



Aus dem Institut für Pathologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Apoptoseinduktion  
in mutierten p53 kolorektalen Tumorzellen  
nach Kombinationsbehandlung  
mit 5-Fluorouracil und Thymoquinon**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Sylvia Morgenthal

aus Reichenbach

Magdeburg, September 2012

Dokumentationsblatt:

Bibliographische Beschreibung:

Morgenthal, Sylvia:

**Apoptoseinduktion in p53 mutierten kolorektalen Tumorzellen nach Kombinationsbehandlung mit 5-Fluorouracil und Thymoquinon**

2012; 71 Bl.; 40 Abbildungen; 2 Tabellen, 1 Anlage

Magdeburg, Medizinische Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität  
Dissertation

Kurzreferat:

Thymoquinon (TQ) ist die bioaktive Hauptkomponente des Schwarzkümmels (*Nigella sativa*). Bereits in diversen *in vivo* und *in vitro* Studien wurden seine antiinflammatorischen, antioxidativen und antineoplastischen Eigenschaften auf verschiedene humane Tumorzellen nachgewiesen. In der vorliegenden Dissertation wurden die antiproliferativen und proapoptotischen Effekte einer Kombinationsbehandlung von Thymoquinon und dem Standardchemotherapeutikum 5-Fluorouracil (5-FU) auf kolorektale Tumorzellen mit einer p53 Mutation untersucht. Eine Vorbehandlung der Zellen mit TQ zeigte in Kombination mit einer geringen 5-FU Dosierung vergleichbare bzw. bessere Effekte bezüglich der Reduzierung von mitochondrialer Aktivität sowie von Zellzahl und Kolonienbildung als eine höhere 5-FU Einzeldosis. Trotz vermehrter Proteinexpression von p53 und p21 kam es nicht zur Induzierung eines Zellzyklusarrestes. Zusätzlich konnte eine TQ-induzierte Herunterregulierung von Chk1 ermittelt werden. In der Kombinationsbehandlung konnte ein Anstieg der sub-G1 Phase festgestellt werden, der auf eine Apoptoseinduktion schließen lässt. Es fand sich zudem eine TQ-induzierte Herunterregulierung des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 und eine daraus folgende proapoptotische Modulierung der Bax/Bcl-2 Ratio. Des Weiteren wurde in der Kombinationsbehandlung eine TQ-vermittelte Spaltung des Proteins BID nachgewiesen, die zur Cytochrom c Freisetzung und Aktivierung der Procaspase-9 führte. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass TQ zu einer Chemosensibilisierung und Potenzierung der 5-FU vermittelten Apoptosemechanismen führt.

**Schlüsselwörter**

Kolorektales Karzinom, mutiertes p53, 5-Fluorouracil, Thymoquinon, Apoptose

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einführung</b>	<b>6</b>
<b>1.1. Das Kolorektale Karzinom</b>	<b>6</b>
1.1.1. Epidemiologie	6
1.1.2. Pathogenese und Pathologie	6
<b>1.2. Das Tumorsuppressorgen p53</b>	<b>8</b>
1.2.1. Die Eigenschaften des Tumorsuppressors p53	8
1.2.2. Über die Eigenschaften der p53- Mutation	9
1.2.3. Die „gain of function“ der p53-Mutation	11
<b>1.3. Die Eigenschaften des Chemotherapeutikums 5-Fluorouracil</b>	<b>12</b>
<b>1.4. Thymoquinon</b>	<b>13</b>
1.4.1. Die Eigenschaften von Thymoquinon	13
1.4.2. Die Effekte von Thymoquinon in Zellkultur und im Xenograft- Model	14
<b>1.5. Apoptose</b>	<b>16</b>
1.5.1. Allgemeines zur Apoptose	16
1.5.2. Die extrinsische Signalkaskade	17
1.5.3. Die intrinsische Signalkaskade	18
<b>1.6. Ziel der Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>21</b>
<b>2.1. Zelllinien</b>	<b>21</b>
<b>2.2. Zellkultur und Behandlung</b>	<b>21</b>
<b>2.3. Untersuchungsmethoden</b>	<b>22</b>
2.3.1. MTT-Test	22
2.3.2. Colony Formation Assay	23
2.3.3. Annexin-V-Test	24
2.3.4. Zellzyklusanalyse	25
2.3.5. Western Blot	26
<b>2.4. Statistische Analyse</b>	<b>28</b>
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>29</b>
<b>3.1. MTT-Test</b>	<b>29</b>
3.1.1. Die Effekte von Thymoquinon und 5-Fluorouracil in Einzel- und Kombinationsbehandlung auf kolorektale Karzinomzelllinien mit unterschiedlichem p53-Status	29
3.1.2. Vergleich der Auswirkungen der Kombinationsbehandlung II und der 5-FU Einzelbehandlung auf die metabolische Aktivität der Zelllinie HT29	33
<b>3.2. Colony Formation Assay</b>	<b>34</b>
<b>3.3. Annexin-V-FITC</b>	<b>36</b>
3.3.1. Zeitverlauf der TQ-Behandlung	36
3.3.2. Zeitverlauf der FU-Behandlung	37
3.3.3. Die Kombinationsbehandlungen	38
<b>3.4. Zellzyklus</b>	<b>39</b>

