert werden, führen DDR-Signalwege zur Auslösung von Apoptose oder zu einer irreversiblen Zellzyklus-Arretierung mit Ausbildung eines seneszenten Zellphänotyps (Quin et al., 2016).

Der Grund dafür, dass es bei nucleolärem Stress zu einer Aktivierung von DDR-Signalwegen kommt, ist in der stark erhöhten transkriptionellen Aktivität im Nucleolus zu sehen. Bereiche der ribosomalen DNA werden häufiger transkribiert als andere Genabschnitte, was die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von DNA-Schäden im Nucleolus deutlich erhöht (van Sluis, McStay, 2019). Auch verfügt CX-5461 vermutlich über einen direkten DNA-schädigenden Effekt, indem es in Guanin-haltigen Bereichen der ribosomalen DNA die Ausbildung viersträngiger Strukturen (so genannte G-Quadruplexe) auslöst mit aktivierender Wirkung auf DDR-Signalwege (Bruno et al., 2020). DDR-vermittelnde Signalwege können somit auch bei nucleolärem Stress aktiv sein (Abbildung 1.4).



**Abbildung 1.4: Durch CX-5461 beeinflusste Signalwege bei nucleolärem Stress.** Eigener Entwurf erstellt nach Literaturangaben. Zur Erläuterung siehe Text.

## 1.4 Zum antiproliferativen Effekt von CX-5461

Der antiproliferative Effekt von CX-5461 zeigt sich bei hämatologischen Tumorzellen in der Induktion von Apoptose (Drygin et al., 2011) und bei Tumorzellen solider Tumor-entitäten in der Induktion zellulärer Seneszenz (Drygin et al., 2011; Salama et al., 2014; Petrova et al., 2016). Der Grund dafür, dass CX-5461 in hämatologischen und epithelialen Tumorzellen unterschiedliche antiproliferative Signalwege aktiviert – Apoptoseinduktion in hämatologischen Tumorzellen und Seneszenzinduktion in epithelialen Tumorzellen – ist gegenwärtig nicht verstanden.

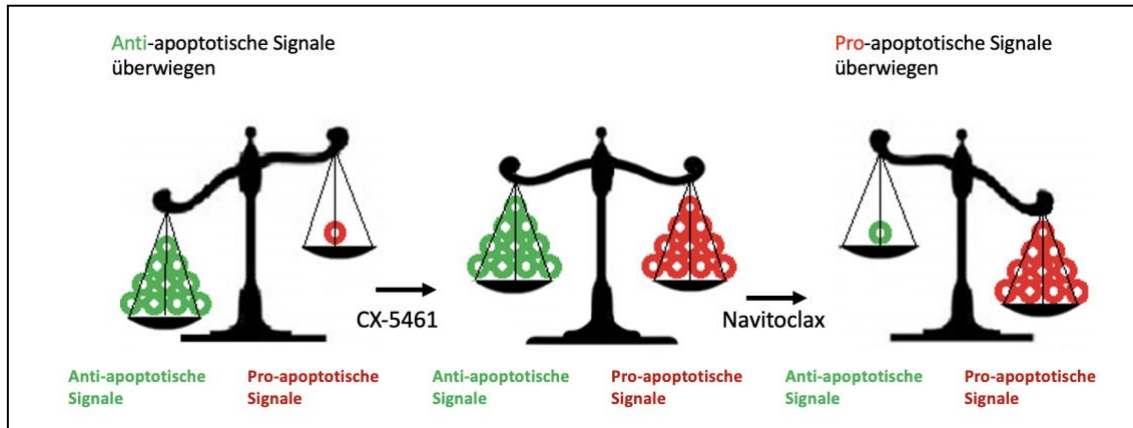
Die für seneszente Zellen charakteristische irreversible Zellteilungsinaktivität führt nicht zu ihrer physischen Eliminierung, sondern sie zeigen sich (nahezu) dauerhaft persistierend. Dies gilt auch für den durch CX-5461 induzierten seneszenten Zellphänotyp. Eine Kombination aus CX-5461 und solchen Substanzen, die seneszente Zellen selektiv in Apoptose überführen, erscheint somit sinnvoll (Abbildung 1.5). Substanzen mit dieser Eigenschaft werden als Senolytika bezeichnet (Zhu et al., 2014; Zhu et al., 2015). Da zu Beginn der Arbeit nicht abgeschätzt werden konnte, welches antiproliferative Phänomen, Apoptose oder Seneszenz, CX-5461 in kolorektalen Karzinomzelllinien auslöst, wurde die Möglichkeit, CX-5461 mit einem Senolytikum zu kombinieren, bereits in Betracht gezogen, um so dem Ziel einer selektiven Tumorzelleliminierung näher zu kommen. Hierbei wurde sich für Navitoclax, ein Bcl-Inhibitor, entschieden, der in der Lage ist, in seneszenten Zellen anti-apoptotische Signale zu hemmen und Apoptose zu induzieren (Zhu et al., 2016).

Proteine aus der Bcl-Familie sind als intrinsische<sup>9)</sup> Regulatoren der Apoptose bekannt, wobei einige Mitglieder anti-apoptotische Effekte auslösen (Baig et al., 2016). Die Apoptose-Resistenz von seneszenten Zellen wird auf eine Dominanz von anti-apoptotischen Signalen zurückgeführt (Cheng et al., 2001; Zhu et al., 2016). Inhibitoren wie

---

<sup>9</sup> Beim programmierten Zelltod (Apoptose) wird zwischen einem extrinsischen und intrinsischen Aktivierungsweg unterschieden, der in beiden Fällen zur Aktivierung von Effektor-Caspasen führt. Im Mittelpunkt des intrinsischen Weges steht die Stabilisierung der Mitochondrienmembran, wobei Proteine der Bcl-Familie entscheidende Regulatorfunktionen übernehmen, die sich in pro- und anti-apoptotische Effekte unterscheiden lassen (Baig et al., 2016).

Navitoclax, die anti-apoptotisch wirkende Proteine hemmen, können eine Zelle in Apoptose überführen (Abbildung 1.5).



**Abbildung 1.5: Hypothese zum Wirkmechanismus der Kombination aus CX-5461 und Navitoclax.** Tumorzellen zeigen sich resistent gegenüber pro-apoptotischen Signalen, da bei ihnen das anti-apoptotische Potential stark ausgebildet ist (linke Waage). Unter dem Einfluss von CX-5461 geht die Tumorzelle in einen seneszenten Zustand über, bei dem sich ein Gleichgewicht zwischen Bcl-Proteinen mit pro- und anti-apoptotischen Eigenschaften einstellt (mittlere Waage). Durch Zugabe von Navitoclax werden Bcl-Proteine mit anti-apoptotischen Eigenschaft gehemmt (bildlich gesprochen wird ihr Anteil zurückgedrängt), wodurch Bcl-Proteine mit pro-apoptotischen Eigenschaften dominieren (rechte Waage) und seneszente Tumorzellen in Apoptose überführen. Eigener Entwurf erstellt nach Literaturangaben (Tchkonja et al., 2013; Baig et al., 2016; Timucin et al., 2019).

Das Ansprechen von Zellen auf apoptotische Signale wird bereits klinisch bei Tumorentitäten wie Leukämien umgesetzt, die erhöhte Anteile des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 aufweisen. Bcl-2 Inhibitoren wie Navitoclax blockieren Bcl-2 und führen die Zelle in Apoptose. Dass Navitoclax auch die Eigenschaft eines Senolytikums zeigt, ist erst seit kurzem bekannt (Zhu et al., 2016). Ein Vorteil, der sich aus der Kombination zweier Substanzen wie CX-5461 und Navitoclax ergeben kann, ist u. a. in einer Reduktion der wirksamen Konzentration für beide Substanzen zu sehen (Sun et al., 2016).



## 1.5 Ziele der Arbeit

Übergeordnetes Ziel der Arbeit war es, den antiproliferativen Effekt von CX-5461 *in vitro* an kolorektalen Karzinomzelllinien zu untersuchen. Dazu sollte

1. der biologisch-relevante Konzentrationsbereich von CX-5461 ermittelt werden, um Off-Target-Effekte von CX-5461 ausschließen zu können;
2. der molekulare Mechanismus hinter dem antiproliferativen Effekt von CX-5461 aufgeklärt werden;
3. überprüft werden, ob der antiproliferative Effekt von CX-5461 sich durch Kombination mit dem pro-apoptotischen Bcl-Inhibitor Navitoclax verstärken lässt. Das strategische Ziel hinter diesem therapeutischen Konzept basiert darauf, den starken pro-proliferativen Phänotyp von Tumorzellen mit CX-5461 durch Induktion eines seneszenten Zellphänotyps unmittelbar stoppen zu können, um anschließend die seneszenten Zellen mit Navitoclax gezielt zu eliminieren.

Fragen, die mit dieser Arbeit beantwortet werden sollten:

- I. Weist CX-5461 auch bei humanen kolorektalen Karzinomzellen antiproliferative Effekte auf?
- II. Auf welchem molekularen Mechanismus basiert der antiproliferative Effekt von CX-5461 und in welche molekulare Endstrecke (Seneszenz, Apoptose) führt dieser?
- III. Wird der antiproliferative Effekt von CX-5461 durch Kombination mit dem Bcl-Inhibitor Navitoclax verstärkt durch Induktion zelltoxischer Effekte wie Apoptose?

## 2 Methoden

### 2.1 Zelllinien, Zellkulturmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

**Tabelle 2.1: Die in dieser Arbeit untersuchten kolorektalen Karzinomzelllinien und Fibroblasten.** Alle Zelllinien sind aus dem Bestand der Experimentellen Viszeralchirurgie der Chirurgischen Klinik I des Universitätsklinikums Würzburg. Es handelt sich hierbei um adhärente Zellen mit bestätigter Authentizität, die zum Zeitpunkt der Analysen frei von Mykoplasmen waren (Daten nicht gezeigt). \*p53 deletierte Variante der Zelllinie. Verdopplungszeiten der Zelllinien in Tabelle 7.1 im Anhang.

Zelllinie	Kulturmedium, Hersteller, Kat.-Nr.	Herkunft
CaCo2	RPMI 1640, ThermoFisher, 22409015	DSMZ
DLD1	RPMI 1640, ThermoFisher, 22409015	ECACC
HCT116	McCoy, ThermoFisher, 26600-023	DSMZ
HCT116*	McCoy, ThermoFisher, 26600-023	DSMZ
HT29	McCoy, ThermoFisher, 26600-023	DSMZ
LS174t	RPMI 1640, ThermoFisher, 22409015	CLS
SW480	DMEM, ThermoFisher, 31331028	CLS
NHDF	Fibroblast Growth Medium 2, PromoCell, C-23020	CLS

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Leibnitz-Institut Braunschweig; CLS: Cell Lines Service GmbH; ECACC: European Collection of Authenticated Cell Cultures. Kat.-Nr.: Katalog- (bzw. Bestell-) Nummer

Sämtliche Kulturmedien wurden mit folgenden Zusätzen von Gibco / ThermoFisher ergänzt (angegeben ist die jeweilige Endkonzentration): 100 Units/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin (Kat.-Nr.: 15140122), 50 µmol/L 2-Mercaptoethanol (Kat.-Nr.), 1 mmol/L Natriumpyruvat, (Kat.-Nr.: 11360070), 100 µmol/L nicht-essentielle Aminosäuren (Kat.-Nr.: 11140050), 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS, Kat.-Nr.: 10270-106).

### 2.2 Zellkultur

Die Zellen (Tabelle 2.1) wurden in Zellkulturflaschen der Firma Greiner Bio-One mit einer inneren Wachstumsfläche von 75 cm<sup>2</sup> bzw. 175 cm<sup>2</sup> bei Standardbedingungen

(37°C, 21 % Sauerstoff, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit) in einem Zellinkubator (ibsteconmara) kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle drei Tage. Bei ca. 80 % Konfluenz wurden die Zellen umgesetzt; hierzu wurden sie mit 0,05 % Trypsin (HyClone, GE Healthcare Life Sciences, Kat.-Nr.: SH30236.01) abgelöst. Es wurden keine Zellen über ihre 20. Passage hinaus verwendet. Die Zellzählung erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer (Marienfeld GmbH, Kat.-Nr. 0640010) in Trypanblau-Lösung (Sigma-Aldrich, Kat.-Nr.: T8154) unter dem Lichtmikroskop (Hund WETZLAR). Trypanblau gefärbte (=tote) Zellen wurden nicht gezählt.

### 2.3 Reagenzien

**CX5461** (Selleckchem.com, Kat.-Nr. S2684, 513,61 g x mol<sup>-1</sup>) wurde in Dimethylformamid (DMF) in einer Endkonzentration von 1 mmol/L gelöst.

**Navitoclax** (Selleckchem.com, Kat.-Nr. S1001, 974,61 g x mol<sup>-1</sup>) wurde in DMSO (Dimethylsulfoxid) in einer Endkonzentration von 1 mmol/L gelöst.

**ATM** (Selleckchem.com, Kat.-Nr. S2812, 578,61 g x mol<sup>-1</sup>) wurde in DMSO in einer Endkonzentration von 1 mmol/L gelöst.

Die Lösemittelkonzentration im Versuch betrug maximal 0,1 %.

### 2.4 Kristallviolett-Zellvitalitätsassay

Der Kristallviolett (KV)-Assay dient zum Nachweis vitaler Zellen *in vitro* und basiert auf der Bindung von Kristallviolett an die DNA der Zellen in einem proportionalen Verhältnis zwischen der Menge an gebundenem Farbstoff und der Zellzahl. Adhärenz Zellen wurden mit Methanol fixiert und mit Kristallviolett (0,25 % in PBS (g/L) mit 25 % (v/v) Methanol (Sigma-Aldrich, Kat.-Nr. C32675-500G) gefärbt. Nicht-gebundener Farbstoff wurde mit Aqua dest. ausgewaschen. Nach Trocknung der Zellen (im Abzug) wurde der Anteil an zellgebundenem Farbstoff mit Essigsäure (10 %, v/v) in Lösung gebracht und die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt (ELISA-Reader

sunrise von TECAN). Zur Berechnung der halbmaximalen inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) mit dem Statistik- und Grafik-Programm "Graphpad Prism" (<https://www.graphpad.com>) wurden die OD-Werte der KV-Assays in Relation zur Reagenz-Konzentration gesetzt.

## **2.5 Kristallviolett-Zellvitalitäts-(Kolonie-) Assay**

Der Kolonie-Assay (Colony Forming Assay, CFA) ist ein einfaches Verfahren zum Nachweis der Zunahme einer Zellpopulation. Adhärenente Zellen werden dazu mit Kristallviolett-Lösung gefärbt (Kapitel 2.4) und digital dokumentiert (EVOS, Invitrogen, Pathologisches Institut der Universität Würzburg).

## **2.6 WST-8-Zellvitalitätsassay**

Der WST-8-Assay (PromoCell, Kat.-Nr. PK-CA705-CK04) basiert auf der Reduktion des wasserlöslichen Tetrazoliums Salzes WST-8 durch zelluläre Dehydrogenasen. Der kolorimetrische Nachweis des Reduktionsproduktes Formazan, das ebenfalls löslich in Zellkulturmedium ist, ist direkt proportional zur Anzahl vitaler Zellen. Die Inkubationszeit mit WST-8 betrug zwei Stunden und die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt.

## **2.7 JC-1-Zellvitalitätsassay**

Der Farbstoff JC-1 (SigmaAldrich, Kat.-Nr. CS0390) ermöglicht die Funktion der mitochondrialen Atmungskette und damit die Zellvitalität zu überprüfen. Zellen mit einem polarisierten Membranpotential (und aktiver Atmungskette) färben sich rot, während Zellen mit einem depolarisierten Membranpotential (und inaktiver Atmungskette) sich grün färben. Die Färbung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (Technical Bulletin, Mitochondria Staining Kit, SigmaAldrich, Version 02/08-1). Am Fluoreszenzmikroskop wurde ein Minimum an 10 repräsentativen Gesichtsfeldern bei

20-facher Vergrößerung aufgenommen und die Fluoreszenzintensität mit dem Bildanalyseprogramm Image J (<https://imagej.net>) quantifiziert.

## **2.8 BrdU-Zellproliferationsassay**

Der BrdU-Assay (Roche, Kat.-Nr. 11647229001, Version 16) ist ein ELISA-basierter kolorimetrischer Zellproliferationsassay, der darauf basiert, dass sich teilende Zellen das Thymidin-Analogon Bromdesoxyuridin (BrdU) während der DNA-Replikation in ihre DNA einbauen. Das Markierungsreagenz mit BrdU wurde zum Zellmedium gegeben und bei Standardbedingungen (Kapitel 2.2) für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit *FixDenat* (ready-to-use-Lösung) fixiert, der HRP-konjugierte anti-BrdU-Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 zugegeben und weitere 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe der Substrat-Lösung wurde die Optische Dichte bei 370 nm bestimmt.

## **2.9 EdU-Zellzyklusassay**

Als ein weiteres Thymidin-Analogon zum Nachweis proliferierender Zellen wurde EdU (5-Ethynyl-2'-Deoxyuridin) verwendet. Der Nachweis von in die DNA eingebautem EdU erfolgt im Ggs. zum BrdU-Assay ohne Zellyse und DNA-Denaturierung. EdU ist damit für die Kombination mit DNA-interkalierenden Farbstoffen wie Sytox AAdvanced (ThermoFisher, Kat.-Nr. S10349) geeignet, um eine Zellzyklusanalyse durchzuführen (Darzynkiewicz et al., 2017). Zellen wurden mit 10 µmol/L EdU (Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Flow Cytometry Kit, SigmaAldrich, Kat.-Nr. C10419-20) für 1 Stunde im Zellinkubator bei Standardbedingungen (Kapitel 2.2) inkubiert, anschließend mit 4 % Formaldehyd für 15 Minuten fixiert und für 15 Minuten mit Saponin permeabilisiert. Zur Detektion von in die DNA eingebautem EdU wurden 500 µL des Click-iT®-Reaktions-Gemisches zu den Zellen gegeben, für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, gewaschen und mit 50 µg/ml (Endkonzentration) RNase (Merck, Kat.-Nr. 10109142001) inkubiert.

Nach Zugabe von 1  $\mu$ L Sytox AAdvanced folgte die durchflusszytometrische Untersuchung an einem CytoFLEX-Durchflusszytometer (Beckman Coulter). Die Daten wurden mit der CytExpert-Software (Beckman Coulter) ausgewertet.

### **2.10 OPP-Proteinsynthese-Assay**

Der Nachweis neu synthetisierter Proteine mit dem Click-iT<sup>®</sup> Plus OPP Protein Synthesis Assay Kit (SigmaAldrich, Kat.-Nr. C10456-59) in der Zelle basiert auf der Unterbrechung des Peptidtransfers auf eine wachsende Aminosäure-Kette durch OPP (O-Propargyl-Puromycin). Der Nachweis von OPP und damit zur Quantifizierung der neu synthetisierten Proteinketten erfolgte durch Zugabe von Alexa Fluor<sup>®</sup> Picolylsäure. Die Fluoreszenzintensität wurde bei 20-facher Vergrößerung von mindestens 10 repräsentativen Gesichtsfeldern mit dem Bildanalyseprogram Image J (<https://imagej.net>) ausgewertet.

### **2.11 Annexin V-Apoptose-Assay**

Der Annexin V-Assay (Thermo Fisher Scientific, Kat.-Nr. 88-8005) zum Nachweis von Apoptose (Meers, Mealy, 1994) basiert auf der Anfärbung apoptotischer Zellen mit FITC-konjugiertem Annexin. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen gewaschen und nach Zugabe von Propidiumiodid-Lösung im CytoFLEX-Durchflusszytometer (Beckman Coulter) untersucht. Die Daten wurden mit der CytExpert-Software ausgewertet.

### **2.12 SA- $\beta$ -Galactosidasefärbung**

Seneszenz-assoziierte (SA)  $\beta$ -Galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) stellt einen etablierten Seneszenz-Marker dar (Dimri et al., 1995). Die Zellen wurden bei Raumtemperatur für 15 Minuten mit Paraformaldehyd (2 % (w/v) in PBS, CarlRoth, Kat.-Nr. 0335.1) und Glutaraldehyd (0,25 % (v/v) in PBS, SigmaAldrich, Kat.-Nr. G5882) fixiert. Die Zugabe von Glutaraldehyd erforderte eine Inkubation der Zellen mit der X-Gal-Färbelösung noch am

gleichen Tag. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit PBS/MgCl<sub>2</sub>, pH 6,0 (1,0 mol/L MgCl<sub>2</sub>) gewaschen, danach folgte eine 17-stündige Inkubation in der X-Gal-Färbelösung bei 37°C in einem CO<sub>2</sub>-freien Inkubator (Firma Memmert). Die X-Gal-Färbelösung (Lagerung bei 4°C) wurde in PBS/MgCl<sub>2</sub>, pH 6,0 (1,0 mol/L MgCl<sub>2</sub>) angesetzt und bestand zu 2,5 % aus XGal (4 %-ige Stammlösung in Dimethylformamid; Roche, Kat.-Nr. 1168029 3001113) und aus 1x KC-Lösung (Stammlösung 20-fach konzentriert: 3,28 % (w/v) K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, Roche, Kat.-Nr. 244023) und 4,2 % (w/v) C<sub>6</sub>FeK<sub>4</sub>N<sub>6</sub>·3H<sub>2</sub>O, Roche, Kat.-Nr. P3289). Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und nach Fixierung mit 70 % Ethanol mikroskopiert.

### **2.13 Immunfluoreszenz-Färbung**

Die Immunfluoreszenz ermöglicht den optischen Nachweis von zellulären Strukturen durch spezifische Antikörper. Die Zellen wurden mit frisch verdünnter Formaldehyd-Lösung (4 %, v/v) für 15 Minuten fixiert, mit 0,1 % (v/v) Triton® X-100-Lösung für 3 Minuten permeabilisiert, dreimal mit PBS gewaschen und mit *Immunofluorescence Blocking*-Puffer (Cell Signaling Technology, Kat.-Nr. 1241) für 1 Stunde inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Tabelle 2.2) erfolgte bei 4°C über Nacht und die des Sekundärantikörpers bei Raumtemperatur für 1 Stunde (Tabelle 2.2). Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden diese mit *Pro Long Antifade*-Reagenz (Cell Signaling Technology, Kat.-Nr. 9071) eingedeckt. Die digitale Dokumentation erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Keyence) oder Konfokalmikroskop (Zeiss LSM 780, (Serviceeinheit konfokale Mikroskopie und Zellsortierung am Lehrstuhl für Virologie der Universität Würzburg).

**Tabelle 2.2: Primäre und sekundäre Antikörper für Immunfärbungen.**

Antikörper	Hersteller	Kat.-Nr.	Verdünnung <sup>1)</sup>
p.-Histon (Ser139)	CST	9781	1:1000
p53	Abcam	ab1101	1:1000
RPL29	GeneTex	GTX1833	1:1000
Nucleolin	CST	14574	1:1600
Goat anti-Rabbit IgG, Cy3-konjugiert	Jackson <sup>2)</sup>	111-165-003	1:800
Goat anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 488-konjugiert	CST	4412	1:2000

<sup>1)</sup> In *Immunofluorescence Antibody Dilution-Puffer* (Cell Signaling Technology, Kat.-Nr. 12378);

<sup>2)</sup> <https://www.jacksonimmuno.com>; CST: Cell Signaling Technology. Kat.-Nr.: Katalog- (bzw. Bestell-) Nr.

## 2.14 RT-qPCR

Die Reverse-Transkriptase (RT) quantitative (q) Polymerase-Kettenreaktion ist ein Nachweisverfahren für mRNA (Messenger-Ribonukleinsäure, engl. *ribonucleic acid*) als Maß der Genaktivität. Die RT-qPCR kombiniert die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) – ein Amplifikationsverfahren von DNA (Desoxyribonukleinsäure, engl. *desoxyribonucleic acid*) – mit einer davor geschalteten Reverse-Transkriptase-Reaktion zur Synthese der Komplementär-(copy) DNA aus mRNA. Mit entsprechenden spezifischen Primer-Paaren werden die gesuchten cDNA-Sequenzen amplifiziert. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer-Paare sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.



**Tabelle 2.3: Primer für die RT-qPCR.** Die Annealing-Temperatur der Primer-Paare lag bei 60°C. Siehe auch Text.

Gen	PubMed-ID	Größe (bp)	Primer (Sequenz 5' → 3')
<i>POLR1A</i>	NM_009088.3	99	forward: GCCACGGTGCACAAGAAATC reverse: CCCTCGTTTCCCATCTGAG
<i>POLR1B</i>	NM_009086.2	89	forward: GGACTCCTTCAACTACGCGG reverse: TGCCTCATCTTTGAAAGCAA
<i>UBTF</i>	NM_011551.7	100	forward: CCCTACTAGCACCCACTTG reverse: TCCGTTCACTTCCAGCTGTC
<i>RRN3</i>	NM_001039521.1	71	forward: GAGGCGTGAAATTCTGGAGC reverse: TATCCTGCCGCGATACACTC
45S-Prä-rRNA	NR_046233.2	77	forward: TCCTTGTGGATGTGTGAGGC reverse: GGGAACATGGTCAAGCGAGA
<i>CDKN1A</i>	NM_000389.4	80	forward: GGA TTC GCC GAG GCA CCG AG reverse: GCC GCA TGG GTT CTG ACG GA
<i>PPIA</i>	NM_021130.3	82	forward: GCT GGA CCC AAC ACA AAT GG reverse: CAA ACA CCA CAT GCT TGC CA
<i>ACTB</i>	NM_001101.3	70	forward: CCT CGC CTT TGC CGA TCC reverse: CAC GAA AGC AAT GCT ATC AC

Das Gen *CDKN1A* codiert für das Protein p21. Das Gen *ACTB* codiert für das Protein  $\beta$ -Aktin.

Eine Million Zellen wurden mit 1 mL Trizol (Invitrogen GmbH, Kat.-Nr. 15596026) lysiert, mit 100  $\mu$ L Chloroform (Carl ROTH GmbH und Co. KG, Kat.-Nr. T901.1) gemischt und zentrifugiert. Die Gesamt-RNA wurde aus der wässrigen Phase mit 500  $\mu$ L Isopropanol gefällt (SigmaAldrich, Kat.-Nr. 1096341000), pelletiert (16 000 xg, 15 min, 4°C), mit Ethanol (75 % (v/v), SigmaAldrich, Kat.-Nr. 1009800500) gewaschen und getrocknet. Die mit "RNA storage solution" (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Kat.-Nr. AM7000) resuspendierte RNA wurde bei -80°C gelagert. Die cDNA-Synthese mit 600 ng Gesamt-RNA wurde mit dem iScript-Kit (BIO-RAD, Kat.-Nr. 170-8891), die qPCR (hierzu wurde die cDNA 1:5 vorverdünnt; Endkonzentration im PCR-Ansatz: 1:60) mit dem iTaq Universal SYBR Green Supermix (BIO-RAD, Kat.-Nr. 1725120) nach Herstellerangaben durchgeführt. Folgendes Temperaturzyklusprofil wurde im PCR-Cycler (CFX96, BIO-RAD) durchlaufen: 1x 30 Sekunden bei 95°C, jeweils 40 Zyklen zu 5 Sekunden bei 95°C, 30 Sekunden bei 60°C und ein abschließender Zyklus für 5 Minuten bei 72°C. Die Transkription wurde auf die Referenzgene  $\beta$ -Aktin und Peptidyl-Prolyl-Isomerase A (*PPIA*) mit der  $\Delta\Delta Cq$ -Methode berechnet (Pfaffl, 2001). Die Effizienz der Enzymreaktion lag zwischen 95 % und 105 % (Daten nicht gezeigt).

## 2.15 Western Blot

Der Western Blot ist eine Analysemethode zum spezifischen Nachweis von Proteinen auf einer Trägermembran. Mit einer vorgeschalteten Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden die Proteine nach Größe und Ladung aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen („geblottet“). Durch Inkubation mit einem spezifischen Antikörper erfolgt der Nachweis eines gesuchten Proteins (Tabelle 2.4). Nach Zellyse (HEPES-Puffer mit 1 % SDS, pH 7,6) und Degradation der DNA mit einem Ultraschallgerät wurde die Gesamtprotein-konzentration mit dem Pierce BCA-Protein-Kit (ThermoFisher Scientific, Kat.-Nr.: 23227) bestimmt. Pro Geltasche eines SDS-Page wurden 15 µg Protein, vermischt mit Lämmli-Puffer, pH 6,8, aufgetragen und bei 100 V für 1 Stunde aufgetrennt. Das SDS-PAGE mit den aufgetrennten Proteinen wurde auf eine Nitrozellulose-Membran (Schleicher&Schuell) in Towbin-Laufpuffer bei 170 mA innerhalb von 75 Minuten übertragen. Unspezifische Bindungen wurden mit 5% Milchpulver in 1x TBS-T (Tris-gepufferte Kochsalzlösung (*Tris-buffered-saline* mit 1 % (v/v) Tween 20, pH 7,6) geblockt. Die Primärantikörper (Tabelle 2.4) wurden über Nacht inkubiert, der Sekundärantikörper (Tabelle 2.4) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Detektion der Proteine auf der mit Chemolumineszenz-Lösung (*Cheluminat-HRP Pico Detect* von PanReac AppliChem) bedeckten Nitrozellulose-Membran erfolgte mit dem *ChemiDoc-Imaging*-System (BIO-RAD) in Kombination mit der *ImageLab*-Software von BIO-RAD.

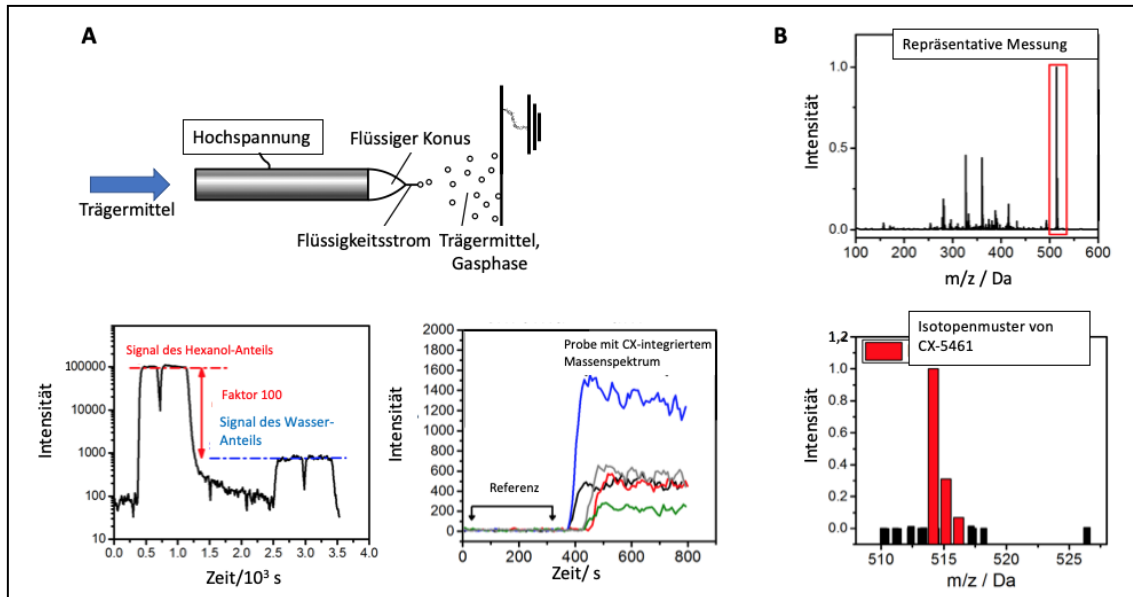
**Tabelle 2.4: Antikörper (Primäre, Sekundärer) für die Western Blot-Analysen.**

Antikörper	Hersteller	Kat.-Nr.	Verdünnung	Größe [kDa]
p.-Histon (Ser139)	CST	9781	1:1000	15
GAPDH	Sigma-Aldrich	G9295	1:10 000	37
p.-CHK2 (Thr68)	CST	2197	1:1000	62
p.-ATM (Ser1981)	CST	13050	1:1000	350
p.-p53 (Ser15)	CST	9284	1:1000	53
p53	Abcam	ab1101	1:1000	55
p21	Abcam	ab7960	1:1000	18
RPS14	Bethyl-Lab	A304-031A-T	1:1000	18
RPL29	GeneTex	GTX1833	1:1000	18
p.-Histon H3 (Ser10)	Milipore	06-570	1:1000	17
Tubulin	Sigma-Aldrich	T6074	1:1000	50
p.-Rb (Ser975)	CST	9301	1:1000	110
Rb	CST	9309	1:2000	110
MCM6	Bethyl-Lab	A300-194A-M	1:1000	110
Goat anti-Rabbit, HRP-konjugiert	Dako	E0432	1:10 000	-----

CST: Cell Signaling Technology; HRP: Horseradish Peroxidase. Kat.-Nr.: Katalog- (bzw. Bestell-) Nummer

## 2.16 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (*differential mobility analysis-mass spectrometry*, DMA-MS) ist ein Verfahren zum spezifischen Nachweis einer Substanz in einem Lösemittel. Das Prinzip der Massenspektrometrie ist in Abbildung 2.2 (A) schematisch gezeigt. Das Trägermittel, in dem CX-5461 gelöst vorliegt, wurde nach dem Prinzip der Elektromobilitätsdifferenzierung mobilisiert und in die Gasphase gebracht. Durch Anlegen einer Hochspannung wurden die Substanzen im Trägermittel nach ihren Massen aufgetrennt. Hierbei wurde anstatt Wasser Hexanol verwendet, da dies eine höhere Signalintensität ergab (Abbildung 2.1 (A)). Das entstehende Massen-Chromatogramm wurde über die Zeit aufsummiert. Hierbei konnte ein entsprechendes Isotopenmuster um das für CX-5461 bekannte Molekulargewicht von 513,61 Dalton nachgewiesen werden (Abbildung 2.1 (B)) relativ zu einer Referenzprobe ohne CX-5461 ("Referenz" in Abbildung 2.1 (A)); dort war das Isotopenmuster nicht nachzuweisen (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 2.1: Prinzip der Massenspektrometrie (DMA-MS) nach Elektromobilitätsdifferenzierung mit entstandenem Massen-Chromatogramm (A) und der Nachweis von CX-5461 durch ein spezifisches Isotopenmuster (B).** Bei den verschiedenen Proben (kenntlich gemacht durch verschiedene Farben in Teilabbildung A unten rechts) handelte es sich um zellfreie Zellkulturüberstände von mit 1  $\mu\text{mol/L}$  CX-5461 inkubierten kolorektalen Karzinomzellen verschiedener Zelllinien für sieben Tage. Das Lösungsmittel Hexanol, das anstelle von Wasser aufgrund höherer Signalintensitäten verwendet wurde und in dem das nachzuweisende CX-5461 gelöst vorliegt, wurde in die Gasphase gebracht und durch Anlegen einer Hochspannung nach der elektrischen Mobilität aufgetrennt. Anschließend wurde mit Hilfe eines TOF (Time-Of-Flight)-Detektors das Massenspektrum bestimmt. Die Summation der Intensitäten über die Zeit erlaubte die Identifikation des Isotopenmusters von CX-5461 nur in den Proben (rot markiert), zu denen CX-5461 hinzugegeben wurde.

## 2.17 Statistik

Die statistischen Auswertungen (t-Test oder Varianzanalyse mit Post-hoc-Tests, jeweils in der Bildunterschrift genannt) wurden mit GraphPad PRISM (Version 9) durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert und das 95 % Konfidenzintervall bzw. die Standardabweichung. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p=0,05$  gesetzt.

### 3 Ergebnisse

Der niedermolekulare (*small molecule*) DNA-abhängige RNA-Polymerase I (Pol I) Inhibitor CX-5461 wurde auf seine Fähigkeit, die Proliferation kolorektaler Karzinomzellen *in vitro* zu hemmen, getestet. Der durch CX-5461 induzierte antiproliferative Zellphänotyp wurde eingehend untersucht und die hieran beteiligten Signalwege identifiziert. Zusätzlich wurde CX-5461 mit Navitoclax, ein Inhibitor der Bcl-Proteinfamilie, kombiniert, um den antiproliferativen Effekt von CX-5461 zu verstärken.

#### 3.1 Der antiproliferative Effekt von CX-5461: Zellzyklusarrest und seneszenten Zellphänotyp

Zur Bestimmung eines die Zunahme an vitalen Zellen begrenzenden (=antiproliferativen) Effekts von CX-5461 wurden kolorektale Karzinomzellen mit Konzentrationen von  $10^{-5}$  bis  $10^{-8}$  mol/L für 72 Stunden inkubiert und der Anteil vitaler Zellen mit Kristallviolett-Färbung bestimmt. Aus dem sigmoiden Kurvenverlauf, der aus der logarithmischen Darstellung der Konzentration an CX-5461 und dem Anteil an vitalen Zellen erhalten wird, wurde die halbmaximale inhibitorische Konzentration (*half maximal inhibitory concentration*), kurz  $IC_{50}$ , für jede Zelllinie mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism, Version 5.0, berechnet (Tabelle 3.1).

**Tabelle 3.1: Der antiproliferative Effekt von CX-5461 für sieben humane kolorektale Karzinomzelllinien und Fibroblasten (NHDF).** Der  $IC_{50}$  von CX-5461 in  $\mu\text{mol/L}$  ist als Mittelwert und 95 %-Konfidenzintervall [in Klammern] für 3 unabhängige Versuche (biologische Replikate) angegeben. \* p53 deletierte Variante der Zelllinie.

CaCo2	DLD1	HCT116	HCT116*	HT29	LS174t	SW480	NHDF
1,37	0,80	0,70	1,07	1,24	0,71	3,08	8,14
[0,90-2,09]	[0,53-1,20]	[0,54-0,90]	[0,72-1,57]	[1,02-1,51]	[0,42-1,20]	[2,24-4,23]	[4,65-14,24]

Von den untersuchten kolorektalen Karzinomzelllinien lag der  $IC_{50}$ -Wert für drei Zelllinien unter  $1,0 \mu\text{mol/L}$  CX-5461, für drei Zelllinien unter  $1,5 \mu\text{mol/L}$  und für SW480

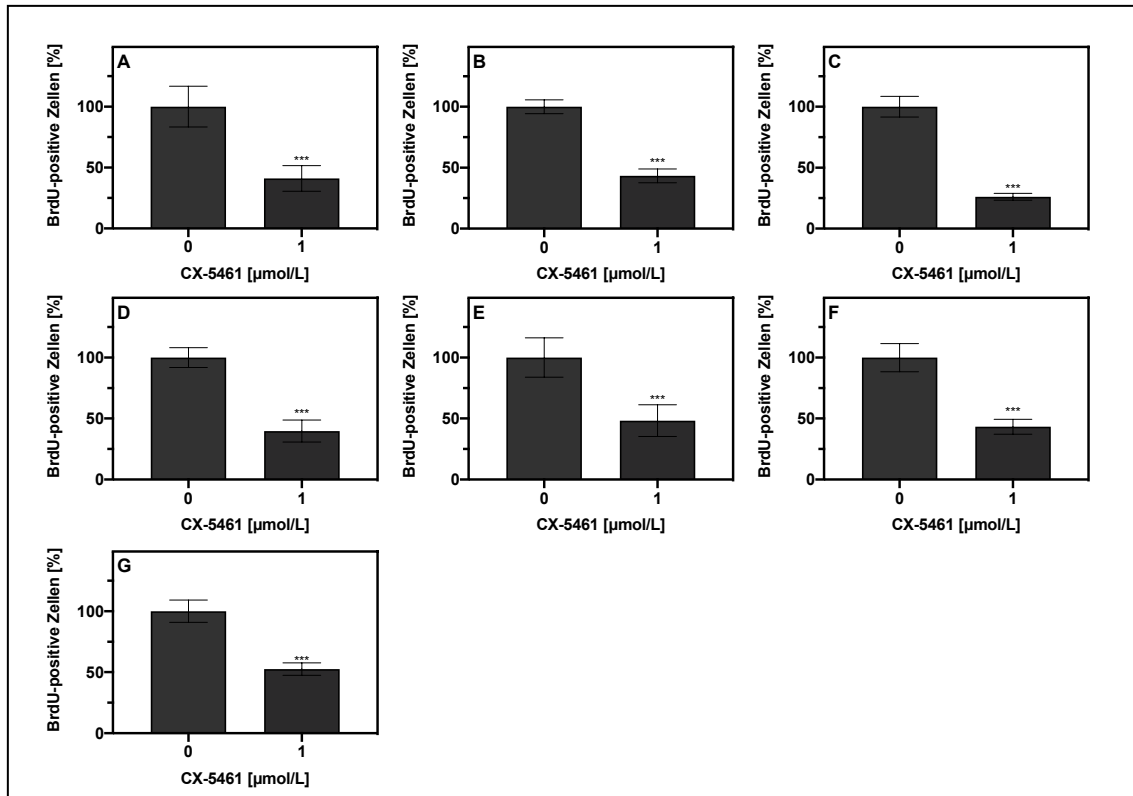
bei 3,08  $\mu\text{mol/L}$ . Für nicht-transformierte Fibroblasten wurde ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 8,14  $\mu\text{mol/L}$  CX-5461 ermittelt (Tabelle 3.1). Damit war der antiproliferative Effekt von CX-5461 bei kolorektalen Karzinomzellen um den Faktor 2,6 (SW480) bis 11,6 (HCT116) deutlich stärker als bei Fibroblasten.

Der durch CX-5461 induzierte antiproliferative Effekt basiert auf einer Abnahme proliferationsfähiger Zellen (Abbildung 3.1 und 3.2), die keine Anzeichen einer Apoptose-induktion aufweisen (Abbildung 7.1 im Anhang).

Der antiproliferative Effekt von CX-5461 scheint zudem unabhängig vom Ausmaß der für jede Tumorzelllinie charakteristischen Zellproliferation zu sein (Tabelle 7.1 in Kombination mit Abbildung 7.2 im Anhang).

Auch eine gezielte Änderung der Zellkulturbedingungen von 10 % auf 1 % FCS und ein damit einhergehender Einfluss auf die Stärke der Zellproliferation ist ohne Einfluss auf die Stärke des antiproliferativen Effektes von CX-5461 (Abbildung 7.3 im Anhang).

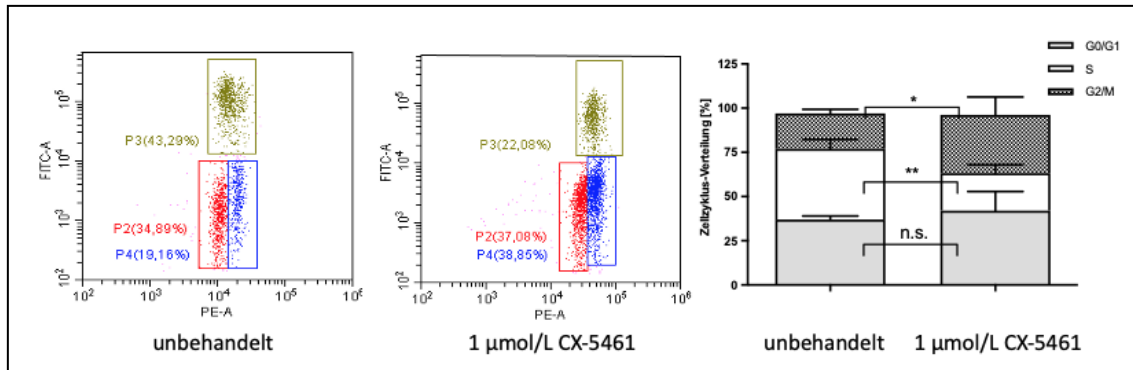
Um den antiproliferativen Effekt von CX-5461 quantifizieren zu können, wurde der Anteil der in Teilung befindlichen Zellen über den Einbau chemisch modifizierter Analoga des Nukleosids Thymidin wie BrdU (Abbildung 3.1) und EdU (Abbildung 3.2) bestimmt.



**Abbildung 3.1: CX-5461 verringert den Anteil proliferierender (BrdU-positiver) Zellen.** Der Anteil BrdU-positiver Zellen wurde nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden auf die Null (0)-Kontrolle, d. h. mit CX-5461 unbehandelte Zellen, normalisiert. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung zu einem repräsentativen Versuch mit sechs technischen Replikaten für Kontroll- und Versuchsansatz (1 µmol/L CX-5461) angegeben. (A) CaCo2, (B) DLD1, (C) HCT116, (D) HCT116 p53<sup>-/-</sup>, (E) HT29, (F) LS174t und (G) SW480. \*\*\*p < 0.001 zur unbehandelten Null-Kontrolle (ungepaarter t-Test).

Mit einer durch CX-5461 vermittelten Abnahme proliferierender Zellen (Abbildung 3.1) ist ebenfalls eine Beeinflussung des Zellzyklus zu erwarten. Mit dem Begriff Zellzyklus werden die verschiedenen Aktivitätsphasen vor einer Zellteilung beschrieben wie z. B. die DNA-Replikation in der S-Phase (Zeman et al., 2014).

Durchflusszytometrische Untersuchungen zum Zellzyklus CX-5461 behandelter Zellen zeigen zusätzlich zu einer Abnahme der sich teilenden Zellen in der S-Phase eine Anreicherung von Zellen in der G2-Phase (Abbildung 3.2). Dies bedeutet, dass durch CX-5461 der Großteil an Zellen nicht in die Mitose wechseln kann.

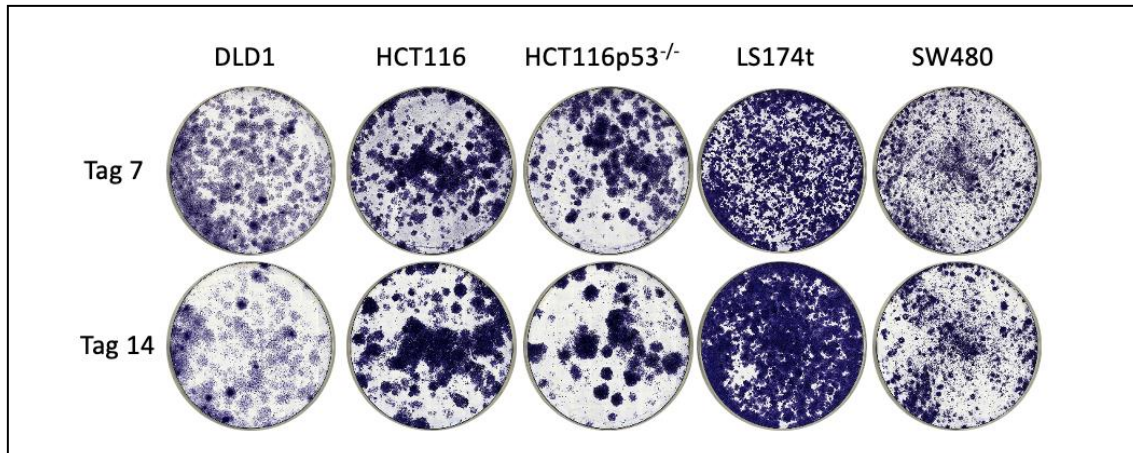


**Abbildung 3.2: CX-5461 verringert den Anteil proliferierender Zellen in der S-Phase und führt zum Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase.** Gezeigt ist links eine repräsentative Zellzyklusanalyse mit dem Click-iT EdU Flow Cytometry Assay. Zellen der Zelllinie HCT116 wurden mit 1 µmol/L CX-5461 für 24 Stunden inkubiert. Aufgetragen auf der X-Achse ist die Fluoreszenzintensität von SYTOX AADvanced, einem DNA-Farbstoff, und auf der Y-Achse die Fluoreszenzintensität von EdU, einem Thymidinanalogon. Die Zellzyklusphasen sind: S-Phase (P3); G1-Phase (P2) und G2-Phase (P4). Durch die Inkubation mit CX-5461 nimmt der Anteil an proliferierenden Zellen in der S-Phase ab und es kommt zu einer Anreicherung von Zellen in der G2-Phase, aus der sie nicht in die Mitose übergehen können. Diagramm: Prozentuale Anteile der Zellen für die drei Zellzyklusphasen. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  in einem korrigierenden Test nach Sidák nach Varianzanalyse; n.s. nicht signifikant.

Als wesentliches Ergebnis zum antiproliferativen Effekt von CX-5461 bei kolorektalen Karzinomzellen bleibt festzuhalten, dass dieser zum Zellzyklus-Arrest führt und nicht wie z. B. bei hämatologischen Tumorzellen zu pro-apoptotischen Effekten (Negi, Brown, 2015b; Hein et al., 2017).

Die in den Abbildungen 3.1 und 3.2 gezeigten Kurzzeiteffekte (innerhalb von 72 Stunden) von CX-5461 führten zu einer Persistenz Zellzyklus-arretierter Zellen (Abbildung 3.3). So unterschieden sich Kulturen, deren Zellen bis Tag 7 mit CX-5461 (1 µmol/L oder weniger) oder bis Tag 14 mit CX-5461 (1 µmol/L oder weniger) inkubiert waren, kaum in der Anzahl vitaler Zellen (Abbildung 3.3).



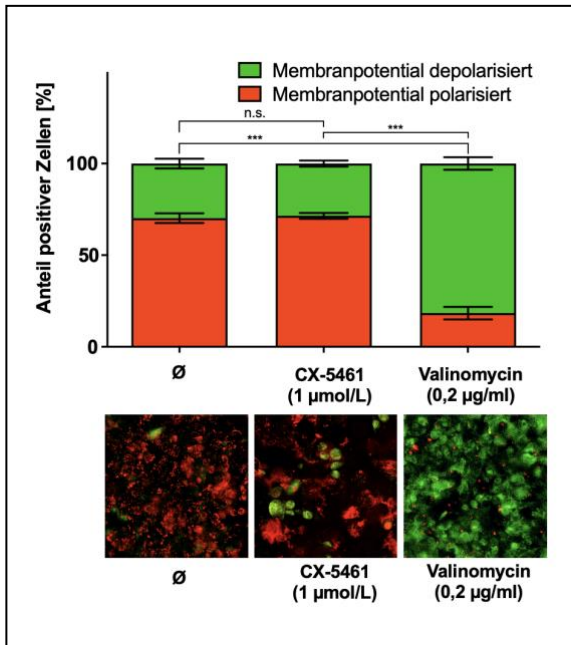


**Abbildung 3.3: Persistenz von CX-5461-induzierten Zellzyklus-arretierten Zellen.** Gezeigt ist das repräsentative Ergebnis für fünf kolorektale Zelllinien bei 4-facher Vergrößerung. Pro Vertiefung einer Zellkulturschale mit 6 Vertiefungen wurden zwischen  $2 \times 10^3$  und  $8 \times 10^3$  Zellen ausgesät. Sechs Tage nach Aussaat wurden die Zellen mit  $1 \mu\text{mol/L}$  CX-5461 für 7 bzw. 14 Tage inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle drei Tage.