<b>3.5. Western Blot</b>	<b>42</b>
3.5.1. Zellzyklus: p53, p21 und Chk1	42
3.5.2. Aktivierung des extrinsischen Signalweges	44
3.5.3. Aktivierung des intrinsischen Signalweges	44
<b>4. Diskussion</b>	<b>46</b>
4.1. Die Auswirkungen einer Kombinationsbehandlung auf die Proliferation kolorektaler Tumorzellen mit unterschiedlichem p53-Status	46
4.2. Die Auswirkungen einer Kombinationsbehandlung auf den Zellzyklus	48
4.2.1. Der Einfluss von Thymoquinon auf die Proteinexpression von p53 und p21	49
4.2.2. Thymoquinon und Chk1	50
4.3. Die Auswirkungen einer Kombinationsbehandlung auf Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges	52
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>57</b>
<b>6. Veröffentlichungen</b>	<b>58</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>59</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>68</b>
<b>9. Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>69</b>
<b>10. Lebenslauf</b>	<b>70</b>
<b>11. Anlagen</b>	<b>71</b>
11.1. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	71

## Abkürzungsverzeichnis

5-FU:	5-Fluorouracil
Apaf-1:	apoptotic protease activating factor 1
APC:	adenomatous polyposis coli
CDK:	cyclin-dependent-kinase
CHEK1:	Checkpoint Kinase 1
CIMP:	CpG Insel Methylator Phänotyp
DED:	death effector domain
DISC:	death-inducing signaling complex
DMH:	dimethyl hydrazine
dTMP:	Thymidylat
ERK:	extracellular signal-regulated kinase
FADD:	Fas-associated death domain
FAP:	familiäre adenomatöse Polyposis
FdUDP:	Fluorodeoxyuridin-Diphosphat
FdUMP:	Fluorodeoxyuridine Monophosphat
FdUTP:	Fluorodeoxyuridine-Triphosphat
FUDP:	Fluorouridin-Diphosphat
FUDR:	Fluorodeoxyuridin
FUMP:	Fluorouridin-Monophosphat
FUTP:	Fluorouridine Triphosphat
HNPCC:	hereditäres, nicht-polypöses kolorektales Karzinom
JNK:	c-jun N-terminal kinase
MSI:	Mikrosatelliteninstabilität
mtp53:	mutiertes p53
MTT:	3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid
PMSF:	Phenylmethansulfonfluorid
ROS:	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffadikale
TK:	Thymidinkinase
TNF- $\alpha$ :	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TQ:	Thymoquinon
TS:	Thymidylatsynthase
wt:	Wildtyp

# 1. Einführung

## 1.1. Das Kolorektale Karzinom

### 1.1.1. Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom ist ein Sammelbegriff für alle malignen, epithelialen Primärtumore des Kolons. In den westlichen Industrienationen ist es bei Männern nach Lungenkrebs und bei Frauen nach Brustkrebs die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache. Pro Jahr sind 24/100000 Einwohner betroffen, wobei die meisten Patienten zwischen 50 und 70 Jahre alt sind. Nur 10% der kolorektalen Karzinome entstehen bei Patienten unter 40 Jahren.