Mit Hilfe der Massenspektrometrie (*differential mobility analysis-mass spectrometry*, DMA-MS) wurde in Zellen, die für 7 Tage in CX-5461-haltigem Medium inkubiert waren, CX-5461 in einer Größenordnung von ca.  $1\text{-}10 \text{ nmol/L}$  nachgewiesen. Dieses Ergebnis bestätigt einerseits die in der Literatur beschriebene zellgängige (membranpassierende) Eigenschaft von CX-5461. Andererseits stützt der Nachweis von CX-5461 in Zellzyklus-arretierten Zellen die Annahme, dass CX-5461 an der Ausbildung dieses Zellphänotyps maßgeblich beteiligt ist. Auch die anschließende Kultur der Zellzyklus-arretierten Zellen in CX-5461 freiem Medium konnte den Zellzyklusarrest nicht aufheben (Daten nicht gezeigt). Die für eine Persistenz Zellzyklus-arretierter Zellen notwendige Konzentration an CX-5461 orientierte sich am Median ( $1,0 \mu\text{mol/L}$ ) der für die sieben kolorektalen Zelllinien bestimmten  $\text{IC}_{50}$ -Werte (Tabelle 3.1). Konzentrationen an CX-5461 von über  $1 \mu\text{mol/L}$  für 7 Tage waren dagegen zelltoxisch (Daten nicht gezeigt).

Dass die mit CX-5461 behandelten Zellen zwar teilungsinaktiv waren, aber dennoch stoffwechselaktiv, wurde mit dem JC1-Vitalitätsassays bestätigt (Abbildung 3.4). Mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC1 wurde die Funktion der Atmungskette und damit die Vitalität der mit CX-5461 behandelten Zellkulturen überprüft. Dabei zeigte sich, dass CX-5461 die Zellvitalität nicht negativ beeinflusst; dies Ergebnis konnte mit einem weiteren

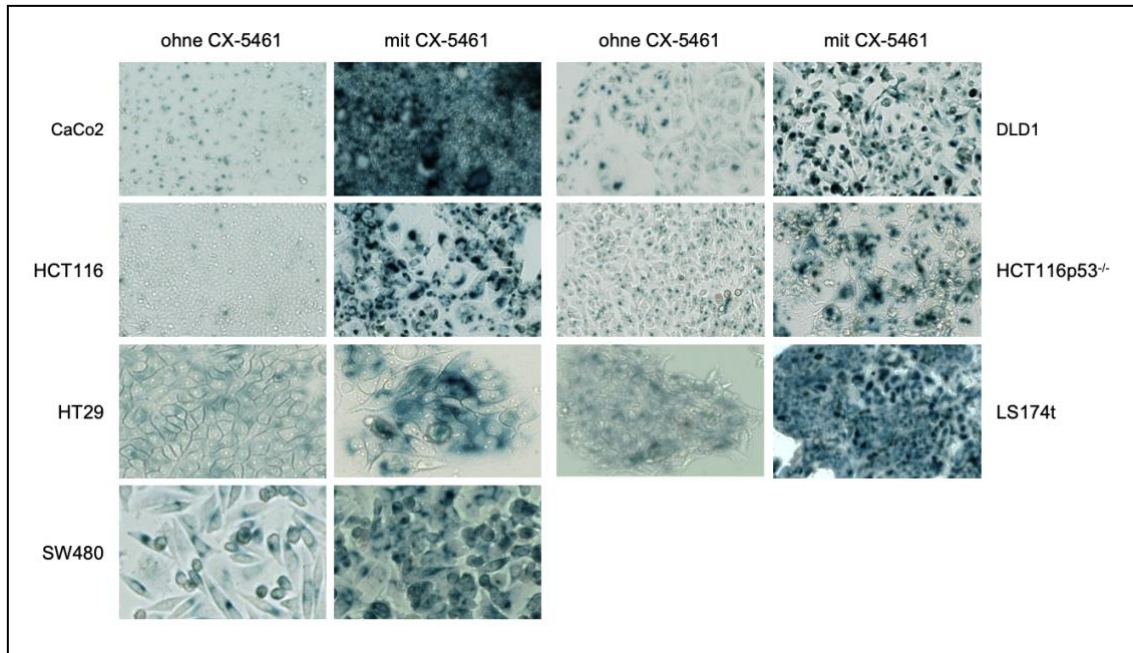
Vitalitätsassay (WST8) und auch Apoptoseassay (Annexin V) bestätigt werden (nicht gezeigt).



**Abbildung 3.4: Durch CX-5461 induzierte Zellzyklus-arretierte Zellen mit seneszentem Phänotyp weisen aktive Mitochondrien auf.** Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1. DLD1-Zellen wurden mit 1 µmol/L CX-5461 für eine Woche inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgte drei Tage nach Aussaat. Zellen mit einem polarisierten Membranpotential (und aktiver Atmungskette) sind rot gefärbt, während Zellen mit einem depolarisierten Membranpotential (und inaktiver Atmungskette) sich grün färben. Mit dem Programm Image J wurde der relative Anteil grüner und roter Fluoreszenz für jeweils mindestens 10 Gesichtsfelder pro Versuchsgruppe bei 20-facher Vergrößerung bestimmt. (Ø): unbehandelte Kontrolle. \*\*\* $p < 0,001$  in einem korrigierenden Test nach Tukey nach Varianz-Analyse; n.s. nicht signifikant.

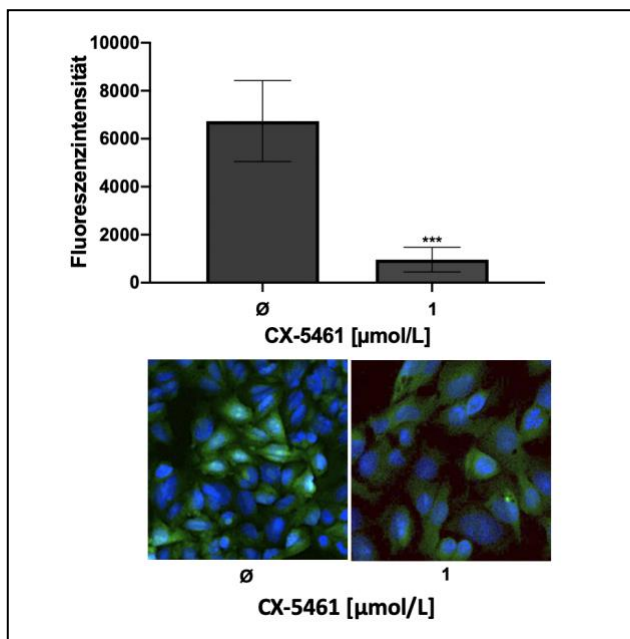
Der Verlust an Zellteilungsaktivität (Abbildung 3.2 und Abbildung 3.3) bei Persistenz vitaler und stoffwechselaktiver Zellen (Abbildung 3.4) deutet auf einen Zellphänotyp hin, der in der Literatur als seneszenten Phänotyp bekannt ist (Hayflick, Moorhead, 1961). Um zu überprüfen, dass das antiproliferative Potential von CX-5461 tatsächlich einen seneszenten Zellphänotyp induziert, wurden die Zellen auf die Reaktivität der Seneszenz-assoziierten  $\beta$ -Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal) hin untersucht, ein etablierter Marker zum Nachweis seneszenten Zellen (Dimri et al., 1995).

Mit der Färbemethode zum Nachweis reaktiver SA- $\beta$ -Gal konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei kolorektalen Karzinomzellkulturen, die für 7 Tage mit einer Konzentration von 1 µmol/L CX-5461 inkubiert wurden, der SA- $\beta$ -Gal-positive seneszenten Zellphänotyp die Kultur dominierte (Abbildung 3.5). Bereits nach einer dreitägigen Inkubation mit 1 µmol/L CX-5461 waren Zellen mit einem seneszenten Phänotyp nachweisbar (Abbildung 7.4 A im Anhang).



**Abbildung 3.5: CX-5461 induziert einen seneszenten Zellphänotyp.** Die Zellen wurden mit 1  $\mu\text{mol/L}$  CX-5461 für eine Woche inkubiert und auf die Reaktivität der Seneszenz-assoziierten  $\beta$ -Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal) überprüft (tiefblaue Bereiche). Gezeigt sind repräsentative Färbungen bei 10-facher Vergrößerung. Drei Tage nach Beginn der Inkubation mit CX-5461 erfolgte ein Mediumwechsel. In Abbildung 7.4 (A) im Anhang ist der Nachweis einer SA- $\beta$ -Gal-Reaktivität nach drei Tagen Inkubation mit CX-5461 gezeigt. Eine Quantifizierung erfolgte durchflusszytometrisch mit einer Spider- $\beta$ -Galactosidase-Immunfluoreszenz-Färbung (Abbildung 7.4 (B) und 7.4 (C) im Anhang).

Zusätzlich zu einer reaktiven SA- $\beta$ -Gal zeigen seneszente Zellen eine reduzierte Proteinbiosynthese (Frenk, Houseley, 2018). Um zu prüfen, ob auch der durch CX-5461 induzierte seneszente Zellphänotyp eine reduzierte Proteinbiosynthese aufweist – als eine weitere Auswirkung der Pol I-Inhibition durch CX-5461 (s. Einleitung und Diskussion) –, wurde die Proteintranslation in CX-5461 behandelten Tumorzellen untersucht. Dabei ist deutlich geworden, dass durch CX-5461 induzierte seneszente Zellen eine reduzierte Proteintranslation zeigen, die, angepasst an die physiologischen Bedingungen in seneszenten Zellen, zum Erhalt der Zellvitalität beiträgt (Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6: Der durch CX-5461-induzierte seneszente Zellphänotyp weist eine verringerte Proteinsynthese auf.** Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis eines Click-it OPP-Assays an Zellen der kolorektalen Zelllinie DLD1 nach Inkubation mit CX-5461 für 48 Stunden. Die Fluoreszenzintensität von jeweils mindestens 10 repräsentativen Gesichtsfeldern wurde bei 20-facher Vergrößerung mit dem Programm Image-J ausgewertet. \*\*\* $p < 0.001$  zur unbehandelten Null-Kontrolle (ungepaarter t-Test). Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen bei 40-facher Vergrößerung. Blau: DAPI (Kernfärbung); Grün: Bereiche der Proteinbiosynthese (Ribosomen).

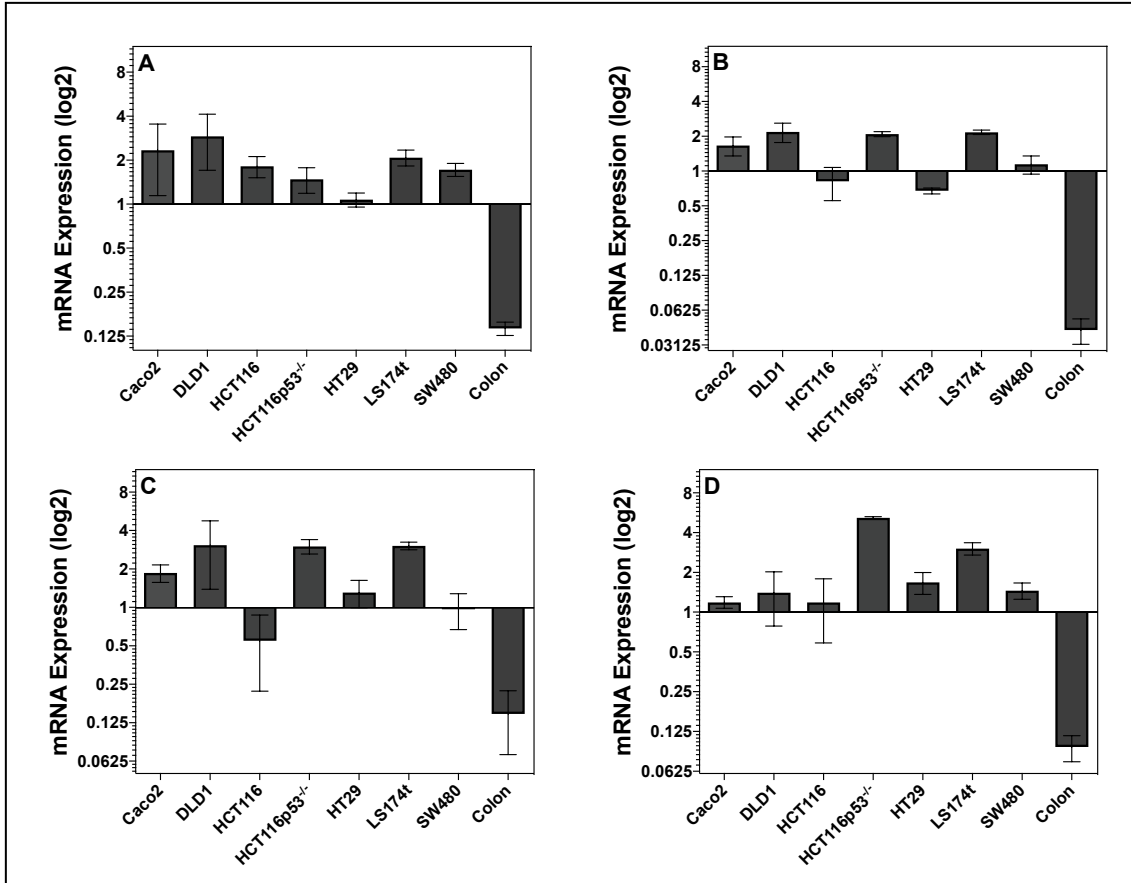
Für die Ribosomenbiogenese und die damit verbundene Translation ribosomaler Proteine muss die Zelle einen Großteil ihrer zellulären Energie (in Form von ATP) aufwenden. So kodieren 9 von 10 mRNAs, die von der Zelle posttranskriptionell modifiziert werden, für ribosomale Proteine (Warner, 1999). Daher muss die Ribosomenbiogenese äußerst exakt auf die Bedürfnisse der Zelle abgestimmt sein, um einen nicht notwendigen Überschuss an Ribosomen, deren Herstellung äußerst energieaufwendig ist, zu vermeiden. Somit erscheint es nachvollziehbar, dass die durch CX-5461 ausgelöste verminderte Zellproliferation (Abbildung 3.1 und 3.2) auch Einfluss nimmt auf das Ausmaß der Ribosomenbiogenese. Als Indiz für ein solches Szenario spricht die in dieser Arbeit gezeigte und durch CX-5461 ausgelöste verminderte Proteintranslation (Abbildung 3.6).

Zahlreiche nachgewiesene Eigenschaften von CX-5461-inkubierten Zellen, wie Erhalt der Zellvitalität (Abbildung 3.4) bei irreversiblen Zellzyklusarrest (Abbildung 3.2), der Nachweis einer reaktiven SA-β-Gal (Abbildung 3.5) und eine reduzierte Proteinbiosynthese (Abbildung 3.6), lassen sich als relevante Indizien anführen, dass CX-5461 in kolorektalen Karzinomzellen einen seneszenten Zellphänotyp induziert.

### **3.2 CX-5461-induzierte Seneszenz: Hemmung der Transkription ribosomaler Nukleinsäuren**

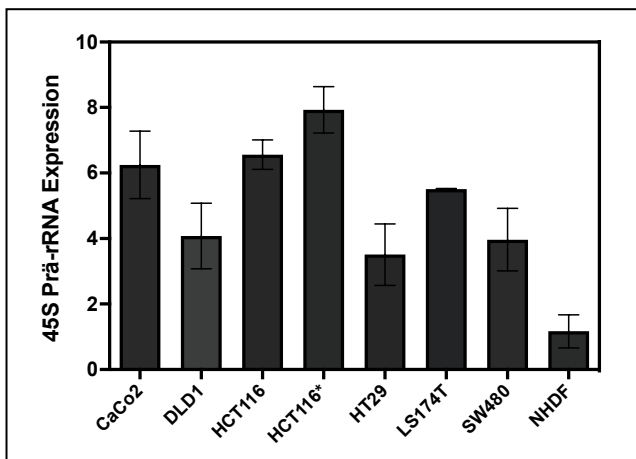
Hyperaktive Tumorzellproliferation erfordert eine gesteigerte Proteinbiosynthese, gekoppelt an eine angepasste Regulation der Ribosomenbiogenese. Ribosomen – Orte der Proteinbiosynthese – setzen sich aus Ribosomalen Proteinen (RPs) und ribosomalen RNAs (rRNAs) zusammen (Kapitel 1.2). Nahezu sämtliche zum Aufbau eines Ribosoms notwendigen rRNAs werden aus der 45S-Prä-rRNA, prozessiert (Kapitel 1.2), die von der Pol I synthetisiert wird (Moore, Steitz, 2002) – die Zielstruktur von CX-5461 (Drygin et al., 2011).

Der Anteil an 45S-Prä-rRNA ist äußerst exakt an den aktuellen Bedarf der Zelle an neu-synthetisierten Ribosomen abgestimmt (Tsoi et al., 2017). Somit sollte eine gesteigerte Tumorzellproliferation mit erhöhten Anteilen an 45S-Prä-rRNA einhergehen, die an den Bedarf an Ribosomen durch eine gesteigerte Tumorzellproliferation angepasst ist. Da die Synthesekapazität einer einzelnen Pol I begrenzt ist und sich vermutlich kaum erhöhen lässt, kann dies nur bedeuten, dass die Zelle mehr Pol I-Moleküle bilden muss. Dies ist dadurch zu erreichen, dass die Transkriptionsrate der Gene verstärkt wird, die für die Proteinuntereinheiten der Pol I kodieren. Der Pol I-Komplex besteht aus mehreren Untereinheiten, unter anderen dem Heterodimer POLR1 AC40-AC19, kurz POLR1A, und POLR1 RPB6, kurz POLR1B. Durch weitere an Pol I bindende Faktoren, wie unter anderen RRN3, das an die A43-Untereinheit der Pol I bindet, wird die Transkription von rRNA nach Bindung an die rDNA (vermittelt durch den UB(T)F/SL1-Komplex) initiiert (Russell, Zomerdijs, 2006). Ob es auch für kolorektale Karzinomzellen Hinweise auf eine gesteigerte Transkriptionsrate der Pol I-Gene *POLR1A* und *POLR1B* und weiterer, für die Transkription relevanter Faktoren (*UBTF* und *RRN3*) kommt, wurde mit Hilfe der quantitativen RT-PCR (RT-qPCR) überprüft, indem der Anteil der mRNA-Transkripte dieser Gene bestimmt wurde. Dabei stellte sich heraus, dass diese mRNA-Transkripte in kolorektalen Karzinomzellen deutlich erhöht waren im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen der Kolonschleimhaut (Abbildung 3.7).



**Abbildung 3.7: Untereinheiten der Pol I und Transkriptionsfaktoren sind in kolorektalen Tumorzellen überexprimiert.** Daten der quantitativen PCR (RT-qPCR) in logarithmischer Darstellung sind als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben von drei bis vier biologischen Replikaten. (A) POLR1A, (B) POLR1B, (C) UBTF und (D) RRN3.

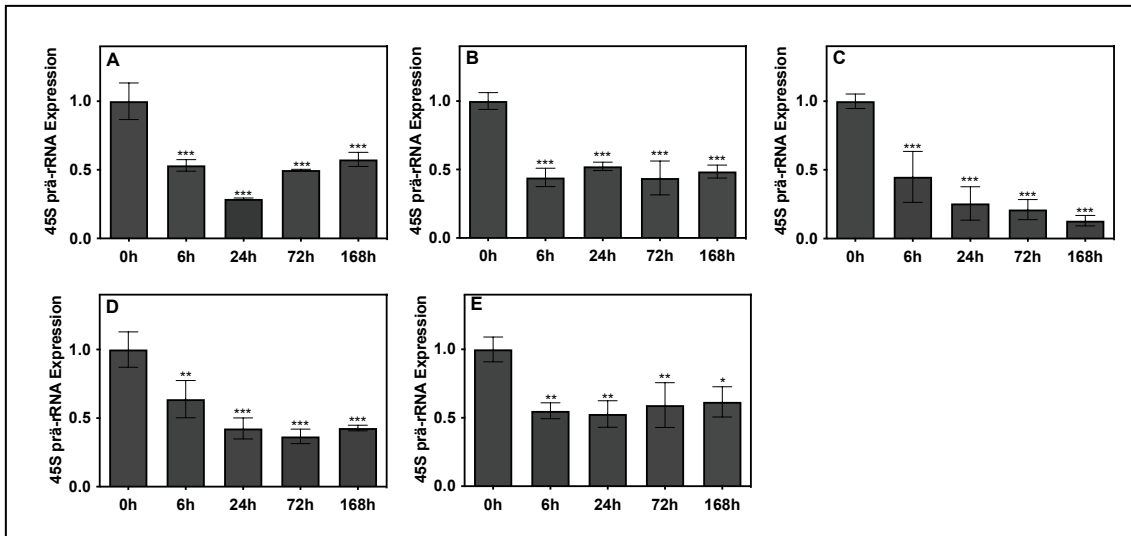
Auch für das Produkt der Pol I, die 45S-Prä-rRNA (Kapitel 1.2), war eine Überexpression in kolorektalen Karzinomzellen nachzuweisen (Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8: Überexpression der 45S-Prä-rRNA in kolorektalen Karzinomzellen.** Dargestellt ist das Ergebnis von drei unabhängigen RT-qPCR-Analysen (biologische Replikate) als Mittelwert mit Standardabweichung normalisiert auf die Expression von 45S-Prä-rRNA in Kolon-Normalgewebe. NHDF: Nicht-transformierte Fibroblasten. \*p53 deletierte Variante der Zelllinie.

Die durch CX-5461 vermittelte Inhibition der Pol I, die zu einer Abnahme an 45S-Prä-rRNA führt (Drygin et al., 2011), war auch in kolorektalen Karzinomzellen nachzuweisen. Bereits sechs Stunden nach Beginn der Inkubation mit CX-5461 zeigte sich eine Abnahme an 45S Prä-rRNA um bis zu 50 % (Abbildung 3.9), die auch für längere Inkubationszeiten (24 bis 168 Stunden) nachzuweisen war – und damit auch in seneszenten Zellen, die zum Zeitpunkt Tag 7 (168 Stunden) den dominanten Zellphänotyp darstellten (Abbildung 3.5).

Bei der Ribosomenbiogenese handelt es sich um einen hoch dynamischen und exakt koordinierten Syntheseprozess zur Herstellung von RPs und rRNAs. Die hohe Turnover-Rate von Ribosomen – so beträgt ihre Produktionsrate in proliferierenden eukaryotischen Zellen bis zu 2 000 Ribosomen pro Minute (Warner, 1999) – macht die Ribosomenbiogenese anfällig für Störungen jeglicher Art. In Tumoren ist die Ribosomenbiogenese zusätzlich noch erhöht und dysreguliert (Tsoi et al., 2017). Ein solcher Störfaktor der Ribosomenbiogenese stellt CX-5461 dar. Durch die CX-5461-vermittelte Pol-I-Inhibition und die damit einhergehende Hemmung der Translation der rDNA (Abbildung 3.9) kommt es zu einer Dysregulation der Ribosomenbiogenese. In dieser Stresssituation werden Signalwege aktiviert, die einen Zellzyklusarrest auslösen können (Kapitel 3.3 bis 3.5).



**Abbildung 3.9: CX-5461 verringert den Anteil an 45S-Prä-rRNA.** Die Daten der quantitativen PCR (RT-qPCR) sind als Mittelwert mit Standardabweichung relativ zur unbehandelten Kontrolle beim Zeitpunkt 0 Stunden (0h) von drei biologischen Replikaten angegeben. Die Zellen wurden mit 1  $\mu\text{mol/L}$  CX-5461 für die angegebenen Zeiträume inkubiert. (A) DLD1, (B) HCT116, (C) HCT116 p53<sup>-/-</sup>, (D) LS174t und (E) SW480. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Anova mit post-hoc Test (Test nach Dunnett).

### 3.3 CX-5461-induzierte Seneszenz: DNA-Damage-Response (DDR)

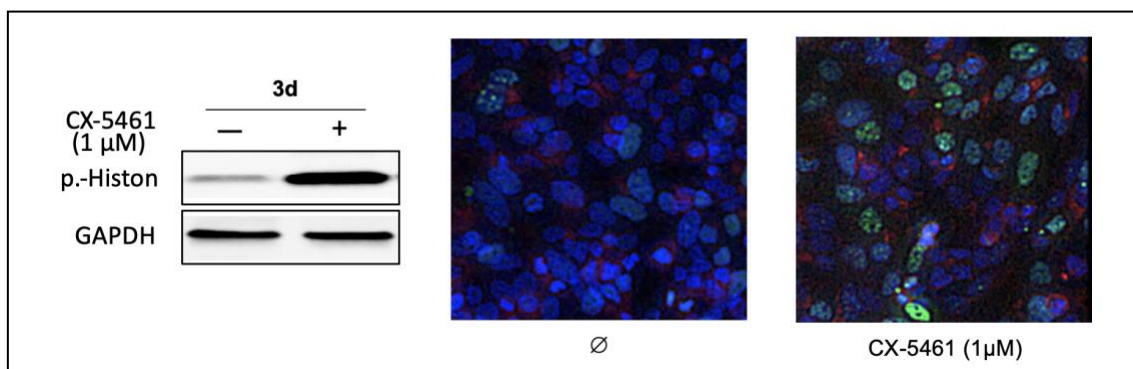
In Kapitel 3.1 wurde für kolorektale Tumorzellen gezeigt, dass CX-5461 die Persistenz vitaler, teilungsinaktiver, aber stoffwechselaktiver Zellen induziert, die sich im Zustand zellulärer Seneszenz befinden. In Kapitel 3.2 wurde gezeigt, dass CX-5461-behandelte Zellen sich in einem charakteristischen metabolischen Zustand befinden, in dem der Anteil an 45S-Prä-rRNA verringert ist (Abbildung 3.9), ebenso die Proteinbiosynthese (Abbildung 4.6). Zudem kommt es im Zellkern zu einer Anreicherung ribosomaler Proteine (Abbildung 1.3). In der Gesamtschau deuten diese Einzelphänomene auf eine gestörte Ribosomenbiogenese hin, die für die Zelle eine Stresssituation bedeutet und phänotypisch sich als Seneszenz darstellt (Abbildung 3.5). In seneszenten Zellen sind verschiedene Signalwege aktiv wie DDR-Signalwege (Bringold, Serrano, 2000), die ebenfalls in CX-5461 behandelten Zellen nachzuweisen sind (Kapitel 1.3).

Ein aktiver DDR-Signalweg hat seinen Ursprung in der Aktivierung von Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-related Kinasen (PIKK), eine Familie von Serin/Threonin Proteinkinasen,



die über Zellstress aktiviert werden, wozu auch Schäden an der DNA wie Doppelstrangbrüche gehören (Abraham, 1998; Blackford, Jackson, 2017). Ein frühes zur Aktivierung von DDR-Signalwegen führendes Ereignis stellt die Phosphorylierung von Histon H2A.X an Serin 139 dar. H2A.X wird durch die ATM-Kinase, ein Mitglied der PIKK Familie, phosphoryliert (Rogakou et al., 1998). DDR-Signalwege können aber auch ohne DNA-Doppelstrangbrüche aktiviert werden wie durch Modifizierungen am Chromatin oder an der DNA (Stichwort: G-Quadruplexe, Kapitel 1.3) (Kaidi, Jackson, 2013; Olcina et al., 2013).

Die phosphorylierte Form von Histon H2A.X, die auch als  $\gamma$ H2A.X bezeichnet wird, war bei vier der sieben kolorektalen Zelllinien nach Inkubation mit CX-5461 eindeutig nachzuweisen (Abbildung 3.10).

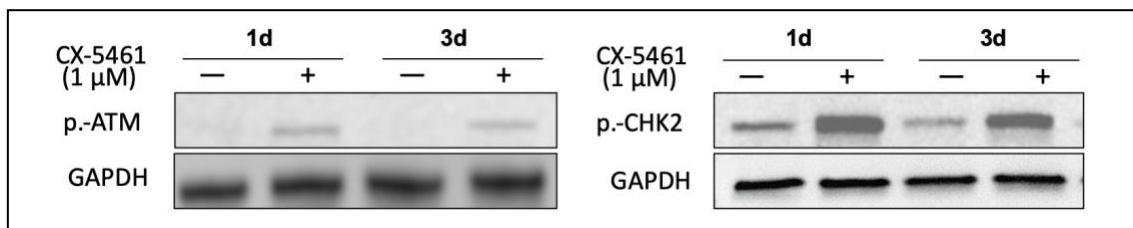


**Abbildung 3.10: CX-5461 induziert den DDR-Signalweg durch Phosphorylierung von Histon H2A.X.** Repräsentativer Nachweis von  $\gamma$ H2A.X im Western-Blot (links) und in der Immunfluoreszenz (IF, rechts) nach Inkubation für 72 Stunden (Blot) bzw. 7 Tage (IF) mit 1 µmol/L CX-5461. IF: Die türkise gefärbten Signale zeigen  $\gamma$ H2A.X innerhalb der Zellkerne (blau). (Ø) unbehandelte Kontrolle, Vergrößerung 20x. Zu den Antikörpern s. Tabelle 2.2 und 2.4.

Die Chromatinstruktur, bestehend aus DNA und Histonen, verhält sich in Gegenwart von  $\gamma$ H2A.X-markierten Histonen transkriptionell inaktiv. Als Grund hierfür wird die Vermeidung möglicher Kollisionen zwischen der DNA-Reparatur und Transkriptions-Maschinerie gesehen, die zugunsten von DNA-Reparatur-Mechanismen präferiert wird (Polo, Jackson, 2011). Die durch  $\gamma$ H2A.X vermittelte transkriptionelle Inaktivierung

ribosomaler Gene ist mit dem durch CX-5461 induzierten Zellzyklus-arretierten Zellphänotyp vereinbar (Abbildung 3.2).

Als nächstes wurden einige am DDR-Signalweg beteiligte Kinasen auf ihre Phosphorylierung (und damit Aktivierung) überprüft (Abbildung 3.11). Die ATM-Kinase, die früh innerhalb des DDR-Signalwegs aktiviert wird, konnte in ihrer phosphorylierten Form in drei (LS174T, SW480 und DLD1) der sieben Zelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 3.11 und Abbildung 7.5 im Anhang). Um auch zeigen zu könnten, dass Targets der ATM durch eine aktive ATM phosphoryliert werden (Blackford, Jackson, 2017), wurde die Phosphorylierung der CHK2 Kinase als primäre Zielstruktur der ATM überprüft (Matsuoka et al., 1998).



**Abbildung 3.11: Hinweise auf einen aktiven DNA-Damage-Response-Signalweg nach Inkubation der Tumorzellen mit CX-5461.** Gezeigt sind Western Blots zum Nachweis der Phospho-ATM (p.-ATM, Position Serin 1981) und der Phospho-CHK2 (p.-CHK2, Position Threonin 68), die jeweils aktiven Formen der Kinasen, in der Zelllinie LS174t. Weitere Zelllinien in Abbildung 7.5 im Anhang.

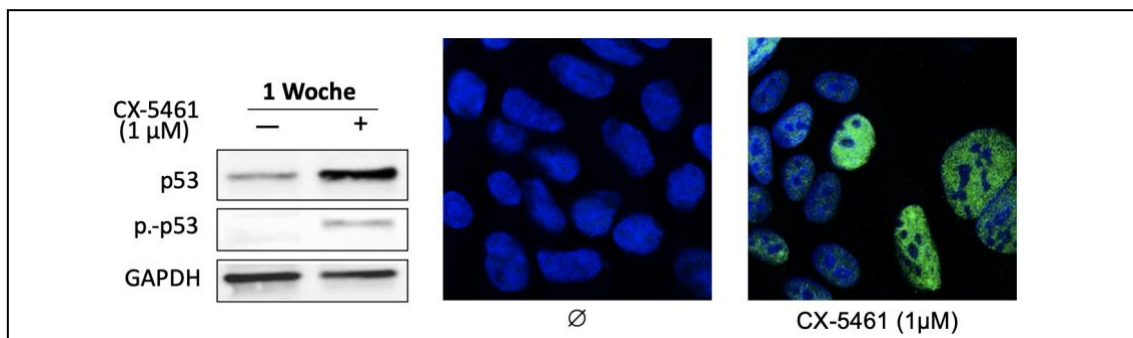
In CX-5461 behandelten kolorektalen Tumorzellen wurde somit ein aktiver DDR-Signalweg nachgewiesen.

### 3.4 CX-5461-induzierte Seneszenz: Die p53-p21-Achse

Durch CX-5461 wird der für eine funktionelle Ribosomenbiogenese notwendige Anteil an rRNA signifikant reduziert und damit zum begrenzenden Faktor der Ribosomenbiogenese (Kapitel 3.2). Da die Synthese von RPs durch CX-5461 unbeeinflusst bleibt, akkumulieren diese im Zellkern (Abbildung 1.3). Es hat sich herausgestellt, dass RPs „biologisch“ aktiv sind und Regulatoren des Zellzyklus beeinflussen können. Sie hemmen

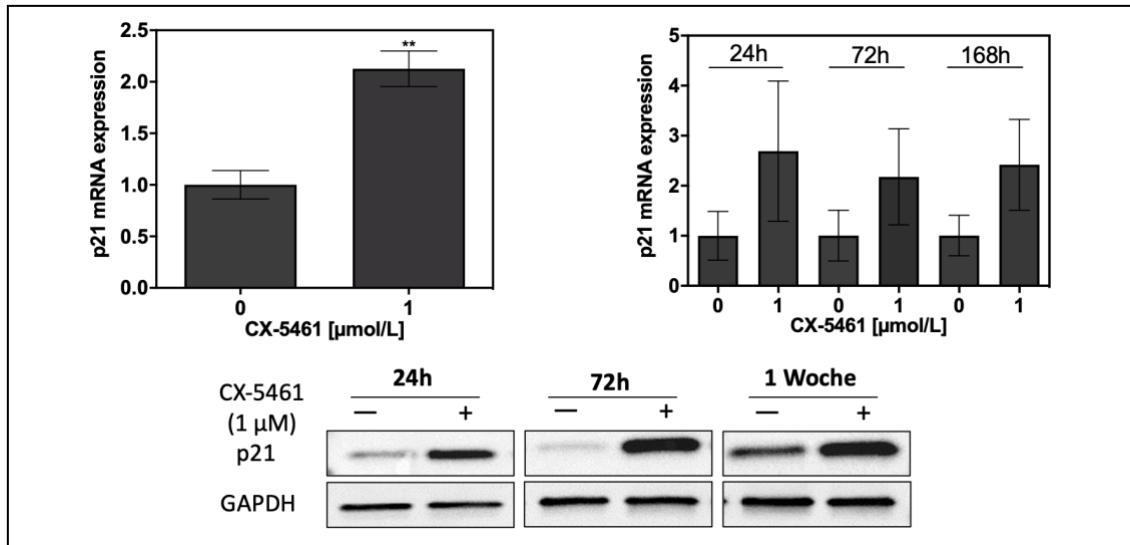
z. B. den negativen p53-Regulator HDM2 (Woods et al., 2015) und führen damit zu einer Akkumulation von nicht-phosphoryliertem p53 (Nishimura et al., 2015). Durch Phosphorylierung von p53 an Ser15 wird der MDM2-vermittelte Abbau von p53 verhindert, was zusätzlich zu einer Stabilisierung von p53 führt (Shieh et al., 1997; Banin et al., 1998; Brooks, Gu, 2003). Da p53 ebenfalls in DDR-Signalwegen als eine Zielstruktur der ATM eingebunden ist und sich auch an der transkriptionellen Regulation des Zellzyklusregulators p21 beteiligt (Kim et al, 2017), wurde in CX-5461-behandelten Zellen die Akkumulation von p53 und Phospho-p53 untersucht (Abbildung 3.12).

Der Nachweis von p53 und Phospho-p53 in CX-5461-behandelten Zellen war möglich (Abbildung 3.12 und Abbildung 7.6 Anhang).



**Abbildung 3.12: Akkumulation und Phosphorylierung von p53.** Gezeigt sind repräsentative Western Blot-Analysen (links) und Immunfluoreszenz-Färbungen (IF, rechts bei 100-facher Vergrößerung) mit der kolorektalen Tumorzelllinie DLD1 zum Nachweis von Phospho-p53 (Ser15) und p53 nach Inkubation mit CX-5461 (1,0 µmol/L). Blau: DAPI. Grün: p53. Weitere Zelllinien in Abbildung 7.6 im Anhang.

Protein p21, das über zahlreiche exogene Stimuli aktiviert wird, ist als Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen (*cyclin-dependent kinases* oder CDK) an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt (Jung et al., 2010). Somit war es naheliegend in CX-5461-induzierten Zellzyklus-arretierten Zellen die Hochregulation von p21 mRNA (Gen: *CDKN1A*) zu untersuchen. Für beide p53 Wildtyp-Zelllinien HCT116 und LS145T war eine transkriptionelle und posttranslationale Hochregulation von p21 mRNA und p21-Protein nachzuweisen, die eindeutig auf die Inkubation der Zellen mit CX-5461 zurückzuführen war (Abbildung 3.13).

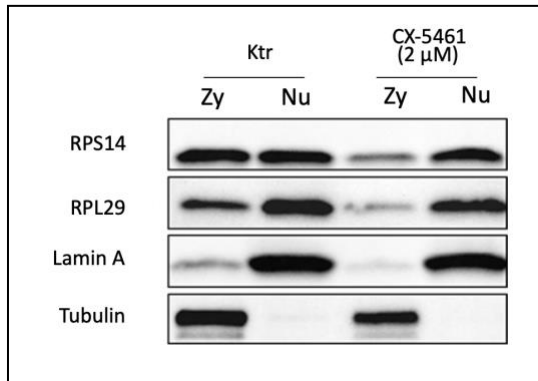


**Abbildung 3.13: *CDKN1A*-Genaktivität in CX-5461 behandelten kolorektalen LS174t-Karzinomzellen.** Obere Reihe: Quantifizierung der p21 mRNA mit der RT-qPCR nach Inkubation mit CX-5461 für 24 Stunden (oben links) und die angegebenen Zeiten (oben rechts). Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von zwei bis drei biologischen Replikaten (mit jeweils zwei technischen Replikaten) relativ zur unbehandelten Kontrolle. Untere Reihe: Nachweis von p21 Protein (zum Antikörper s. Tabelle 2.4) im Western Blot für die angegebenen Inkubationszeiten mit CX-5461.

Die gezeigten Daten lassen eine Beteiligung der p53-p21-Achse an dem durch CX-5461 ausgelösten Zellzyklusarrest vermuten.

### 3.5 CX-5461-induzierte Seneszenz: nucleäre Akkumulation ribosomaler Proteine und Aktivierung des Rb-Signalwegs

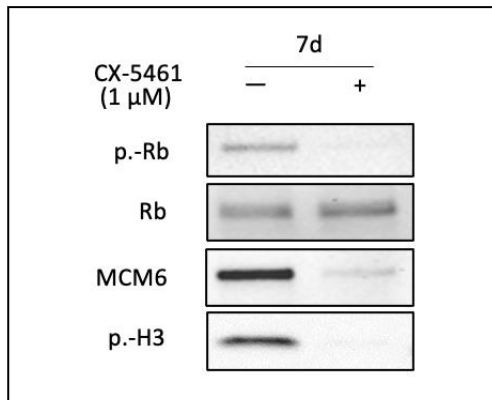
Mit dem Pol I-Inhibitor CX-5461 steht ein effektiver Kandidat zur Verfügung, der bereits wenige Stunden nach Zugabe von CX-5461 den Anteil an rRNAs in der Zelle signifikant verringert, die damit zum begrenzenden Faktor der Ribosomenbiogenese werden (Kapitel 1.2). Als Folge der verringerten Bildung von rRNAs kommt es zu einer Akkumulation von RPs im Nucleolus, wie exemplarisch für RPL29 (Abbildung 1.3) und RPS14 (Abbildung 3.14) gezeigt. Diese Situation kann damit erklärt werden, dass die Bildung von rRNAs und RPs in einem exakt abgestimmten Verhältnis erfolgt, um die energieaufwendige Bildung funktioneller Ribosomen effektiv und zugleich ökonomisch sicherzustellen. Jede Abweichung bei der Synthese beider Faktoren, rRNAs und RPs vom ursprünglichen Verhältnis, löst Stress in der Zelle aus (Kapitel 1.3).



**Abbildung 3.14: Anreicherung ribosomaler Proteine im Zellkern CX-5461-behandelter Zellen.** Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot mit der Zelllinie LS174t nach Inkubation mit CX-5461 (2  $\mu\text{mol/L}$  für 24h). Zu den Antikörpern siehe Tabelle 2.4. Lamin A: Marker für das nucleären Kompartiment. Tubulin: Marker für das zytosolische Kompartiment. Zy: Zytosol, Nu: Nucleus. Ktr: Kontrolle. Die Zellkernisolierung erfolgte nach der Methode von Suzuki et al. (2010). Abbildung aus Otto et al. (2021).

Lessard et al. konnten für im Zellkern akkumulierte RPS14-Proteine zeigen, dass diese über eine Funktion als CDK4-Inhibitor verfügen. Durch Bindung von RPS14 an den CDK4/CyclinD1-Komplex verliert dieser seine Funktion als Retinoblastom (Rb)-Inhibitor und eine Phosphorylierung von Rb bleibt aus (s. Diskussion). Dephosphoryliertes und damit aktives Rb kann unter anderem den Transkriptionsfaktor E2F inaktivieren, dessen Zielgene wie MCM6 entscheidend für den Zellzyklusprogress sind. Ein aktiver Rb-Signalweg löst Zellzyklusarrest und Seneszenz aus (Lessard et al., 2018).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass mit CX-5461 inkubierte kolorektale Zellen eine deutliche Abnahme an phosphoryliertem Rb-Protein aufweisen (Abbildung 3.15). Dass der Rb-Signalweg tatsächlich aktiv ist, wurde mit dem negativen Einfluss von aktivem Rb auf die durch E2F-vermittelte Genexpression bestätigt (in Abbildung 3.15 durch die Abnahme an MCM6-Protein gezeigt). Die durch CX-5461 ausgelöste antiproliferative Situation mit einer verringerten mitotischen Aktivität zeigte ebenfalls die Abnahme des Mitosemarkers Phospho-Histon H3 (Abbildung 3.15).



**Abbildung 3.15: Aktiver Rb-Signalweg in CX-5461-behandelten Zellen.** Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot mit der Zelllinie LS174t, die für 7 Tage (7d) mit CX-5461 inkubiert wurde. Zu den Antikörpern siehe Tabelle 2.4. Rb: Retinoblastom-Protein. Die phosphorylierte Form von Rb (p.-Rb) ist die inaktive Form. Aktives (dephosphoryliertes) Rb ist ein Inhibitor der Zellreplikation. MCM6: ein replikationsinitiierender Faktor im Zellkern. p.-H3: Die phosphorylierte Form des Histons 3 (p.-H3) ist ein Mitosemarker. Abbildung aus Otto et al. (2021).

Lessard et al. konnten zeigen, dass eine Überexpression des ribosomalen Proteins RP14 dazu führt, dass Rb nicht mehr phosphoryliert wird, der Zellzyklus arretiert und ein seneszenten Zellphänotyp sich ausbildet (Lessard et al., 2018). Mit CX-5461-behandelte Zellen zeigen ebenfalls eine Akkumulation ribosomaler Proteine im Zellkern (Abbildung 1.3 und 3.14), eine Aktivierung des Rb-Signalwegs (Abbildung 3.15) und einen im Zellzyklus arretierten (Abbildung 3.2) seneszenten Phänotyp (Abbildung 3.5). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CX-5461 über den durch Hemmung der Pol I verursachten Mangel an rRNAs (Kapitel 3.2) eine Akkumulation ribosomaler Proteine im Zellkern auslöst, die – wie am Beispiel von RP14 gezeigt werden konnte (Lessard et al., 2018) – Zellzyklus-regulierende Signalwege beeinflussen. Damit besteht ein mechanistischer Zusammenhang zwischen nucleolärem Stress, verursacht durch eine defekte Ribosomenbiogenese, und Zellzyklusarrest und Seneszenz.

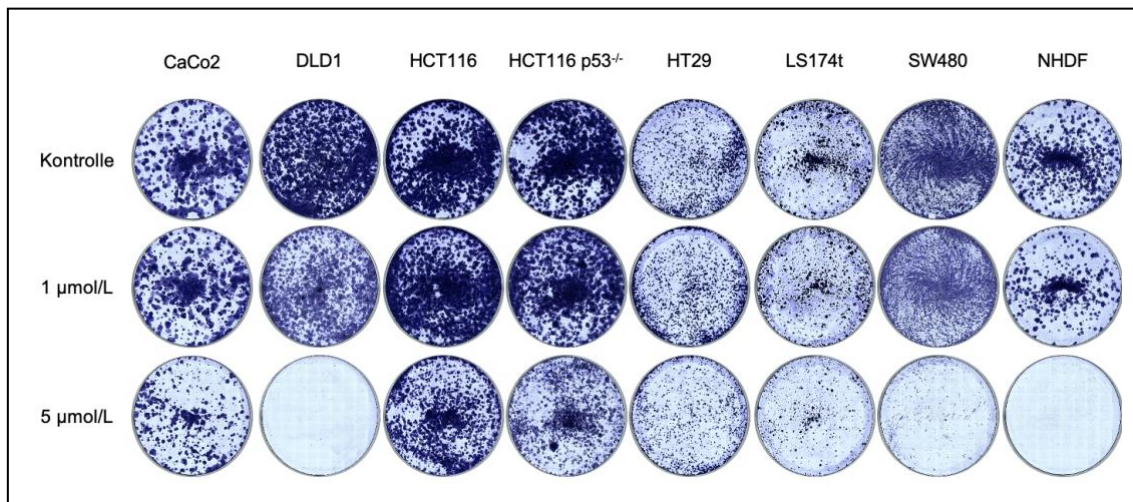
### 3.6 Zytoreduktiver Effekt bei CX-5461-induzierten seneszenten

#### Zellen durch Kombination mit Bcl-Inhibitoren

CX-5461 induziert einen antiproliferativen Zellphänotyp, der bei einer Konzentration von 1  $\mu$ mol/L CX-5461 und weniger in Form eines seneszenten Phänotyps persistiert (Kapitel 3.1). Aus diesem Grund sollte die Möglichkeit geprüft werden, den antiproliferativen Effekt von CX-5461 um eine zelltoxische Komponente zu ergänzen. Hierzu wurde CX-5461 mit Inhibitoren der Bcl-Proteinfamilie kombiniert (Kapitel 1.4).

Die Bcl-Proteinfamilie besteht aus pro- und anti-apoptischen Proteinen. Anti-apoptische Bcl-Proteine verhindern die Induktion von Apoptose, indem sie pro-apoptische Signale hemmen und die Integrität der Mitochondrien-Membran stabilisieren (Cheng et al., 2001). Der für diese Arbeit ausgewählte Inhibitor Navitoclax hemmt gezielt anti-apoptische Bcl-Proteine vom Typ Bcl-w (Zhu et al., 2016). Ein zusätzlicher getesteter Bcl-Inhibitor mit der Bezeichnung AT101 bindet am Bcl-Protein Mcl-1 (Timucin et al., 2019). Die Expression beider Bcl-Proteine konnte in den untersuchten kolorektalen Karzinomzelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 7.7 im Anhang).

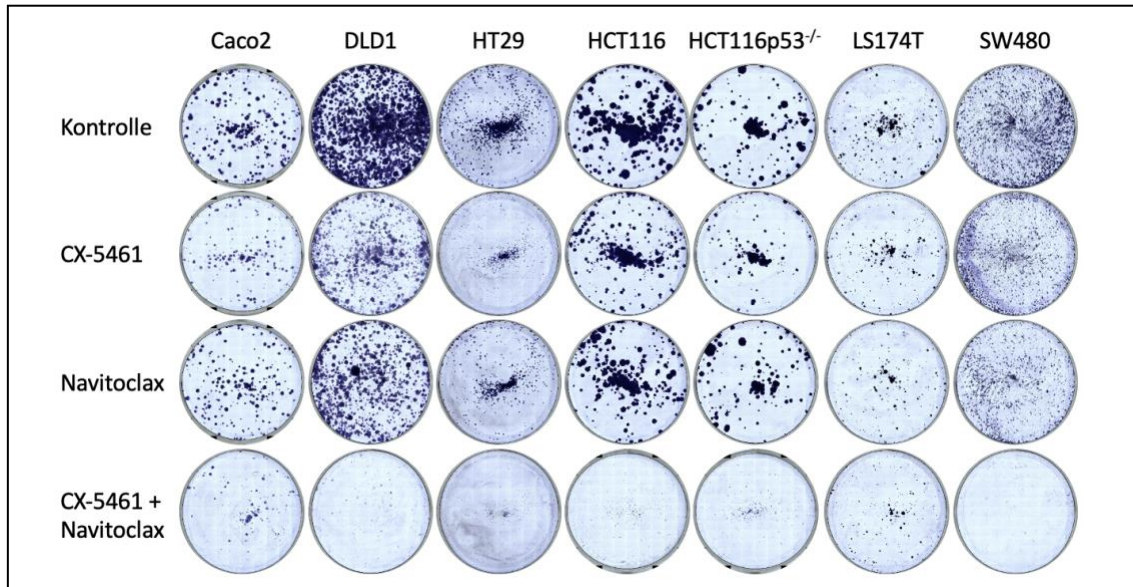
Für jede kolorektale Zelllinie wurde der  $IC_{50}$ -Wert von Navitoclax bestimmt (Tabelle 7.2 im Anhang). Dabei zeigte sich, dass im Vergleich zu CX-5461 (Tabelle 3.1) für Navitoclax bis zu 9-fach höhere Konzentrationen notwendig waren, um eine Abnahme vitaler Zellen um 50 Prozent zu erreichen. Die Zellvitalität nach Inkubation mit Navitoclax wurde im Kolonie-Assay überprüft und ist im Einklang mit den Ergebnissen der  $IC_{50}$ -Bestimmung (Abbildung 3.16).