Jahr	Alle Altersgruppen	
	Erkrankungsfälle/Sterbefälle	
	Männer	Frauen
2000	32 462/ 13 658	33 696/ 15 329
2001	33 261/ 13 420	33 766/ 14 947
2002	33 969/ 14 014	33 702/ 14 854
2003	34 599/ 13 991	33 512/ 14 598
2004	35 239/ 13 748	33 284/ 14 034
2005	35 835/ 13696	32 944/ 13 843
2006	36 305/ 13 756	32 438/ 13 469

Tabelle 1: Krebsentwicklung in Deutschland, Stand November 2010

Quelle: Robert-Koch-Institut, [www.rki.de](http://www.rki.de)

### 1.1.2. Pathogenese und Pathologie

Etwa 10% der Karzinome sind vererbt oder mit anderen Erkrankungen assoziiert. So weisen erstgradig Verwandte von Patienten mit einem Kolonkarzinom ein erhöhtes Erkrankungsrisiko auf. Auch Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen oder der eher seltenen FAP (familiäre adenomatöse Polyposis) oder dem hereditären, nichtpolypösen kolorektalen Karzinom (HNPCC), das autosomal dominant vererbt, zählen zur Risikogruppe.

Bestimmte Ernährungsgewohnheiten können sich tumorbegünstigend auswirken. Hierzu zählen vor allem gesättigte (tierische) Fette, hoher Eiweißgehalt, wenig Ballaststoffe, Nitrit- Pökelsalz, Chenodesoxycholsäure und Alkohol (Riede et al. 2004).

Eines der wichtigsten und fundamentalen Konzepte bezüglich der Entstehung des kolorektalen Karzinoms ist die Adenom-Karzinom-Sequenz, ein Begriff, der die schrittweise Progression vom normalen Epithel über dysplastisches Epithel bis hin zum Karzinom, verbunden mit der Akkumulation multipler genetischer Veränderungen, beschreibt (Leslie et al. 2002).

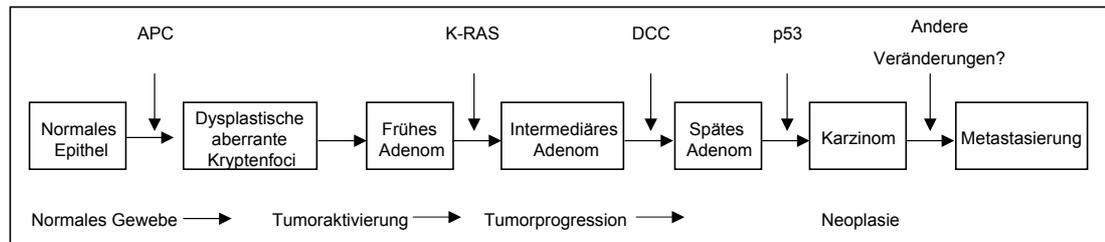


Abb.1: Adenom-Karzinom-Sequenz, adaptiert von Fearon und Vogelstein 1990

Fearon und Vogelstein beschrieben 1990 mit dem Tumorprogressions-Modell die molekularbiologischen Veränderungen bei der Karzinomentstehung. Hierbei wurden die Aktivierung von Onkogenen zusammen mit der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen als wesentliche Ereignisse in der Karzinogenese dargestellt. Darauf basierend folgten in den vergangenen 20 Jahren eine Vielzahl von Studien, die sich mit der Identifizierung der beteiligten Gene, den chromosomalen und genetischen Veränderungen eingehender auseinandersetzten und somit zu einem besseren Verständnis bezüglich der molekularen Signalwege des kolorektalen Karzinoms beigetragen haben.

Die Entstehung des kolorektalen Karzinoms ist ein mehrstufiger Prozeß, bei dem genetische und epigenetische Veränderungen in fortlaufender Weise kumulieren (Ogino et al. 2008).

Etwa 85% der sporadischen Tumore entwickeln sich über die klassische Adenom-Karzinom-Sequenz, wobei die häufigste Mutation das APC-Gen (adenomatous polyposis coli) betrifft (Tóth et al. 2011). APC wurde ursprünglich als Tumorsuppressorgen identifiziert, das die FAP verursacht. (Redston et al. 2001). Der Verlust der APC-Funktion führt zur Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin, das zusammen mit dem Transkriptionsfaktor TCF4 die Transkription von c-Myc und anderen tumorrelevanten Genen antreibt. Die direkte Aktivierung von  $\beta$ -Catenin durch eine Mutation führt zum ähnlichen Ergebnis und es wird angenommen, dass etwa 5% der kolorektalen Tumore auf diese Weise entstehen (Phelps et al. 2009).