**Abbildung 3.16: Der antiproliferative Effekt von Navitoclax.** Gezeigt ist der Anteil vitaler Zellen (gefärbte Areale) nach Inkubation mit 1 und 5  $\mu\text{mol/L}$  Navitoclax. Pro Vertiefung einer Zellkulturschale mit 6 Vertiefungen wurden  $4 \times 10^3$  Zellen von jeder Zelllinie ausgesät. Navitoclax wurde 48 Stunden nach Aussaat zu den Zellkulturen gegeben und Zellen für weitere 5 Tage inkubiert. Kontrolle: unbehandelte Zellen.

Die für CX-5461 und Navitoclax bestimmten  $IC_{50}$ -Werte waren Grundlage dafür, um die Konzentrationen an CX-5461 und Navitoclax im Kombinationsansatz mit dem Ziel zu

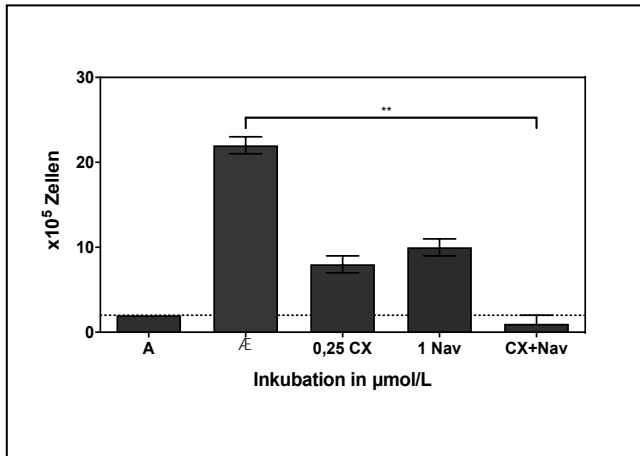
optimieren, einen maximal zelltoxischen Effekt im Vergleich zu den einzelnen Inhibitoren zu erreichen (Abbildung 3.17).



**Abbildung 3.17: Der kombinierte antiproliferative Effekt von CX-5461 und Navitoclax.** Gezeigt ist der Anteil vitaler Zellen (gefärbte Areale) für die optimierten Konzentrationen an CX-5461 und Navitoclax in Kombination: CaCo2: 0,5/2,5  $\mu\text{mol/L}$ , DLD1: 0,25/1,0  $\mu\text{mol/L}$ , HCT116: 0,05/5,0  $\mu\text{mol/L}$ , HCT116 p53<sup>-/-</sup>: 0,05/3,0  $\mu\text{mol/L}$ , HT29: 0,25/5,0  $\mu\text{mol/L}$ , LS174t: 0,25/1,0  $\mu\text{mol/L}$ , SW480: 0,25/1,0  $\mu\text{mol/L}$  CX-5461/Navitoclax. Pro Vertiefung einer Zellkulturschale mit 6 Vertiefungen wurden  $4 \times 10^3$  Zellen von jeder Zelllinie ausgesät. CX-5461, Navitoclax bzw. die Kombination beider Inhibitoren wurde 48 Stunden nach Aussaat zu den Zellkulturen gegeben und Zellen für weitere 5 Tage inkubiert. Kontrolle: unbehandelte Zellen.

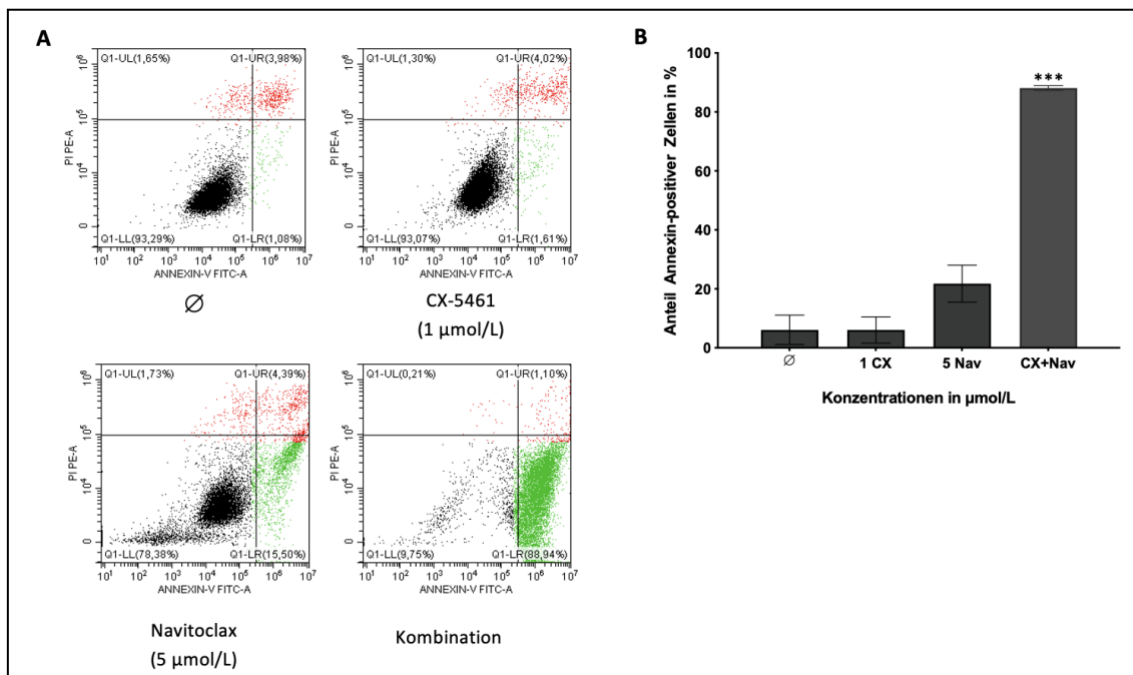
Eine Quantifizierung der vitalen Zellen bestätigte den stärkeren antiproliferativen Effekt von CX-5461 und Navitoclax in der Kombination (Abbildung 3.18).





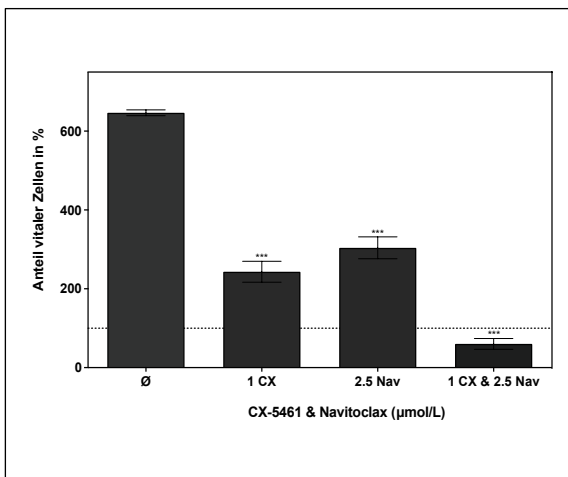
**Abbildung 3.18: Der kombinierte antiproliferative Effekt von CX-5461 und Navitoclax.** Pro Vertiefung einer Zellkulturschale mit 96 Vertiefungen wurden  $2 \times 10^5$  Zellen (SW480) ausgesät. Nach Inkubation mit den Inhibitoren (CX: CX-5461, Nav: Navitoclax) für 72 Stunden wurde die Anzahl vitaler Zellen mit Kristallviolett photometrisch ermittelt. \*\*  $p < 0,01$  zur unbehandelten Kontrolle ( $\emptyset$ ). Varianzanalyse mit post-Hoc Test (Test nach Kruskal-Wallis).

Während der antiproliferative Effekt von CX-5461 zu keiner Induktion von Apoptose bei kolorektalen Karzinomzellen führte (Kapitel 3.1), war dies für die Kombination aus CX-5461 und Navitoclax eindeutig der Fall (Abbildung 3.19).



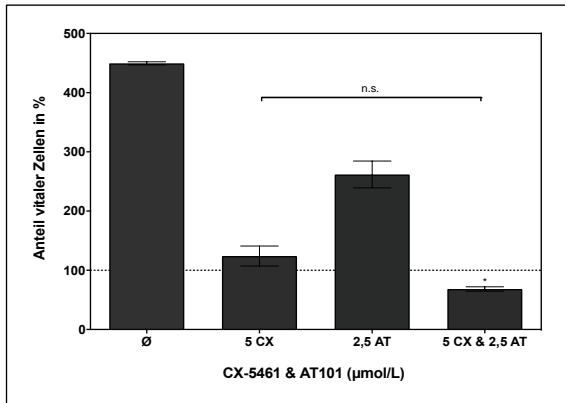
**Abbildung 3.19: Der kombinierte antiproliferative Effekt von CX-5461 und Navitoclax führt zu einer Anreicherung Annexin V-positiver Zellen.** Gezeigt ist das repräsentative Ergebnis zum durchflusszytometrischen Nachweis Annexin V-positiver, apoptotischer SW480-Zellen nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden (Teilabbildung A). Auf der X-Achse in logarithmischer Darstellung aufgetragen die Fluoreszenzintensität von Annexin V (im unteren rechten Quadranten) und auf der Y-Achse die von Propidiumjodid zur Unterscheidung apoptotischer Zellen von nekrotischen bzw. spät apoptotischen Zellen im oberen rechten Quadranten. Teilabbildung B: Quantifizierung der durchflusszytometrischen Ergebnisse mit  $n=3$  biologischen Replikaten. \*\*\*  $p < 0,001$  in Dunnetts Test nach Varianzanalyse.

Das Versuchsdesign, Zellen mit beiden Inhibitoren, CX-5461 und Navitoclax, gleichzeitig zu inkubieren (Abbildung 3.18) wurde, um dem Nachweis näher zu kommen, dass Navitoclax tatsächlich einen starken pro-apoptotischen Effekt in CX-5461-induzierten seneszenten Zellen auslöst, dahingehend modifiziert, dass die Zellen zuerst mit CX-5461 für 72 Stunden inkubiert wurden, bevor Navitoclax zu den seneszenten Zellen gegeben wurde. Auch mit diesem geänderten Versuchsaufbau war es möglich zu zeigen, dass Navitoclax die Anzahl CX-5461-induzierter seneszenten Zellen durch Induktion von Apoptose deutlich effektiver verringerte als die Einzelsubstanzen (Abbildung 3.20).



**Abbildung 3.20: Der zellreduktive Effekt des Senolytikums Navitoclax auf den durch CX-5461 induzierten seneszenten Zellphänotyp.** Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis mit SW480-Zellen, die zunächst für 72 Stunden mit 1 µmol/L CX-5461 (CX) inkubiert wurden, bevor Navitoclax (Nav) für 48 Stunden dazu gegeben wurde. Der Anteil vitaler Zellen wurde mit Kristallviolett bestimmt und als Mittelwert und Standardabweichung von sechs technischen Replikaten angegeben. Gepunktete Linie: Aussaat. \*\*\*p<0,001 zur unbehandelten Kontrolle (Ø) in Dunnetts Test nach Varianzanalyse.

Auch ein weiterer Bcl-Inhibitor mit der Bezeichnung AT101, der ebenfalls Eigenschaften eines Senolytikums zeigt, war in der Kombination mit CX-5461 stärker zellreduktiv als beide Inhibitoren alleine (Abbildung 3.21).



**Abbildung 3.21: Der zellreduktive Effekt des Senolytikums AT101 auf den durch CX-5461 induzierten seneszenten Zellphänotyp.** Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis mit CaCo2-Zellen, die zunächst für 72 Stunden mit 1 µmol/L CX-5461 (CX) inkubiert wurden, bevor 2,5 µmol/L AT101 (AT) für 48 Stunden dazu gegeben wurde. Der Anteil vitaler Zellen wurde mit Kristallviolett bestimmt und als Mittelwert und Standardabweichung von sechs technischen Replikaten angegeben. Gepunktete Linie: Aussaat. \*p<0,05 zur unbehandelten Kontrolle (Ø).

Die Kombination aus CX-5461 und AT101 war bei weniger Zelllinien (drei von sieben Zelllinien: DLD1, CaCo2 und HT29) effektiv als die Kombination aus CX-5461 und Navitoclax (sechs von sieben Zelllinien). Die Gründe hierfür sind noch nicht verstanden, doch davon unberührt bleibt, dass das Prinzip, den durch CX-5461 induzierten seneszenten Zellphänotyp durch Senolytika eliminieren zu können, auch für kolorektale Zellen gezeigt werden konnte.

### 3.7 Beantwortung der Fragen (Kapitel 1.5)

- I. Weist CX-5461 auch bei humanen kolorektalen Karzinomzellen antiproliferative Effekte auf?

Der durch CX-5461 in kolorektalen Karzinomzellen *in vitro* ausgelöste antiproliferative Effekt basiert auf einem Zellzyklusarrest (Abbildung 3.2) in Verbindung mit einem seneszenten Zellphänotyp (Abbildung 3.5). Die Bestimmung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ) ist von Bedeutung, um solche Konzentrationsbereiche von CX-5461 zu identifizieren, die mit großer Wahrscheinlichkeit keine Off-Target-Effekte auslösen. Konzentrationen an CX-5461 von 1  $\mu\text{mol/L}$  und weniger haben sich als nicht akut toxisch gezeigt und induzieren einen Seneszenz-ähnlichen Zellphänotyp.

- II. Auf welchem molekularen Mechanismus basiert der antiproliferative Effekt von CX-5461 und in welche molekulare Endstrecke (Seneszenz, Apoptose) führt dies?

Der in der Literatur beschriebene Hauptmechanismus von CX-5461, die Hemmung der RNA-Polymerase I (Pol I), war in dieser Arbeit indirekt über eine verminderte Translation ribosomaler RNA nachzuweisen (Kapitel 3.2). Charakteristisch für den durch CX-5461 ausgelösten nucleolären Stress sind die Akkumulation ribosomaler Proteine im Zellkern (Abbildung 1.3 und Abbildung 3.14) und die Aktivierung zum Zellzyklusarrest führender Signalwege vermittelt durch DNA-Damage-Response-Mechanismen, p53 und Retinoblastom (Rb).

- III. Wird der antiproliferative Effekt von CX-5461 durch Kombination mit dem Bcl-Inhibitor Navitoclax verstärkt durch Induktion zelltoxischer Effekte wie Apoptose?

Der durch CX-5461 induzierte seneszenz Zellphänotyp ließ sich effektiv durch das Senolytikum Navitoclax in Apoptose überführen – im Ggs. zu nicht-seneszenten Zellen (Abbildung 3.19). Damit scheint die Adressierung der beiden antiproliferativen Phänomene Seneszenz und Apoptose eine wirkungsvolle anti-Tumor-Strategie darzustellen.

## 4 Diskussion

Mit CX-5461 behandelte kolorektale Karzinomzellen zeigen auf Basis einer vom Nucleolus durch Hemmung der RNA-Polymerase I (Pol I) ausgehenden Stresssituation charakteristische Phänomene wie ein arretierter Zellzyklus mit Ausbildung eines seneszenten Phänotyps, reduzierte Proteinbiosynthese, verringerte Transkription von ribosomalen RNAs (rRNAs), nucleoläre Akkumulation ribosomaler Proteine (RPs) und Aktivierung verschiedener Zellzyklus-hemmender Signalwege.

CX-5461 wurde über ein zellbasiertes Screening (Drygin et al., 2011) als potenter und spezifischer Pol I-Inhibitor identifiziert und seitdem in verschiedenen Tumorentitäten intensiv untersucht (Li et al., 2016; Makhale et al., 2021). CX-5461 befindet sich aktuell in klinischen Prüfungen mit bisher einer guten Verträglichkeit (Khot et al., 2019). In einer Expansionsstudie (Phase Ib) werden aktuell Patienten mit soliden Tumoren untersucht (Chen et al., 2021).

Die Ribosomenbiogenese als potentielles Target für eine effektive Tumorthherapie zu nutzen, mag aufgrund der Universalität der Ribosomenbiogenese überraschen, doch scheinen tatsächlich Ausmaß und „Qualität“ der Ribosomenbiogenese – hyperaktiv und dysreguliert in der Tumorzelle, „normal“ und reguliert in der nicht-transformierten Zelle – den entscheidenden Unterschied auszumachen für die Möglichkeit einer selektiven Hemmung der tumoralen Ribosomenbiogenese (Brighenti et al., 2015).

### 4.1 Der antiproliferative Effekt von CX-5461

In dieser Arbeit wurde der antiproliferative Effekt von CX-5461 an kolorektalen Tumorzellen gezeigt; in der Literatur sind Daten zu Tumorzellen anderer Tumorentitäten zu finden (Negi, Brown, 2015b; Li et al., 2016; Makhale et al., 2021). Doch besteht weiterhin Unklarheit darüber, in welcher Form CX-5461 seinen antiproliferativen Effekt vermittelt. So führt dieser bei hämatologischen Tumorzellen zur Induktion von Apoptose (Drygin et al., 2011; Negi, Brown, 2015b) und bei Tumorzellen solider Tumorentitäten

zur Induktion zellulärer Seneszenz (Drygin et al., 2011; Salama et al., 2014; Petrova et al., 2016). Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an kolorektalen Karzinomzellen konnten einen durch CX-5461 ausgelösten seneszenten Zellphänotyp identifizieren. Hinweise in diesen Zellen auf pro-apoptotische Effekte wurden nicht gefunden. Ein Blick in die Literatur bestätigt, dass der antiproliferative Effekt von CX-5461 bei Zellen solider Tumorentitäten eher zur Induktion von Seneszenz als von Apoptose führt; auch wurden Zeichen von Autophagie beschrieben (Tabelle 4.1).

**Tabelle 4.1: Überblick über die durch CX-5461 ausgelösten antiproliferativen Ereignisse.** Eine in PubMed durchgeführte Recherche. Stand: Juli 2021.

Ereignis	Mechanismus	Marker	Zelllinie	Publikation
Autophagie	Inhibition von mTOR, Beteiligung von p53	LC3-II	U2-OS	Li et al. (2016), OncoTargets Ther.
Seneszenz / Autophagie	p53-unabhängiger Effekt	LC3-II, Acridin Orange, SA-β-Gal	A375, MIA, PaCa-2 u. a.	Drygin et al. (2011), Cancer Research
Apoptose	ATM/ATR Aktivierung p53-unabhängig	Cleaved Caspase	ALL	Negi, Brown (2015a), Oncotarget
Apoptose	p53-p21 Aktivierung	Cleaved Caspase 3, PARP 1	MCF7 u. a.	Makhale et al. (2021), Int. J. Mol. Sci.

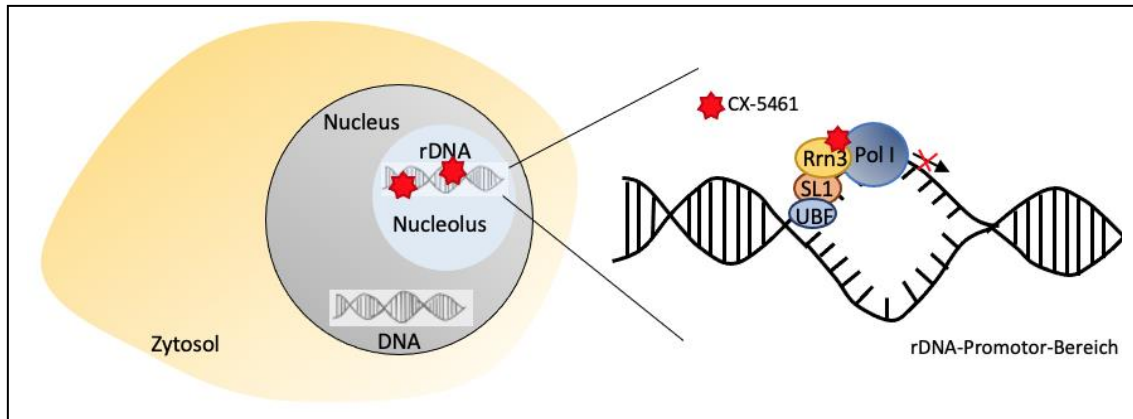
U2-OS: Osteosarkomzelllinie; MIA u. PaCa-2: Pankreaskarzinomzelllinien; A375: Melanomzelllinie; MCF7: Brustkrebszelllinie; ALL: Akute lymphoblastische Leukämie; LC3-II: Autophagiemarker.

Autophagie ist ein kataboler Mechanismus, über den die Zelle eigene nicht lebensnotwendige Zellbestandteile in so genannten Autophagolysosomen verdauen kann, um die Abbauprodukte anschließend wiederzuverwenden (Li et al., 2021). Autophagie wird im Zustand von Zellstress aktiv und kann zum Überleben der Zelle beitragen. Bei Tumorzellen führt Autophagie auch zur Zerstörung und kann damit tumorsuppressiv wirken (Chen, Debnath, 2010). Der spezifische Autophagie-Marker LC3 (*microtubule-associated protein1 light chain 3*) spielt bei der Bildung von Autophagosomen eine zentrale Rolle (Barth et al., 2010). Hierzu wird die zytosolische Form von LC3, LC3-I (18kDa), in LC3-II (16kDa) konvertiert, der in die Autophagosom-Membran integrierten Form (Mizushima, 2007).

Autophagische Vorgänge, die bei CX-5461-inkubierten Zellen solider Tumoren beobachtet wurden (Drygin et al., 2011), lassen sich mit dem in dieser Arbeit beschriebenen, durch CX-5461 induzierten seneszenten Zellphänotyp vereinbaren. Durch CX-5461 befinden sich diese Zellen in einer vom Nucleolus ausgehenden Stresssituation mit einer stark reduzierten Proteinbiosynthese (Abbildung 3.6). Eine Beteiligung autophagischer Vorgänge bei CX-5461 induzierter Seneszenz wäre somit nicht ungewöhnlich (wäre aber noch zu zeigen). Zudem handelt es sich bei der Bezeichnung Seneszenz um Zustandsbeschreibungen zahlreicher, zum Teil sehr heterogener Mechanismen (Bojko et al., 2019).

Der Wirkmechanismus von CX-5461 kann möglicherweise erklären, warum dessen anti-proliferativer Effekt bevorzugt zu Seneszenz (und Autophagie) führt. Durch die CX-5461 vermittelte Inhibition der Pol I (Abbildung 4.1) kommt die Zelle in einen Zustand der Unterversorgung, da Ausgangsprodukte für den anabolen Stoffwechsel fehlen, weshalb es zu einer Aktivierung des Überlebensmodus Autophagie kommen kann (White, DiPaola, 2009). Im Vergleich dazu der Pol I-Inhibitor Actinomycin D, der erst in der Phase der Elongation wirksam wird. Die dabei entstehenden verkürzten (trunkierten) Prä-rRNA-Transkripte werden von den DNA-reparierenden Mechanismen der Zelle (Kapitel 1.3) als ein nicht-reparabler Schaden erkannt und diese daraufhin in Apoptose überführt (Fetherston et al., 1984; Muscarella, 1998; Mischo et al., 2005).

Zunächst war man davon ausgegangen, dass CX-5461 die Bindung des Transkriptionsfaktors SL1 an den rDNA-Promotor verhindert und damit die Initiierung der rRNA Synthese durch Pol I ausbleibt (Drygin et al., 2011). Diese Sicht wurde durch Mars et al. (2020) erweitert. Danach verhindert CX-5461, dass der Pol I-Komplex sich vom Prä-Initiationskomplex wieder lösen kann. In diesem Prä-Initiationskomplex liegt Pol I gebunden am Faktor Rrn3 vor, wobei diese Bindung normalerweise in der frühen Transkription (Elongation) aufgelöst wird (Mars et al., 2020). CX-5461 sorgt dafür, dass Pol I über Rrn3 an SL1 und Ubf gebunden bleibt und dadurch die Transkription der rDNA durch Pol I nicht starten kann (Abbildung 4.1).



**Abbildung 4.1: Der Wirkmechanismus von CX-5461.** CX-5461 verhindert die Auflösung der Bindung der Pol I an RRN3, dadurch kann die Transkription der rDNA nicht starten. Eigener Entwurf erstellt nach Informationen von Mars et al., 2020. Zur Erläuterung siehe Text.

Der Effekt der Pol I-Inhibition durch CX-5461 ist zudem irreversibel. Bereits eine 5-minütige Inkubation mit CX-5461 reicht aus, um die rRNA-Synthese irreversibel zu inhibieren – auch nach einem Wechsel in CX-5461-freies Medium (Mars et al., 2020). Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in CX-5461 behandelten Zellen der Anteil an 45S-Prä-rRNA innerhalb kürzester Zeit abnahm (Abbildung 3.9) und dieser Effekt zudem nicht reversibel war (Daten nicht gezeigt). Dies scheint an einem Arrest der Pol I in einem Transkriptions-Initiations-Komplex durch CX-5461 zu liegen (Mars et al., 2020); komplett verstanden ist diese irreversible Hemmung der Pol I jedoch nicht.

## 4.2 Durch CX-5461 beeinflusste Signalwege

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass gleich mehrere zum Zellzyklusarrest-führende Signalwege in CX-5461 behandelten Tumorzellen aktiv sind. Hierzu gehören der DNA-Damage-Response-Signalweg, der p53- und der Retinoblastom (Rb)-Signalweg. Dass CX-5461 diese Signalwege beeinflusst, ist bekannt (Tabelle 4.2). Aus Tabelle 4.2 wird deutlich, dass in CX-5461-behandelten Zellen in erster Linie DNA-Damage (DDR)-Signalwege aktiv sind (Kapitel 1.3). Dies ist damit zu erklären, dass durch die extrem hohe transkriptionelle Aktivität der rDNA jede Störung der Transkription von rRNAs die Aktivierung von DDR-Signalwegen auslöst (van Sluis, McStay, 2019). Dazu passt, dass die



Transkriptionsaktivität im Nucleolus (Kapitel 1.3) mit dem Ansprechen der Zelle auf CX-5461 positiv korreliert (Son et al., 2020).

**Tabelle 4.2: Überblick über die durch CX-5461 beeinflussten Signalwege.** Eine in PubMed durchgeführte Recherche. Stand: Juli 2021.

Signalweg	Mechanismus	Marker	Zelllinie	Publikation
DDR	Inhibition Topoisomerase II10)	H2A.X	multiple	Bruno et al. (2020), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
DDR	DNA G-Quadruplex Stabilisierung	H2A.X, 53BP1, RPA, Rad 51	HCT116, DLD1, U2OS	Xu et al. (2017), Nat. Commun.
DDR	Relaxierte rDNA aktiviert ATM-Kinase	CHKs, ATM, ATR u. a.	BJ-T	Quin et al. (2016), Oncotarget
DDR	Destabilisierung von Replikationsgabeln	ATR, H2A.X	multiple Ovarialzell-Karzinome	Sanij et al. (2020), Nat. Commun.
DDR	Irreversible Hemmung von Pol I	H2A.X, 53BP1	NIH3T3	Mars et al. (2020), NAR Cancer
DDR	Mutagene Eigenschaften von CX-5461	atm-1 (ATM-Homologon)	C. elegans	Ye et al. (2020), Genetics
DDR	DDR-assoziiierter Ubiquitin-Signalweg	RNF168 u. a.	HCT116, U2OS u. a.	Masud et al. (2021), Sci. Rep.
p53	Nucleolärer Stress, Interaktion ribosomaler Proteine mit MDM2	p53, p21	B-Zell Lymphom	Bywater et al. (2012), Cancer cell
p53	Interaktion eines Ribonucleoprotein-Partikel Komplex (RNP) mit p53	RPL11, RPL5, 5S rRNA, p53	MEF	Nishimura et al. (2015), Cell Reports
Rb	Ribosomale Proteine verhindern Phosphorylierung von Rb	RPL29, RPS14, Rb	IMR90	Lessard et al. (2018), Nat. Cell Biol.
MYC	Suppression bei Überexpression von MYC	MYC, MYCN	Neuroblastom	Taylor et al. (2019), J. Pediatr. Surg.
MYC	RNA-induced Silencing-Complex (RISC)	MYC, RPL5	Myelom	Lee et al. (2017), Br. J. Haematol.
Wnt/ $\beta$ -Catenin	Aktivierung von Wnt/ $\beta$ -Catenin durch nucleolären Stress	PPAN, AXIN2 u. a.	HeLa, U2OS	Dannheisig et al. (2021), J. Mol. Biol.

HeLa: Zervixkarzinom-Zelllinie; U2OS: Osteosarkom-Zelllinie; IMR90, NIH3T3, BJ-T: Fibroblastenzelllinien. C. elegans: Fadenwurm; MEF: embryonale Maus-Fibroblasten.

<sup>10</sup> Topoisomerasen sind Enzyme, die DNA-Doppelstrangbrüche und ihre Re-Ligation katalysieren, um Entwindungen der DNA während des Replikations- und Transkriptionsvorgangs zu ermöglichen. Einige Topoisomerasen sind während des Prozesses der RNA Polymerase I abhängigen rRNA-Synthese an der Formation des Prä-Initiationskomplexes beteiligt (Ray et al., 2013).

Der DDR-Signalweg ist eine molekulare Antwort auf Veränderungen und Schäden an der DNA, die durch Aktivierung von Reparaturmechanismen beseitigt werden sollen (Kapitel 1.3). Ausgelöst werden DDR-Signalwege durch aktivierte Proteinkinasen, die Veränderungen und Schäden an der DNA registrieren. Aktuell sind drei Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-related Kinasen (PIKK) bekannt, die über diese Eigenschaft verfügen: ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3 related*) und DNA-Proteinkinase (Abraham, 1998; Blackford, Jackson, 2017).

In CX-5461 behandelten Zellen kommt in erster Linie zur Aktivierung der ATM und ATR und dies bei Abwesenheit von einem nachweisbaren Schaden an der DNA (Quin et al., 2016). Ein aktiver DDR-Signalweg kann zu einem Zellzyklusarrest führen (Jazayeri et al., 2006), aber auch unabhängig von p53 Apoptose induzieren (Negi, Brown, 2015b). Ein klassisches zur Aktivierung von DDR-Signalwegen führendes Ereignis stellen Strangbrüche in der DNA dar. Die Rekrutierung der ATM an Doppelstrangbrüche wird durch den MRN<sup>11</sup>-Komplex vermittelt (Carney et al., 1998). ATM kann auch bereits bei Veränderungen am Chromatin, wie für CX-5461 nachgewiesen (Bruno et al., 2020), aktiv werden (Kaidi, Jackson, 2013; Olcina et al., 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Elemente aktiver DDR-Signalwege nachgewiesen (Kapitel 3.3).

Abhängig vom zelltypspezifischen Kontext kann der p53-Signalweg zu einem Proliferations-Arrest der Zellen oder einem Absterben der Zellen durch Apoptose führen. Für einen Zellzyklusarrest ist innerhalb des p53-Signalwegs die p53-Zielstruktur p21 verantwortlich, ein CDK<sup>12</sup>-Inhibitor (Harper et al., 1993). Ob eine Aktivierung des p53-Signalwegs zum Zellzyklusarrest oder programmierten Zelltod (Apoptose) führt, hängt von zahlreichen Faktoren ab. Untersuchungen haben gezeigt, dass es eine eindeutige Korrelation zwischen der Höhe der Expression von p21 und dem induzierten

---

<sup>11</sup> Der MRE11-RAD50-NBS1-(MRN)-Komplex wurde im Rahmen einer seltenen, autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung, dem Nijmegen-Bruch-Syndrom (NBS) identifiziert. Mit molekularen Untersuchungen zu diesem Krankheitsbild wurde deutlich, dass der MRN-Komplex im Falle von Doppelstrangbrüchen die Rekrutierung von ATM an die DNA vermittelt und außerdem Zellzyklus-regulierend wirkt (Carney et al., 1998). Beim NBS sind sämtliche DNA-Reparaturmechanismen gestört.

<sup>12</sup> Cyclin-abhängige Kinasen (*cyclin-dependent-kinases*, CDKs) kontrollieren den Zellzyklus an sog. Checkpoints. Entscheidende Checkpoints befinden sich am G1/S- und G2/M-Übergang. Durch Checkpoints wird sichergestellt, dass keine Mitose bei unvollständiger DNA-Replikation oder Nährstoffmangel stattfindet (Hartwell, Weinert, 1989).

Zellprogramm (z. B. Seneszenz, Apoptose) gibt (Paris et al., 2008), was ebenso für p53 bestätigt wurde (Scala et al., 2016). In hämatologischen Tumoren wurde nach Inkubation mit CX-5461 eine Akkumulation von p53 festgestellt, die zur Induktion von Apoptose führt (Negi, Brown, 2015b; Derenzini et al., 2018). p53 ist ebenfalls in DDR-Signalwege eingebunden und kann über ATM aktiviert werden (Shieh et al., 1997; Banin et al., 1998).

Weitere durch CX-5461 beeinflusste Signalwege sind beschrieben, wurden in der vorliegenden Arbeit aber nicht untersucht. Hierzu gehört der mTOR<sup>13)</sup>-Signalweg, der u. a. an der Regulation der rRNA- und Proteinsynthese sowie der Induktion von Autophagie beteiligt ist (Mahajan, 1994; Sudarsanam, Johnson, 2010). Auch beeinflusst CX-5461 negativ den MYC-Signalweg durch nucleolären Stress, auch unabhängig vom p53 und Rb (Kim et al., 2016), was plausibel erscheint, da MYC an der Expression verschiedener Faktoren des Pol I-Komplexes beteiligt ist.

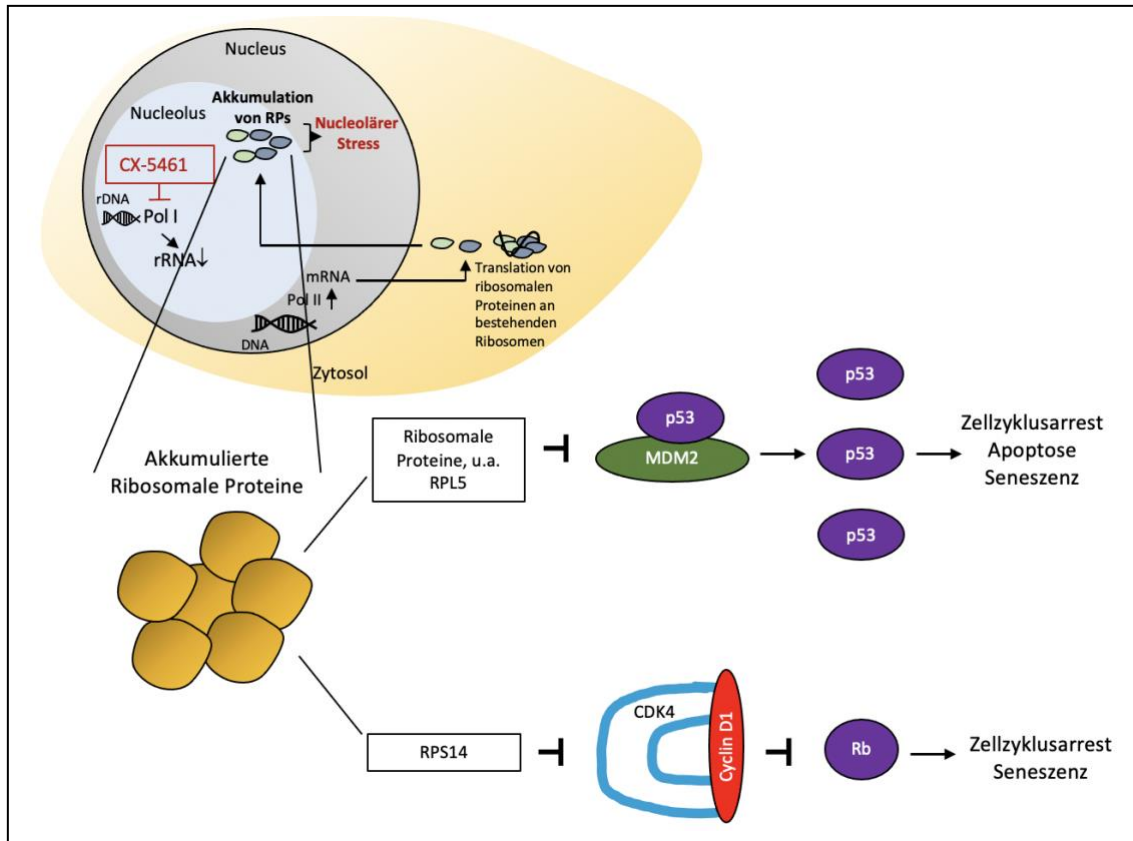
### **4.3 CX-5461 und nucleolärer Stress**

Die durch CX-5461-vermittelte Pol I-Inhibition führt zu einem Mangel an rRNAs und zu einer Anreicherung ribosomaler Proteine im Nucleolus (Abbildungen 1.2, 1.3 und 3.14). In dieser unphysiologischen Situation<sup>14)</sup>, auch als nucleolärer Stress bezeichnet, zeigen ribosomale Proteine die Eigenschaft, mit verschiedenen Bindungspartnern zu interagieren und so Zellzyklus-aktivierende Signalwege negativ zu beeinflussen (Abbildung 4.3).

---

<sup>13</sup> Das mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) Protein koordiniert Zellwachstum und Metabolismus und ist in vielseitige intrazelluläre involviert. Es spielt auch in der Induktion von Autophagie eine Schlüsselrolle (Saxton, Sabatini, 2017).

<sup>14</sup> In der physiologischen Situation liegen rRNAs und RPs in einem bestimmten Verhältnis im Nucleolus vor und bilden Prä-Ribosomen (Kapitel 1.2)



**Abbildung 4.3: Nucleolärer Stress in CX-5461 behandelten Zellen: Die durch ribosomale Proteine RPL5 und RPS14 beeinflussten Signalwege.** Eigener Entwurf erstellt nach Literaturangaben (z. B. Lessard et al., 2018). Zur Erläuterung siehe Text.

Der p53-Signalweg wird durch verschiedene Stimuli wie eine gestörte Ribosomenbiogenese aktiv (Bywater et al., 2012). Woods et al. (2015) sprechen in diesem Kontext von einem nucleolären Überwachungs-Signalweg (Woods et al., 2015). Unter normalen Umständen ist der Anteil an p53 in der Zelle sehr gering, da die durch MDM2<sup>15)</sup> vermittelte Ubiquitylierung von p53 zu einem ständigen proteasomalen Abbau führt. Bei einer Störung der Ribosomenbiogenese wird u. a. das ribosomale Protein RPL11 durch Bindung an NEDD8<sup>16)</sup>, was als NEDDylierung bezeichnet wird, nicht länger im Nucleolus gehalten. Im Zytoplasma trägt RPL11 zu einer Akkumulation von p53 bei (Nishimura et al., 2015; Woods et al., 2015), indem es an den p53-negativen Regulator

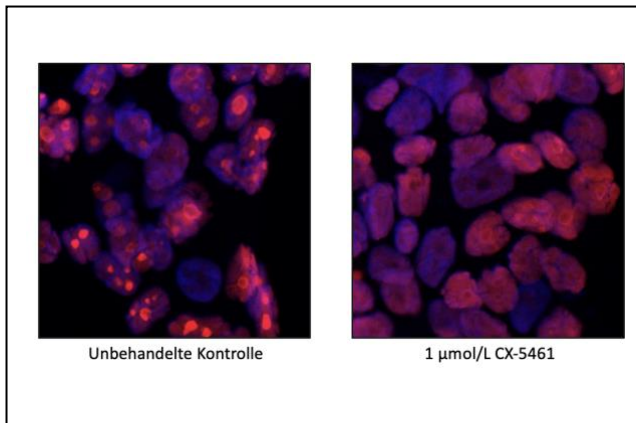
<sup>15)</sup> Mdm2 (*mouse double minute 2*) ist ein dominanter negativer Regulator von p53. Es ist eine Ligase, die p53 ubiquitiniert, was zu dessen Abbau führt. Posttranslationale Veränderungen an p53 können die Bindung für Ubiquitin erschweren, was einen Regulationsmechanismus für p53 darstellt (Brooks, Gu, 2003).

<sup>16)</sup> NEDD8 ist ein Ubiquitin-ähnliches Protein, das ribosomale Proteine stabilisiert und deren Lokalisation im Nucleolus vermittelt. Bei der Aktivierung von p53 spielt NEDD8 eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen RPL11 und p53 (Sundqvist et al., 2009).

MDM2 bindet. Dadurch kann MDM2 nicht mehr mit p53 interagieren und für den proteosomalen Abbau ubiquitylieren.

Der Rb-Signalweg wird ebenfalls durch nucleolären Stress aktiviert und zwar, ähnlich wie der p53-Signalweg, durch eine Interaktion mit ribosomalen Proteinen. Durch Bindung des ribosomalen Proteins RPS14 an CDK4 bzw. CDK4/CyclinD1 Komplex wird dessen Kinase-Aktivität gehemmt, daraufhin kann Rb nicht mehr phosphoryliert und inaktiviert werden. Aktives (nicht-phosphoryliertes) Rb hemmt den Transkriptionsfaktor E2F, dessen Zielgene wie MCM6 und CENPA die Zellzyklusprogression antreiben. Eine Reduktion des Transkriptionsfaktors E2F kann zu Zellzyklusarrest und Seneszenz führen (Dick, Rubin, 2013; Lessard et al., 2018). Einen Überblick über die molekularen Mechanismen, die auf den nucleolären Stress nach Inkubation mit CX-5461 zurückzuführen sind, gibt Abbildung 4.3.

Es ist bekannt, dass nucleolärer Stress morphologisch zu einer Größenzunahme der Zelle führt (Myriantopoulos et al., 2019) und zu einem Integritätsverlust der Nucleoli, das als *nucleolar swelling* bezeichnet wird (Drygin et al., 2009). Solche veränderten Nucleoli sind auch nach Hemmung der Ribosomenbiogenese beschrieben (Derenzini et al., 2009). Auch nach Inkubation mit CX-5461 kommt es zu einer strukturellen Auflösung der Nucleoli in kolorektalen Karzinomzellen (Abbildung 4.4) und zu einer ungewöhnlich starken Größenzunahme der Zellen (Abbildung 7.8 im Anhang).



**Abbildung 4.4: Verlust der strukturellen Integrität der Nucleoli durch CX-5461.** Immunfluoreszenzfärbung von Zellen der Zelllinie LS174t nach 6 Tagen Inkubation mit 0,5 µmol/L CX-5461. 40x Vergrößerung. Rot: Nucleolin-Färbung. Gut strukturierte Nucleoli in der unbehandelten Kontrolle, die durch CX-5461 ihre strukturelle Integrität verlieren. Nucleolin, ein nucleoläres Phosphoprotein, ist ein Hauptbestandteil des Nucleolus (Tajrishi et al. (2011).

#### 4.4 CX-5461 in Kombination mit Bcl-Inhibitoren

In Tumorzellen solider Tumorentitäten, wie dem kolorektalen Karzinom, induziert der antiproliferative Effekt von CX-5461 einen seneszenten Zellphänotyp (Kapitel 3.1). Durch Induktion von Seneszenz verlieren Tumorzellen ihren pro-proliferativen Phänotyp. Mit dem Bcl-Inhibitor Navitoclax, der auch senolytische Eigenschaften aufweist, lassen sich seneszente Zellen gezielt eliminieren (Zhu et al., 2016). Dass dieses Prinzip auch für durch CX-5461 induzierte seneszente Zellen gilt, wurde in dieser Arbeit an kolorektalen Karzinomzellen erfolgreich gezeigt.

Zelluläre Seneszenz ist ein Zustand, der durch verschiedene Einflüsse zu einem irreversiblen Zellzyklusarrest führt. Auch eine Tumorthherapie kann Seneszenz in Tumorzellen auslösen (Bojko et al., 2019). Ein Vorteil, der sich aus dem antiproliferativen Ansatz der Seneszenzinduktion mit CX-5461 und der Apoptoseinduktion durch Navitoclax ergeben kann, ist u. a. eine mögliche Reduktion der Konzentration beider Substanzen (Sun et al., 2016). Dies wird zum einen dadurch deutlich, dass die antiproliferativ wirksame Konzentration von CX-5461 in Tumorzellen vielfach niedriger liegt als in nicht-transformierten Vergleichszellen (Tabelle 3.1), was auf den Umstand einer dysregulierten Ribosomenbiogenese in Tumorzellen zurückzuführen ist (Tsoi et al., 2017). Zum anderen wird dies an den Konzentrationen von Navitoclax deutlich, die in der Kombination mit CX-5461 und im Monoansatz notwendig waren. So betrug die

Konzentration an Navitoclax für SW480 in der Kombination 1 µmol/L und einzeln 2,8 µmol/L (Abbildung 3.17 und Tabelle 7.2 im Anhang). Der durch CX-5461 ausgelöste seneszenzente Zellphänotyp zeigt sich somit sensitiver gegenüber dem Apoptose-auslösenden Effekt von Navitoclax als nicht-seneszente Zellen. Dieses Ergebnis bestätigt das in Abbildung 1.5 dargestellte Konzept auf zellulärer Ebene; die molekularen Mechanismen sind aber teilweise noch ungeklärt. Ein Vorteil der Kombination aus CX-5461 und Navitoclax, die reduzierten Konzentrationen, könnten – übertragen auf die klinische Situation – geringere Nebenwirkungen bei gleicher Wirksamkeit bedeuten.

Pro-apoptotische Proteine wie BAX, die über p53 oder einem DDR-Signalweg aktiviert werden, formen Poren in die äußere Mitochondrienmembran (Kim et al., 2009) und aktivieren den intrinsischen Apoptoseweg (Zhu et al., 2016). Cytochrom c wird über diese Poren in das Zytosol freigesetzt und führt zur Aktivierung von Effektorcaspasen und damit zum Zelltod (Baig et al., 2016). Demgegenüber können anti-apoptotische Signale der (BH3)-only Proteinfamilie, wie z.B. BCL-xL, Mcl-1 und Bcl-w, durch pro-apoptotische Proteine wie PUMA und NOXA gehemmt werden (Youle, Strasser, 2008). In diese zur Aktivierung von Effektor-Caspasen führende Signalkaskade greift Navitoclax ein und hemmt die Interaktion zwischen anti-apoptotischen Bcl-Proteinen und pro-apoptotischen Bcl-Proteinen wie BAX.

Zusätzlich zu Navitoclax wurde als weiterer Bcl-Inhibitor AT101 untersucht (Kapitel 3.6). Die Kombination aus CX-5461 und AT101 war bei weniger Zelllinien (drei von sieben Zelllinien: DLD1, CaCo2 und HT29) effektiv als die Kombination aus CX-5461 und Navitoclax (sechs von sieben Zelllinien). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass nicht alle Zelllinien funktionelles pro-apoptotisches BAX exprimieren (Violette et al., 2002). Diese Vermutung muss aber erst noch durch weitere Untersuchungen eine Bestätigung finden.

Neben Bcl-Inhibitoren wurden weitere Kombinationen mit CX-5461 bereits untersucht, die sich ebenfalls als wirksam erwiesen (Tabelle 4.3). Den Umstand, dass CX-5461 einen Zellzyklusarrest in der G2-Phase auslöst (Kapitel 3.1), machten sich Negi und Brown zunutze und kombinierten CX-5461 mit dem G2-Inhibitor UCN-01 und erreichten dadurch einen ausgeprägten zytoreduktiven Effekt (Negi, Brown, 2015a).

**Tabelle 4.3: Überblick über die in der Literatur beschriebenen Kombinationsmöglichkeiten von CX-5461.** Eine in PubMed durchgeführte Recherche. Stand: Juli 2021.

Kombination mit	Mechanismus	Zelllinie	Publikation
Chloroquin	Autophagie-Inhibition	HL-60 u. a.	Okamoto et al. (2020), Biosci. Biotechnol. Biochem.
Single-Dose Röntgen-Strahlen	Bestrahlung bei BRCA <sup>17</sup> -Mutation	Ovarialzellkarzinom	Ismael et al. (2019), Cancers
UCN-01	G2-Inhibition	ALL	Negi, Brown (2015b), Oncotarget
sh-Knockdown	HERC2 <sup>18</sup> -Inaktivierung	HeLa	Zhu et al. (2021), Sci. Rep.
Everolimus	mTOR-Inhibition	Lymphom-Zellen	Kusnadi et al. (2020), EMBO J.
INK128	mTORC1/2	Orales Plattenepithelkarzinom	Shi et al. (2021), Biomed. Pharmacother.
NSC	Hemmung der Ubiquitylierung	HCT116 u. a.	Masud et al. (2021), Sci. Rep.
2'-C-MeA	Hemmung der mitochondrialen RNA-Synthese	Ovarialzellkarzinom	Rossetti et al. (2017), Oncotarget

HL-60: Leukämiezelllinie; ALL: Akute lymphatische Leukämie; HeLa: Zervixkarzinom-Zelllinie.

<sup>17</sup> BRCA1 und BRCA2 sind Tumorsuppressorgene, deren Produkte für Genomstabilität sorgen. Bei DNA-Doppelstrangbrüchen sorgen sie durch Aktivierung eines Programms zur homologen Rekombination für eine Reparatur der DNA. Außerdem regulieren sie Zellwachstum und -teilung (Stoppa-Lyonnet, 2016).

<sup>18</sup> HERCs gehören zu den Genen, die für Ubiquitin-Ligasen kodieren. HERC2 ist wichtig für DNA-Damage-Reparatur-Mechanismen (Garcia-Cano et al., 2019).



## 4.5 Ausblick

Die tumorale Ribosomenbiogenese scheint sich als ein neues (*emerging*) potentiell Target für eine zielgerichtete (*targeted*) Krebstherapie zu etablieren (Burger et al., 2010; Penzo et al., 2019). Der RNA-Polymerase I-Inhibitor CX-5461 (Drygin et al., 2011), der auf die erhöhte Transkription ribosomaler RNAs in Tumoren (Drygin et al., 2010; Tsoi et al., 2017) abzielt, führt über eine vom Nucleolus ausgehende Störung der Ribosomenbiogenese zu antiproliferativen Effekten.

Zu folgenden ungeklärten Punkten sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden:

(1) Die Stärke der Ansprechrate von Tumorzellen auf den antiproliferativen Effekt von CX-5461 wird in der Literatur in Zusammenhang mit Wildtyp-p53 gesehen (Chiu et al., 2019). Dieser Aspekt, der in der vorliegenden Arbeit so nicht bestätigt werden konnte, könnte möglicherweise eine Erklärung liefern für das unterschiedliche Ansprechen hämatologischer und solider Tumorzellen auf CX-5461. Eine mögliche Relevanz p53-unabhängiger Mechanismen (Hein et al., 2017) könnte mit der p53-positiven HCT116-Zelllinie und ihrer p53-negativen Schwesterlinie (HCT116p53<sup>-/-</sup>) untersucht werden.

(2) Der durch CX-5461 ausgelöste nucleoläre Stress (Abbildung 1.2) aktiviert DNA-Damage-Response (DDR)-Signalwege. Die zur Aktivierung von DDR-Signalwegen führenden molekularen Ursachen CX-5461-behandelter Zellen (Einzel- oder Doppelstrangbrüche oder eine andere Ursache) sind nicht bekannt. Auch die Irreversibilität der CX-5461-vermittelten Pol I-Inhibition ist noch nicht verstanden.

(3) Die Kombination von CX-5461 mit dem Bcl-Inhibitor Navitoclax war prinzipiell erfolgreich – ebenso für den zweiten getesteten Bcl-Inhibitor A101 –, doch war das Ansprechen der getesteten kolorektalen Zelllinien auf beide Kombination nicht gleich effektiv. Ein besseres Verständnis für die molekularen Mechanismen von Navitoclax und A101 in CX-behandelten Zellen ist daher erforderlich.

## 5 Zusammenfassung

Die halbmaximale (Proliferations-) inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) vom RNA-Polymerase I-Inhibitor CX-5461 liegt für die getesteten sieben humanen kolorektalen Karzinomzelllinien zwischen 0,7 und 3,1  $\mu\text{mol/L}$ , für nicht-transformierte Fibroblasten bei 8,1  $\mu\text{mol/L}$ . Der deutlich stärkere antiproliferative Effekt von CX-5461 auf Tumorzellen lässt somit ein mögliches therapeutisches Fenster erkennen.

CX-5461 (1  $\mu\text{mol/L}$  und weniger) induziert einen persistierenden Zellzyklus-arretierten Zellphänotyp mit Seneszenz-assoziiierter (SA)  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (SA- $\beta$ -Gal). Die durch CX-5461 ausgelöste verringerte Synthese ribosomaler RNA (rRNA)-Transkripte im Nucleolus, ein Subkompartiment des Nucleus, in dem die Transkription der ribosomalen DNA und Bildung von Prä-Ribosomen stattfinden, hat eine Störung der Ribosomenbiogenese zur Folge. Diese als nucleolärer Stress bezeichnete Situation ist mit zahlreichen Einzelphänomenen assoziiert wie der Akkumulation ribosomaler Proteine aufgrund eines durch CX-5461 verursachten Missverhältnisses bei der Synthese ribosomaler Proteine und rRNAs. Auch kommt es bei nucleolärem Stress zur Aktivierung Zellzykularrest-führender Signalwege vermittelt durch DNA-Damage-Response, p53 und Retinoblastom (Rb). Die durch CX-5461 induzierten seneszenten Zellen lassen sich durch Kombination mit dem Bcl-Inhibitor und Senolytikum Navitoclax in Apoptose überführen. Das kombinierte Strategiekonzept demonstriert, dass der pro-proliferative Phänotyp von Tumorzellen mit CX-5461 durch Induktion von Seneszenz effektiv gestoppt werden kann, um anschließend diese Zellen mit dem Bcl-Inhibitor Navitoclax gezielt in Apoptose zu überführen.

Der durch CX-5461 ausgelöste seneszente Zellphänotyp zeigt sich sensitiv gegenüber dem Apoptose-auslösenden Effekt von Navitoclax – im Ggs. zu nicht-seneszenten Zellen. Basierend auf diesem Konzept deutet sich eine potentielle neue Strategie für eine Tumorthherapie an, deren Grundlage die kombinierte Adressierung der beiden antiproliferativen Phänomene Seneszenz und Apoptose in soliden Tumorzellen wie dem kolorektalen Karzinom darstellt.

## Summary

The antiproliferative effects of CX-5461, a RNA Polymerase I (Pol I) inhibitor, measured as half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ -value) in seven human colorectal cancer cell lines, ranged between  $IC_{50}=0.7 \mu\text{mol/L}$  and  $IC_{50}=3.1 \mu\text{mol/L}$  CX-5461. In contrast, non-transformed fibroblast control cells demonstrated an  $IC_{50}$ -value of  $8.1 \mu\text{mol/L}$ . This difference in  $IC_{50}$  values between tumor cells and normal cells that demonstrate a stronger antiproliferative effect of CX-5461 in tumor cells may open a relevant therapeutic window.

CX-5461 induced a persistent state of cell-cycle-arrested cells with senescence-associated (SA)  $\beta$ -Galactosidase positivity. CX-5461 negatively influences the ribosome biogenesis that takes place in the nucleolus, a nuclear sub-compartment and the cellular site of transcription of ribosomal DNA and pre-ribosome formation. CX-5461 mediated deficient ribosome biogenesis due to a mismatch of reduced ribosomal RNA (rRNA) synthesis and ribosomal protein synthesis caused nucleolar stress. A nucleolar stress response led to different molecular phenomena within the cell. For CX-5461 induced nucleolar stress, main sequences were the accumulation of ribosomal proteins within the nucleolus and activation of different signal pathways involved in the induction of cell cycle arrest mediated by DNA Damage Response (DDR) signals as well as p53 and retinoblastoma (Rb) dependent pathways. The antiproliferative effects of CX-5461 were enhanced using the pro-apoptotic Bcl-inhibitor and senolytic Navitoclax, inducing apoptosis in the tumor cells.

The cellular senescent phenotype as consequence of RNA Pol I inhibition by CX-5461 was sensitive to the pro-apoptotic Navitoclax in contrast to non-senescent cells. The results of this thesis confirm a perspective for an anti-tumor-specific therapeutic strategy addressing the two antiproliferative phenomena senescence and apoptosis in solid tumor cells like the colorectal carcinoma.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abraham, R. T. . (1998). Mammalian target of rapamycin: immunosuppressive drugs uncover a novel pathway of cytokine receptor signaling. *Current Opinion in Immunology*(10), 330-336.
- Arabi, A., S. Wu, K. Ridderstrale, H. Bierhoff, et al. (2005). c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol*, 7(3), 303-310.
- Baig, S., I. Seevasant, J. Mohamad, A. Mukheem, et al. (2016). Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand? *Cell Death Dis*, 7, e2058.
- Banin, S., L. Moyal, S.-Y. Shieh, Y. Taya, et al. (1998). Enhanced Phosphorylation of p53 by ATM in Response to DNA Damage. *Science*, 281, 1674-1677.
- Barth, S., D. Glick, K. F. Macleod. (2010). Autophagy: assays and artifacts. *J Pathol*, 221(2), 117-124.
- Blackford, A. N., S. P. Jackson. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell*, 66(6), 801-817.
- Bojko, A., J. Czarnecka-Herok, A. Charzynska, M. Dabrowski, et al. (2019). Diversity of the Senescence Phenotype of Cancer Cells Treated with Chemotherapeutic Agents. *Cells*, 8(12).
- Brenner, Hermann, Matthias Kloor, Christian Peter Pox. (2014). Colorectal cancer. *The Lancet*, 383(9927), 1490-1502.
- Brighenti, E. , D. Treré, M. Derenzini. (2015). Targeted cancer therapy with ribosome biogenesis inhibitors: a real possibility? *Oncotarget*, 6(36).
- Bringold, F., M. Serrano. (2000). Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Experimental Gerontology*, 35.
- Brooks, Christopher L., Wei Gu. (2003). Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(2), 164-171.
- Bruno, P. M., M. Lu, K. A. Dennis, H. Inam, et al. (2020). The primary mechanism of cytotoxicity of the chemotherapeutic agent CX-5461 is topoisomerase II poisoning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(8), 4053-4060.
- Burger, K., B. Muhl, T. Harasim, M. Rohmoser, et al. (2010). Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. *J Biol Chem*, 285(16), 12416-12425.
- Bywater, M. J., G. Poortinga, E. Sanij, N. Hein, et al. (2012). Inhibition of RNA polymerase I as a therapeutic strategy to promote cancer-specific activation of p53. *Cancer Cell*, 22(1), 51-65.
- Carney, J. P., R. S. Maser, H. Olivares, E. M. Davis, et al. (1998). The hMre11/hRad50 Protein Complex and Nijmegen Breakage Syndrome: Linkage of Double-Strand Break Repair to the Cellular DNA Damage Response. *Cell*, 93(3), 477-486.
- Chen, J. , J. Soong, A. Oza, D. Provencher. (2021). Phase Ib Expansion Study of CX-5461 in Patients With Solid Tumours and BRCA1/2, PALB2 or Homologous Recombination Deficiency (HRD) Mutation. *clinicaltrials.gov*
- Chen, N., J. Debnath. (2010). Autophagy and tumorigenesis. *FEBS Lett*, 584(7), 1427-1435.

Cheng, EH, MC Wei, S Weiler. (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular Cell*(8), 705-711.

Chiu, Y. C., H. H. Chen, T. Zhang, S. Zhang, et al. (2019). Predicting drug response of tumors from integrated genomic profiles by deep neural networks. *BMC Med Genomics*, 12(Suppl 1), 18.

Cornelison, R., Z. C. Dobbin, A. A. Katre, D. H. Jeong, et al. (2017). Targeting RNA-Polymerase I in Both Chemosensitive and Chemoresistant Populations in Epithelial Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res*, 23(21), 6529-6540.

Costanzo, G., S. Camier, P. Carlucci, L. Burderi, et al. (2001). RNA polymerase III transcription complexes on chromosomal 5S rRNA genes in vivo: TFIIB occupancy and promoter opening. *Mol Cell Biol*, 21(9), 3166-3178.

Dai, M. S., H. Lu. (2008). Crosstalk between c-Myc and ribosome in ribosomal biogenesis and cancer. *J Cell Biochem*, 105(3), 670-677.

Dannheisig, D. P., J. Bachle, J. Tasic, M. Keil, et al. (2021). The Wnt/beta-Catenin Pathway is Activated as a Novel Nucleolar Stress Response. *J Mol Biol*, 433(2), 166719.

Darzynkiewicz, Z., X. Huang, H. Zhao. (2017). Analysis of Cellular DNA Content by Flow Cytometry. *Curr Protoc Immunol*, 119, 5 7 1-5 7 20.

Derenzini, E., A. Rossi, D. Trere. (2018). Treating hematological malignancies with drugs inhibiting ribosome biogenesis: when and why. *J Hematol Oncol*, 11(1), 75.

Derenzini, M., L. Montanaro, D. Trere. (2009). What the nucleolus says to a tumour pathologist. *Histopathology*, 54(6), 753-762.

Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF: Registrierungsnummer: 021/0070L, abgerufen: 10.6.2021. (2019). Leitlinienprogramm Onkologie: S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1, 2019. *Leitlinienprogramm Onkologie AWMF*.

Dick, F. A., S. M. Rubin. (2013). Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(5), 297-306.

Diesch, J., R. D. Hannan, E. Sanij. (2014). Perturbations at the ribosomal genes loci are at the centre of cellular dysfunction and human disease. *Cell and Bioscience*.

Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, O. Pereira-Smith. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20), 9363-9367.

Drygin, D., A. Siddiqui-Jain, S. O'Brien, M. Schwaebe, et al. (2009). Anticancer activity of CX-3543: a direct inhibitor of rRNA biogenesis. *Cancer Res*, 69(19), 7653-7661.

Drygin, D., W. G. Rice, I. Grummt. (2010). The RNA polymerase I transcription machinery: an emerging target for the treatment of cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50, 131-156.

Drygin, D., A. Lin, K. Anderes, W. G. Rice, et al. (2011). Targeting RNA polymerase I with an oral small molecule CX-5461 inhibits ribosomal RNA synthesis and solid tumor growth. *Cancer Res*, 71(4), 1418-1430.

Fearon, E. R., B. Vogelstein. (1990). A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell*, 61.

Fearon, E. R. (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol*, 6, 479-507.

Ferreira, R., J. S. Schneekloth, Jr., K. I. Panov, K. M. Hannan, et al. (2020). Targeting the RNA Polymerase I Transcription for Cancer Therapy Comes of Age. *Cells*, 9(2).

Fetherston, J., E. Werner, R. Patterson. (1984). Processing of the external transcribed spacer of murine rRNA and site of action of actinomycin D. *Nucleic Acids Research*, 12.

Frenk, S., J. Houseley. (2018). Gene expression hallmarks of cellular ageing. *Biogerontology*, 19(6), 547-566.

Fridman, J. S., S. W. Lowe. (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 22(56), 9030-9040.

Garcia-Cano, J., A. Martinez-Martinez, J. Sala-Gaston, L. Pedrazza, et al. (2019). HERCing: Structural and Functional Relevance of the Large HERC Ubiquitin Ligases. *Front Physiol*, 10, 1014.

Haddach, M., M. K. Schwaebe, J. Michaux, J. Nagasawa, et al. (2012). Discovery of CX-5461, the First Direct and Selective Inhibitor of RNA Polymerase I, for Cancer Therapeutics. *ACS Med Chem Lett*, 3(7), 602-606.

Hanahan, D., R. A. Weinberg. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.

Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, et al. (1993). The p21 Cdk-Interacting Protein Cip1 is a Potent Inhibitor of G1 Cyclin-Dependent Kinases. *Cell*, 75, 805-816.

Hartwell, L.H, T.A. Weinert. (1989). Checkpoints: Controls That Ensure the Order of Cell Cycle Events *Science*.

Hayflick, L., P.S. Moorhead. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25, 585-621.

Hein, N., D. P. Cameron, K. M. Hannan, R. D. Hannan, et al. (2017). Inhibition of Pol I transcription treats murine and human AML by targeting the leukemia-initiating cell population. *Blood*, 129(21), 2882-2895.

Ismael, M., R. Webb, H. M. Coley, et al. (2019). The Targeting of RNA Polymerase I Transcription Using CX-5461 in Combination with Radiation Enhances Tumour Cell Killing Effects in Human Solid Cancers. *Cancers (Basel)*, 11(10).

Jazayeri, A., J. Falck, C. Lukas, J. Bartek, et al. (2006). ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol*, 8(1), 37-45.

Jordan, P., M. Carmo-Fonseca. (1998). Cisplatin inhibits synthesis of ribosomal RNA in vivo. *Nucleic Acids Research*, 26.

Jung, Y. S., Y. Qian, X. Chen. (2010). Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cell Signal*, 22(7), 1003-1012.

Kaidi, A., S. P. Jackson. (2013). KAT5 tyrosine phosphorylation couples chromatin sensing to ATM signalling. *Nature*, 498(7452), 70-74.

Khot, A., N. Brajanovski, D. P. Cameron, N. Hein, et al. (2019). First-in-Human RNA Polymerase I Transcription Inhibitor CX-5461 in Patients with Advanced Hematologic Cancers: Results of a Phase I Dose-Escalation Study. *Cancer Discov*, 9(8), 1036-1049.

- Kim, D.-W., N. Wu, D. MacPherson. (2016). Genetic requirement for Mycl and efficacy of RNA Pol I inhibition in mouse models of small cell lung cancer. *Genes & Development*, 30.
- Kim, H., H. C. Tu, E. H. Cheng. (2009). Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*, 36(3), 487-499.
- Kobayashi, T. (2014). Ribosomal RNA gene repeats, their stability and cellular senescence. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 90(4), 119-129.
- Kressler, D., E. Hurt, J. Bassler. (2010). Driving ribosome assembly. *Biochim Biophys Acta*, 1803(6), 673-683.
- Kusnadi, E. P., A. S. Trigos, R. B. Pearson, et al. (2020). Reprogrammed mRNA translation drives resistance to therapeutic targeting of ribosome biogenesis. *EMBO J*, 39(21), e105111.
- Lee, H. C., H. Wang, V. Baladandayuthapani, R. Z. Orlowski, et al. (2017). RNA Polymerase I Inhibition with CX-5461 as a Novel Therapeutic Strategy to Target MYC in Multiple Myeloma. *Br J Haematol*, 177(1), 80-94.
- Lessard, F., S. Igelmann, M. Oeffinger, G. Ferbeyre, et al. (2018). Senescence-associated ribosome biogenesis defects contributes to cell cycle arrest through the Rb pathway. *Nat Cell Biol*, 20(7), 789-799.
- Li, L., Y. Li, J. Zhao, S. Fan, et al. (2016). CX-5461 induces autophagy and inhibits tumor growth via mammalian target of rapamycin-related signaling pathways in osteosarcoma. *Oncotargets Ther*, 9, 5985-5997.
- Li, W., P. He, Y. Huang, Y. F. Li, et al. (2021). Selective autophagy of intracellular organelles: recent research advances. *Theranostics*, 11(1), 222-256.
- Mahajan, Pramod B. (1994). Modulation of Transcription of rRNA Genes by Rapamycin. *Int J Immunopharmac.*, 16, 711-721.
- Makhale, A., D. Nanayakkara, P. Raninga, K. K. Khanna, et al. (2021). CX-5461 Enhances the Efficacy of APR-246 via Induction of DNA Damage and Replication Stress in Triple-Negative Breast Cancer. *Int J Mol Sci*, 22(11).
- Marmol, I., C. Sanchez-de-Diego, A. Pradilla Dieste, E. Cerrada, et al. (2017). Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*, 18(1).
- Mars, J. C., M. G. Tremblay, M. Valere, D. S. Sibai, et al. (2020). The chemotherapeutic agent CX-5461 irreversibly blocks RNA polymerase I initiation and promoter release to cause nucleolar disruption, DNA damage and cell inviability. *NAR Cancer*, 2(4).
- Masud, T., C. Soong, H. Xu, J. Biele, et al. (2021). Ubiquitin-mediated DNA damage response is synthetic lethal with G-quadruplex stabilizer CX-5461. *Sci Rep*, 11(1), 9812.
- Matsuoka, S., M. Huang, S. J. Elledge. (1998). Linkage of ATM to Cell Cycle Regulation by the Chk2 Protein. *Science*, 282, 1893-1897.
- Meers, P., T. Mealy. (1994). Phospholipid Determinants for Annexin V Binding Sites and the Role of Tryptophan 187 *Biochemistry*, 33.

Mischo, Hannah E., Peter Hemmerich, Frank Grosse, Suisheng Zhang. (2005). Actinomycin D Induces Histone  $\gamma$ -H2AX Foci and Complex Formation of  $\gamma$ -H2AX with Ku70 and Nuclear DNA Helicase II. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(March 11), 9586-9594.

Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev*, 21(22), 2861-2873.

Moore, P. B., T. A. Steitz. (2002). The involvement of RNA in ribosome function. *Nature*, 418.

Muscarella, D. E.; Rachlinski, M. K.; Sotiriadis, J.; Bloom, S. E. . (1998). Contribution of gene-specific lesions, DNA-replication-associated damage, and subsequent transcriptional inhibition in topoisomerase inhibitor- mediated apoptosis in lymphoma cells. *Experimental Cell Research*, 238.

Myriantopoulos, V., K. Evangelou, P. V. S. Vasileiou, T. Cooks, et al. (2019). Senescence and senotherapeutics: a new field in cancer therapy. *Pharmacol Ther*, 193, 31-49.

Negi, S. , P. Brown. (2015a). Transient rRNA synthesis inhibition with CX-5461 is sufficient to elicit growth arrest and cell death in acute lymphoblastic leukemia cells. *Oncotarget*, 6.

Negi, S. , P. Brown. (2015b). rRNA synthesis inhibitor, CX-5461, activates ATM/ATR pathway in acute lymphoblastic leukemia, arrests cells in G2 phase and induces apoptosis. *Oncotarget*, 6.

Nishimura, Kazuho, Takuya Kumazawa, Takao Kuroda, Naohiro Katagiri, et al. (2015). Perturbation of Ribosome Biogenesis Drives Cells into Senescence through 5S RNP-Mediated p53 Activation. *Cell Reports*, 10(8), 1310-1323.

Okamoto, S., K. Miyano, M. Kajikawa, A. Yamauchi, et al. (2020). The rRNA synthesis inhibitor CX-5461 may induce autophagy that inhibits anticancer drug-induced cell damage to leukemia cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 84(11), 2319-2326.

Olcina, M. M., I. P. Foskolou, S. Anbalagan, J. M. Senra, et al. (2013). Replication stress and chromatin context link ATM activation to a role in DNA replication. *Mol Cell*, 52(5), 758-766.

Otto, C., C. Kastner, S. Schmidt, K. Uttinger, et al. (2021). RNA Polymerase I activity prevents terminal differentiation and growth arrest in colorectal cancer and suppresses vulnerability to cardiac glycosides. *In revision at Cancer Research (as of October 2021)*.

Paris, R., R. E. Henry, S. J. Stephens, M. McBryde, et al. (2008). Multiple p53-independent gene silencing mechanisms define the cellular response to p53 activation. *Cell Cycle*, 7(15), 2427-2433.

Penzo, M., L. Montanaro, D. Trere, M. Derenzini. (2019). The Ribosome Biogenesis-Cancer Connection. *Cells*, 8(1).

Petrova, N. V., A. K. Velichko, S. V. Razin, O. L. Kantidze. (2016). Small molecule compounds that induce cellular senescence. *Aging Cell*, 15(6), 999-1017.

Pfaffl, Michael W. . (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29.

Polo, S. E. , S. P. Jackson. (2011). Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes & Development*, 25.

Popov, A., E. Smirnov, L. Kovacik, O. Raska, et al. (2013). Duration of the first steps of the human rRNA processing. *Nucleus*, 4(2), 134-141.



Quin, J.; , K. T.; Chan, R.D. Hannan, et al. (2016). Inhibition of RNA polymerase I transcription initiation by CX-5461 activates non-canonical ATM/ATR signaling. *Oncotarget*, 7(31).

Ray, S., T. Panova, J. C. Zomerdijk, et al. (2013). Topoisomerase IIalpha promotes activation of RNA polymerase I transcription by facilitating pre-initiation complex formation. *Nat Commun*, 4, 1598.

Rogakou, E. P.; D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova, et al. (1998). DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 5858-5868.

Rossetti, S., A. J. Wierzbicki, N. Sacchi. (2017). Undermining ribosomal RNA transcription in both the nucleolus and mitochondrion: an offbeat approach to target MYC-driven cancer. *Oncotarget*, 9.

Russell, Jackie, Joost Zomerdijk. (2006). The RNA polymerase I transcription machinery. *Biochem. Soc. Symp.*, 73.

Salama, R., M. Sadaie, M. Hoare, M. Narita. (2014). Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev*, 28(2), 99-114.

Sanij, E., K. M. Hannan, R. B. Pearson, et al. (2020). CX-5461 activates the DNA damage response and demonstrates therapeutic efficacy in high-grade serous ovarian cancer. *Nat Commun*, 11(1), 2641.

Saxton, R. A., D. M. Sabatini. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168(6), 960-976.

Scala, F., E. Brighenti, L. Montanaro, M. Derenzini, et al. (2016). Direct relationship between the level of p53 stabilization induced by rRNA synthesis-inhibiting drugs and the cell ribosome biogenesis rate. *Oncogene*, 35(8), 977-989.

Schmidt, S., S. Denk, A. Wiegner. (2020). Targeting Protein Synthesis in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*, 12(5).

Schneikert, J., J. Behrens. (2007). The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development. *Gut*, 56(3), 417-425.

Shi, S., H. Luo, B. Xu, et al. (2021). Combined inhibition of RNA polymerase I and mTORC1/2 synergize to combat oral squamous cell carcinoma. *Biomed Pharmacother*, 133, 110906.

Shieh, S.Y., M. Ikeda, Y. Taya, C. Prives. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, 91, 325-334.

Son, J., K. M. Hannan, G. Poortinga, N. Hein, et al. (2020). rDNA Chromatin Activity Status as a Biomarker of Sensitivity to the RNA Polymerase I Transcription Inhibitor CX-5461. *Front Cell Dev Biol*, 8, 568.

Stintzing, S., V. Heinemann, N. Moosmann, W. Hiddemann, et al. (2009). The treatment of colorectal carcinoma with monoclonal antibodies: the importance of KRAS mutation analysis and EGFR status. *Dtsch Arztebl Int*, 106(12), 202-206.

Stoppa-Lyonnet, D. (2016). The biological effects and clinical implications of BRCA mutations: where do we go from here? *Eur J Hum Genet*, 24 Suppl 1, S3-9.

Sudarsanam, S., D. Johnson. (2010). Functional consequences of mTOR inhibition. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 13.

Sun, W., P. E. Sanderson, W. Zheng. (2016). Drug combination therapy increases successful drug repositioning. *Drug Discov Today*, 21(7), 1189-1195.

Sundqvist, A., G. Liu, A. Mirsaliotis, D. P. Xirodimas. (2009). Regulation of nucleolar signalling to p53 through NEDDylation of L11. *EMBO Rep*, 10(10), 1132-1139.

Sung, H., J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, et al. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71(3), 209-249.

Suzuki, K., P. Bose, R. Y. Leong-Quong, D. J. Fujita, et al. (2010). REAP: A two minute cell fractionation method. *BMC Res Notes*, 3, 294.

Tajrishi, M. M., R. Tuteja, N. Tuteja. (2011). Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Commun Integr Biol*, 4(3), 267-275.

Taylor, J. S., J. Zeki, K. Ornell, J. Coburn, et al. (2019). Down-regulation of MYCN protein by CX-5461 leads to neuroblastoma tumor growth suppression. *J Pediatr Surg*, 54(6), 1192-1197.

Tchkonia, T., Y. Zhu, J. van Deursen, J. Campisi, et al. (2013). Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest*, 123(3), 966-972.

Timucin, A. C., H. Basaga, O. Kutuk. (2019). Selective targeting of antiapoptotic BCL-2 proteins in cancer. *Med Res Rev*, 39(1), 146-175.

Torre, L. A., F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, et al. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 65(2), 87-108.

Tsoi, H., K. C. Lam, J. Yu, et al. (2017). Pre-45s rRNA promotes colon cancer and is associated with poor survival of CRC patients. *Oncogene*, 36(44), 6109-6118.

van Sluis, M., B. McStay. (2019). Nucleolar DNA Double-Strand Break Responses Underpinning rDNA Genomic Stability. *Trends Genet*, 35(10), 743-753.

Violette, S., L. Poulain, E. Dussaulx, D. Pepin, et al. (2002). Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in addition to Bax and p53 status. *Int J Cancer*, 98(4), 498-504.

Warner, J. R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast *TIBS*

White, Eileen, Robert DiPaola, S. . (2009). The Double-edged Sword of Autophagy Modulation in Cancer. *Clinical Cancer Research*.

Wild, T., P. Horvath, U. Kutay, et al. (2010). A protein inventory of human ribosome biogenesis reveals an essential function of exportin 5 in 60S subunit export. *PLoS Biol*, 8(10), e1000522.

Woods, S. J., K. M. Hannan, R. B. Pearson, R. D. Hannan. (2015). The nucleolus as a fundamental regulator of the p53 response and a new target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*, 1849(7), 821-829.

Xu, H., M. Di Antonio, S. McKinney, V. Mathew, et al. (2017). CX-5461 is a DNA G-quadruplex stabilizer with selective lethality in BRCA1/2 deficient tumours. *Nat Commun*, 8, 14432.

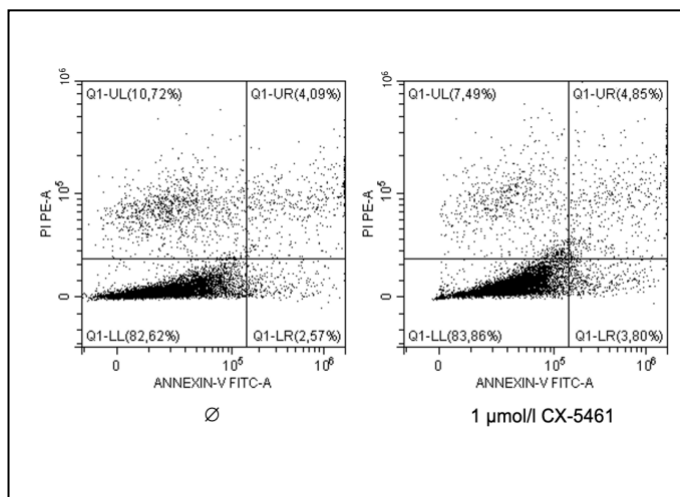
Ye, F. B., A. Hamza, T. Singh, S. Flibotte, et al. (2020). A Multimodal Genotoxic Anticancer Drug Characterized by Pharmacogenetic Analysis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 215(3), 609-621.

- Yee, N. S. (2018). Update in Systemic and Targeted Therapies in Gastrointestinal Oncology. *Biomedicines*, 6(1).
- Youle, R. J., A. Strasser. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(1), 47-59.
- Zeman, M., K. Cimprich, Karlene A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nature cell biology*, 16(1), 2–9.
- Zhu, M., W. Wu, Y. Togashi, W. Liang, et al. (2021). HERC2 inactivation abrogates nucleolar localization of RecQ helicases BLM and WRN. *Sci Rep*, 11(1), 360.
- Zhu, Y., J. L. Armstrong, T. Tchkonina, J. L. Kirkland. (2014). Cellular senescence and the senescent secretory phenotype in age-related chronic diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 17(4), 324-328.
- Zhu, Y., T. Tchkonina, T. Pirtskhalava, J. L. Kirkland, et al. (2015). The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell*, 14(4), 644-658.
- Zhu, Y., T. Tchkonina, P. D. Robbins, J. L. Kirkland, et al. (2016). Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell*, 15(3), 428-435.

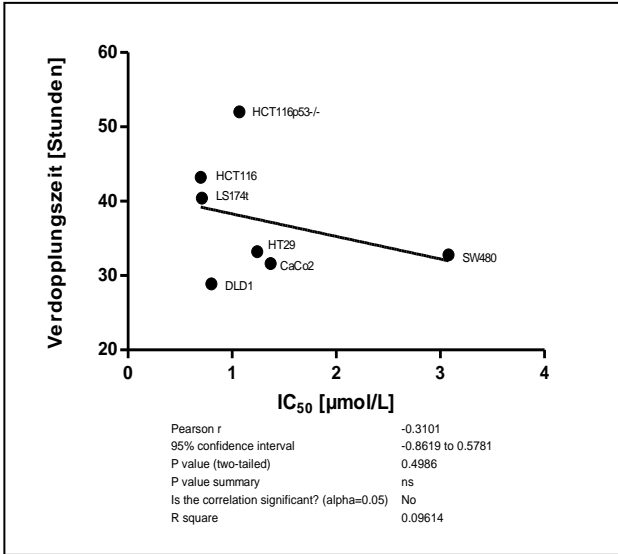
## 7 Anhang

**Tabelle 7.1: Verdopplungszeiten (VZ) der untersuchten Zelllinien in Stunden.** Errechnet nach  $T(h) = \frac{\log(2) \times t}{\log(ODt2) - \log(ODt1)}$ , mit T als Verdopplungszeit, t in Stunden (72h,  $\Delta$  für "Differenz") und OD, Optische Dichte, der Färbungen mit Kristallviolett zur Bestimmung der Zellzahl (Kapitel 2.4). \*p53 deletierte Variante der Zelllinie. SD für Standardabweichung.

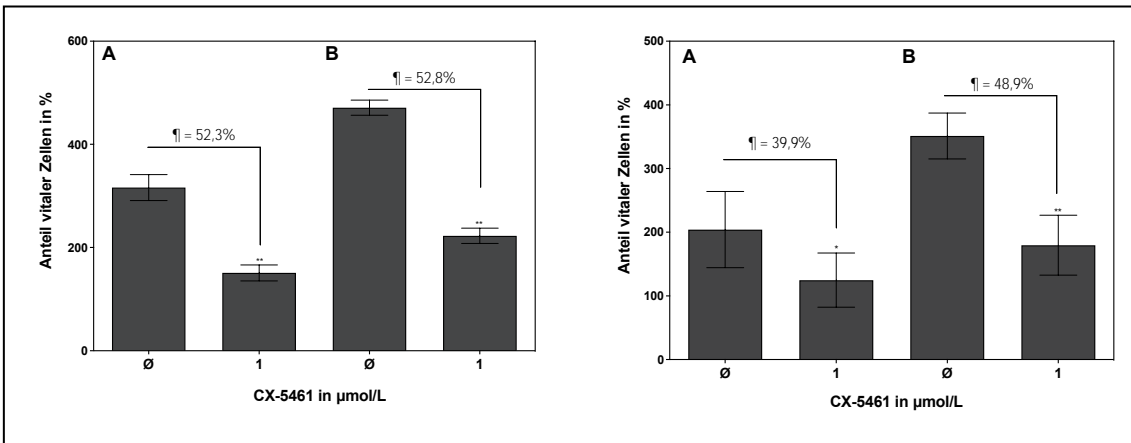
Zelllinie	CaCo2	DLD1	HCT116	HCT116*	HT29	LS174t	SW480	NHDF
VZ	31,6	28,9	43,2	52,0	33,2	40,4	32,8	134,9
SD	2,6	2,6	8,5	8,5	5,0	1,4	1,2	27,5



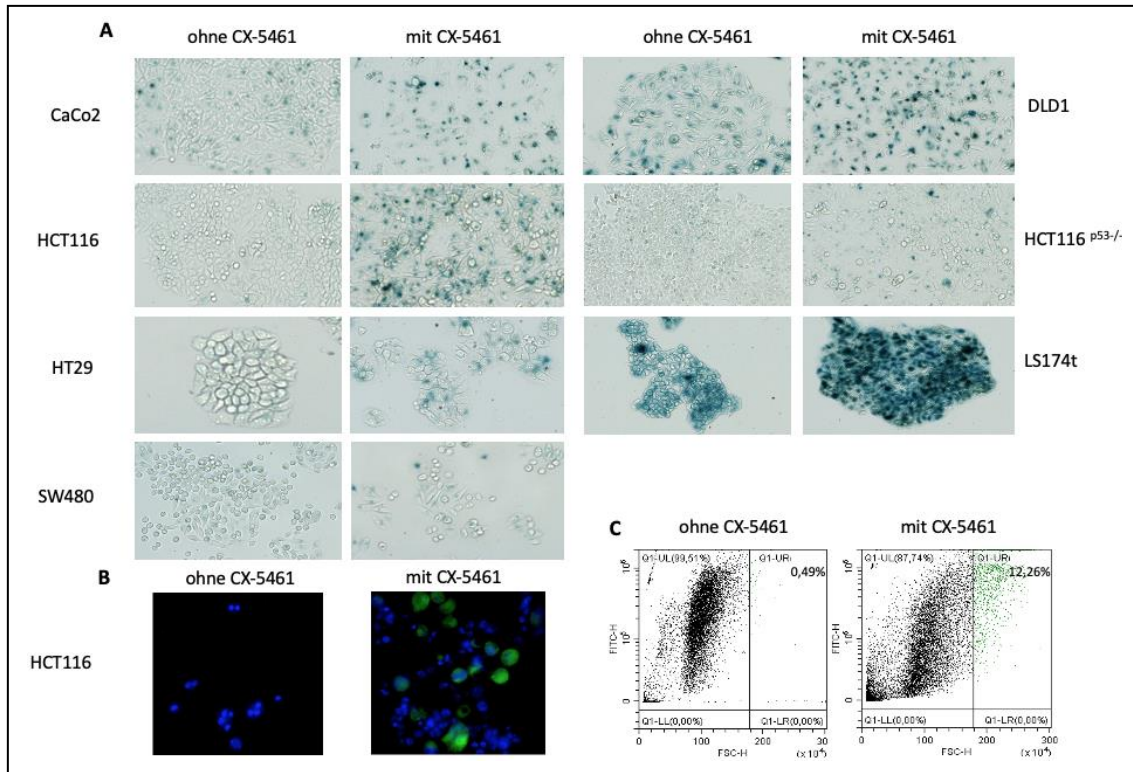
**Abbildung 7.1: CX-5461 löst keine Apoptose aus.** Annexin-Färbung in der FACS-Untersuchung von Zellen der Zelllinie HCT116 nach 72 Stunden. Aufgetragen auf der X-Achse in logarithmischer Darstellung ist die Fluoreszenzintensität von Annexin V und auf der Y-Achse von Propidiumjodid. Diese Darstellung erlaubt die Unterscheidung zwischen apoptotischen Zellen im unteren rechten Quadranten und nekrotischen bzw. spät apoptotischen Zellen im oberen rechten Quadranten.



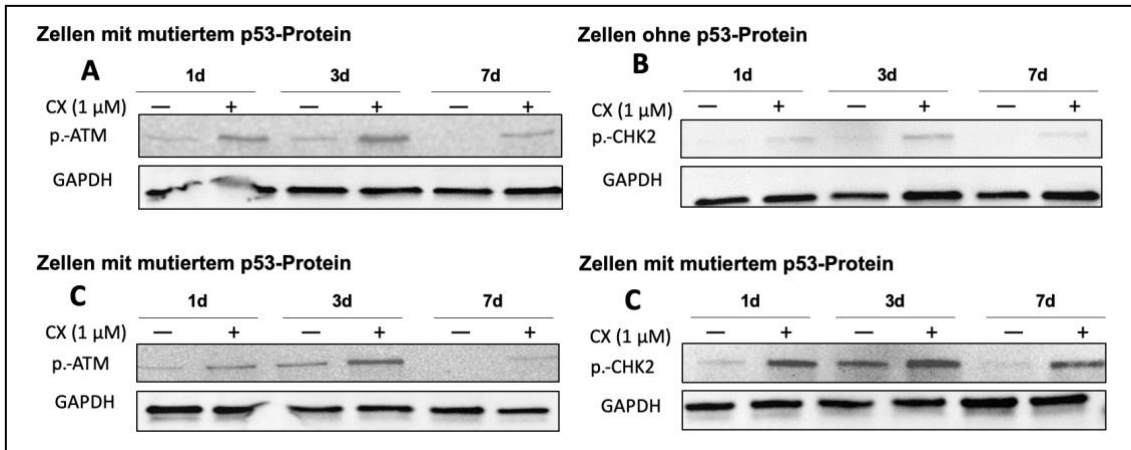
**Abbildung 7.2:** Der antiproliferative Effekt ( $IC_{50}$ ) von CX-5461 ist unabhängig von der individuellen Stärke der Zellproliferation (Verdopplungszeit). Aufgetragen sind die Daten der Tabellen 3.1 und 7.1. Grafische Darstellung und statistische Auswertung mit GraphPad Prism 5.0.



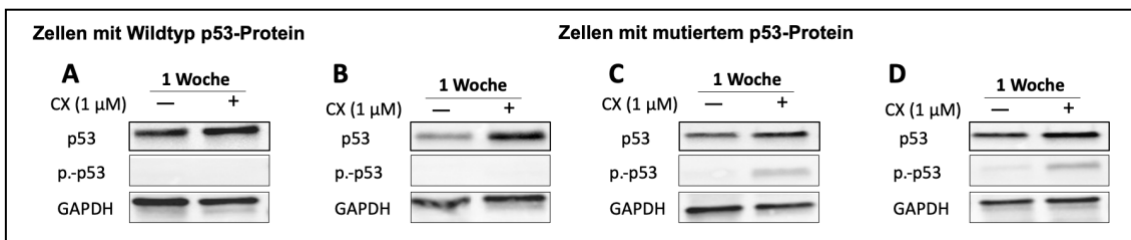
**Abbildung 7.3:** Der antiproliferative Effekt von CX-5461 bei starker und schwacher Tumorzellproliferation. Dargestellt ist die Proliferation der kolorektalen Zelllinien DLD1 (links) und HT29 (rechts) nach 72 Stunden bei verschiedenen Konzentrationen an CX-5461 bei 1 % Serum (A) und 10 % Serum (B) relativ zur Aussaat (= 100 %, nicht gezeigt). Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Angegeben sind Mittelwert mit Standardabweichung von einem repräsentativen Versuch mit sechs technischen Replikaten. \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ( $\emptyset$ ) im nicht-gepaarten t-Test.



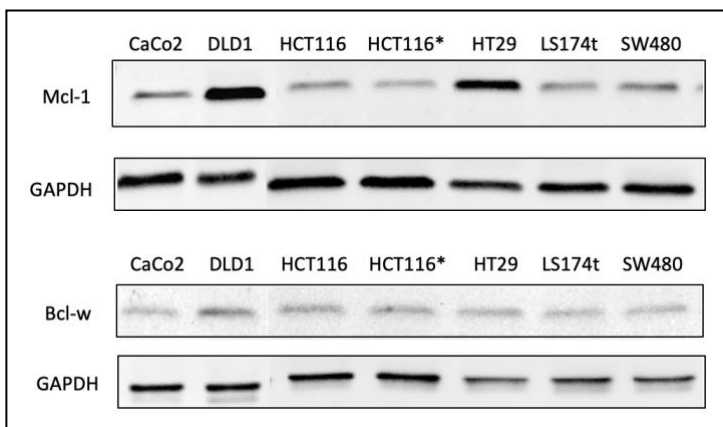
**Abbildung 7.4: CX-5461 löst Seneszenz in kolorektalen Karzinomzellen aus. (A)** Nachweis der  $\beta$ -Galactosidase-Reaktivität nach 72 Stunden Inkubation mit 1  $\mu\text{mol/L}$  CX-5461 und **(B)** mit Spider- $\beta$ -Galactosidase-Immunfluoreszenz-Färbung ([www.tebu-bio.com](http://www.tebu-bio.com); Kat.-Nr.: SG03-10). Blau: Kernfärbung mit Hoechst-Farbstoff. Vergrößerung: 20x. **(C)** Durchflusszytometrische Analyse von LS174t-Zellen, die mit 1  $\mu\text{mol/L}$  CX-5461 für 9 Tage inkubiert wurden.



**Abbildung 7.5: Hinweis auf einen aktiven DDR-Signalweg nach Inkubation mit CX-5461.** Gezeigt sind repräsentative Western Blots zum Nachweis von Phospho-ATM (p.-ATM, Serin-Phosphorylierung an Position 1981) und Phospho-CHK2 (p.-CHK2, Threonin-Phosphorylierung an Position 68). Der Anteil an nicht-phosphoryliertem CHK2 und ATM war durch CX-5461 unbeeinflusst (Daten nicht gezeigt). Antikörper in Tabelle 2.4. (A): DLD1; (B): HCT116 p53<sup>-/-</sup> und (C): SW480. "CX": CX-5461.



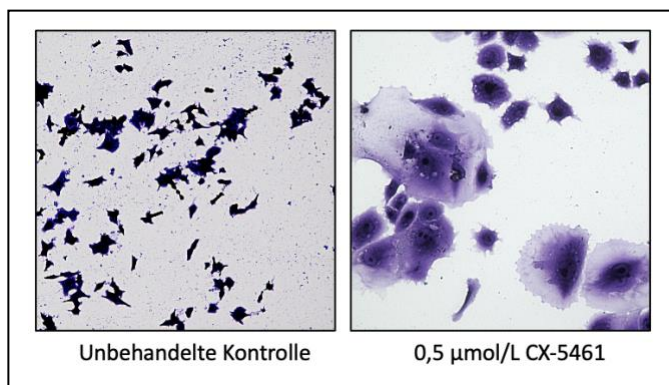
**Abbildung 7.6: Akkumulation und Phosphorylierung von p53 nach Inkubation mit CX-5461.** Repräsentative Western Blots mit Antikörpern gegen p53 und p-p53 (Ser15). Antikörper in Tabelle 2.4. A: HCT116; B: LS174T; C: HT29; D: SW480. "CX": CX-5461.



**Abbildung 7.7: Nachweis der Expression der Bcl-Proteine Mcl-1 und Bcl-w in kolorektalen Karzinomzellen.** \*p53-negative Variante der Zelllinie.

**Tabelle 7.2: Der antiproliferative Effekt von Navitoclax.** Die halbmaximale inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) von Navitoclax in  $\mu\text{mol/L}$  ist als Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall [in Klammern] für mindestens 3 unabhängige Versuche angegeben. Hierzu wurden die Zellen für 3 Tage mit Navitoclax (von  $10^{-5}$  bis  $10^{-8}$  mol/L) inkubiert und der Anteil vitaler Zellen mit Kristallviolett-Färbung bestimmt. HCT116\*: p53 deletierte Variante der Zelllinie.

CaCo2	DLD1	HCT116	HCT116*	HT29	LS174t	SW480
6,83	2,45	5,16	4,76	6,56	3,19	2,83
[5,69-8,22]	[2,08-2,89]	[3,92-6,79]	[4,03-5,63]	[4,69-9,18]	[2,19-4,67]	[2,23-3,58]



**Abbildung 7.8: Veränderte Zellmorphologie nach Inkubation mit CX-5461.** Kristallviolett-Färbungen von Zellen der Zelllinie HT29 nach 12 Tagen Inkubation mit  $0,5 \mu\text{mol/L}$  CX-5461. 10x Vergrößerung.



## Danksagung

Diese experimentelle Promotionsarbeit durfte ich in der Experimentellen Viszeralchirurgie der Chirurgischen Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Würzburg unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto bearbeiten. Herrn Prof. Dr. med. Christoph-Thomas Germer, Direktor der Chirurgischen Klinik I des Universitätsklinikums Würzburg, und Herrn Prof. Dr. med. Armin Wiegering danke ich für die Vergabe des Themas dieser Dissertation. An Herrn Prof. Dr. rer. nat. Harald Wajant geht mein Dank für die Unterstützung und die bereichernden wissenschaftlichen Gedanken. [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED] Den Mitarbeitern der Pathologie der Universitätsklinik Würzburg gebührt mein Dank für die Möglichkeit, einige Gerätschaften dort zu verwenden. Ein großer Dank geht außerdem an die Graduate School of Life Sciences Würzburg für die finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Promotionsstipendiums. Angebotene Kurse im Rahmen dieses Stipendiums waren außerdem sehr lehrreich.

[REDACTED]

[REDACTED]

Vor allem jedoch erreicht mein Dank Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto für die ausgezeichnete Betreuung während der Erarbeitung dieser Dissertation und der Kongressvorbereitungen. Zahlreiche Diskussionen hatten eine große Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten zur Folge. Seine Zuverlässigkeit, Geduld und Kommunikation machten das Gelingen dieser Arbeit erst möglich.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

## Eigene Publikationen

Maria Riedmeier, Boris Decarolis, Imme Haubitz, Sophie Müller, **Konstantin Uttinger**, Kevin Börner, Joachim Reibetanz, Armin Wiegering, Christoph Härtel, Paul G. Schlegel, Martin Fassnacht, Verena A Wiegering. Adrenocortical carcinoma in childhood - a systematic review. *Cancers*, 2021.

Johannes Diers, Philip Baum, Johanna Wagner, Harald Matthes, Sebastian Pietryga, Nicolas Baumann, **Konstantin Uttinger**, Christoph-Thomas Germer, Armin Wiegering. Hospital volume following major surgery for gastric cancer determines in-hospital mortality rate and Failure to Rescue: a nation-wide study based on German billing data (2009–2017). *Gastric Cancer*, 2021.

**K.L. Uttinger**, M. Hofmann, B. Pörsch, S. Gahn, M. Koospal, C.-T. Germer, A. Wiegering, C. Otto. Using Small-Molecule RNA Polymerase I inhibitor CX-5461 for Induction of Senescent-Like Phenotype in Colorectal Carcinoma Cells with Enhanced Response to Pro-Apoptotic Navitoclax. *Eur Surg Res* 2021;62. DOI: 10.1159/000518793. Digitale Posterpräsentation auf den 24. Chirurgischen Forschungstagen, 02.-03. September 2021 in Leipzig

**K. Uttinger**, C. Kastner, M. Hofmann, C. T. Germer, A. Wiegering, C. Otto. Targeting ribosomal RNA synthesis by RNA polymerase I (Pol I) inhibitor CX-5461 induces senescence in colorectal carcinoma (CRC) cells with enhanced response to Bcl-2 inhibitor Navitoclax. *Eur Surg Res* 2019;60. DOI: 10.1159/000502161. Posterpräsentation auf den 23. Chirurgischen Forschungstagen, 12.-14. September 2019 in Aachen.

Julius Dengler, Daniel Rüfenacht, Bernhard Meyer, Veit Rohde, Matthias Endres, Pavlina Lenga, **Konstantin Uttinger**, Viktoria Rücker, Maria Wostrack, Adisa Kursumovic, Bujung Hong, Dorothee Mielke, Nils Ole Schmidt, Jan-Karl Burkhardt, Philippe Bijlenga, Eduardo Boccardi, Christophe Cognard, Peter U. Heuschmann, Peter Vajkoczy. Giant intracranial aneurysms: natural history and 1-year case fatality after endovascular or surgical treatment. *Journal of Neurosurgery*, 2019.

# **Lebenslauf**

**Konstantin Lukas Uttinger**



---

Konstantin L. Uttinger

## Eidesstattliche Erklärung

Ich, Konstantin Lukas Uttinger, geb. am 18.11.1995 in Nürnberg, erkläre hiermit an Eides statt, die vorliegende Arbeit eigenständig verfasst zu haben. Insbesondere habe ich sie selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters angefertigt. Alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel wurden ordnungsgemäß zitiert und angegeben. Die hier erwähnten Daten wurden für keine anderen wissenschaftlichen Arbeiten außer der hier vorliegenden oder der genannten eigenen Veröffentlichungen verwendet; eine solche Verwendung ist insbesondere nicht für die Zukunft vorgesehen. Diese Dissertation hat bisher weder in gleicher noch ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegen; dies ist insbesondere auch nicht vorgesehen.

---

Ort, Datum

---

gez. Konstantin L. Uttinger

## Affidavit

I hereby confirm that my thesis is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis. The result of this work will not be used elsewhere than my own publications. Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

---

Place and date

---

Konstantin L. Uttinger