KRAS ist ein Mitglied der Ras-Familie, kleine G-Proteine, die in intrazelluläre Signalwege involviert sind. KRAS Mutationen gehören zu den häufigsten onkogenen Veränderungen in Tumoren und kommen frühzeitig in der Karzinogenese kolorektaler Karzinome vor (Siddiqui et al. 2010). Punktmutationen in Codon 12, 13 oder 61 führen zur Stabilisierung von KRAS. Das aktivierte RAS Signal trägt zur onkogenen Transformation durch molekulare Signale bei, diese begünstigen die Zellproliferation, verhindern den Zelltod, inhibieren die zelluläre Differenzierung und induzieren Angiogenese (Chun et al. 2010).

Auch Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 spielen eine wesentliche Rolle in der Tumorgenese des kolorektalen Karzinoms. Hierauf wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

Eine andere molekulare Besonderheit, die kolorektale Karzinome aufweisen können, ist die sogenannte Mikrosatelliteninstabilität (MSI). Bei der MSI kommt es, im Vergleich zu normaler DNA, in Tumorzellen zu Längenveränderungen innerhalb kurzer, repetitiver DNA-Sequenzen. Die Ursachen für diese Längendifferenz sind ein oder mehrere Defekte in den DNA-Reparaturproteinen (DNA mismatch repair protein) (Tóth et al. 2011). Beim sporadischen MSI Tumor ist ein Defekt im DNA Reperaturgen MLH1 mit folgendem funktionellen Verlust die häufigste Ursache für eine Mikrosatelliteninstabilität. Im Gegensatz dazu können beim HNPCC irgendwelche Mutationen der Reparaturgene, wie MSH2, MHL1, MSH6 und PMS2, eine Mikrosatelliteninstabilität verursachen (Ogino et al. 2008).

Man grenzt die high und low frequency Mikrosatelliteninstabilität von der Mikrosatellitenstabilität ab, wobei darauf an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden soll.

Zusätzlich spielen auch epigenetische Veränderungen an spezifischen Promotern eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung. Von besonderer Bedeutung ist dabei die transkriptionelle Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch die Promoter CpG-Insel-Methylierung. Tatsächlich besitzen eine Reihe von kolorektalen Karzinomen Promotermethylierungen in verschiedenen Genen, die als CpG-Insel-Methylator Phänotyp (CIMP) bezeichnet werden. CIMP-positive kolorektale Karzinome weisen eindeutige klinische, pathologische und molekulare Charakteristika auf, wie die Assoziation mit einer proximalen Tumorklassifikation, mit dem weiblichen Geschlecht, der muzinösen und schlechten Tumordifferenzierung, der Mikrosatelliteninstabilität sowie einer hohen BRAF- und einer geringen p53-Mutationsrate (Ogino et al. 2006).

## 1.2. Das Tumorsuppressorgen p53

### 1.2.1. Die Eigenschaften des Tumorsuppressors p53

Das Tumorsuppressorgen p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der sich auf dem kurzen Arm des Chromosom 17 befindet und ein Molekulargewicht von 53 kDa aufweist. Die Tumorsuppressorfunktion von p53 basiert auf seiner Wirkung als potenter sequenzspezifischer Transkriptionsaktivator. Es reguliert spezifische Genexpressionen und führt dadurch zum Zellzyklusstop, zur DNA Reparatur und zur Apoptose. Zu den Genen, die durch p53 induziert werden, gehört auch der Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor p21WAF1 (p21), der die Zellteilung und viele Gene, die proapoptische Proteine kodieren, blockiert (Roger et al. 2010).

Unter normalen Umständen besitzt p53 eine eher kurze Halbwertszeit und kontrolliert seine eigene Aktivität mittels negativem Feedback-Mechanismus über die Transaktivierung der E3 Ubiquitin-Protein-Ligase Mdm2, diese vermittelt die Ubiquitinierung und proteasomale Degradation von p53 (Haupt et al. 1997, Kubbutat et al. 1997).

Das sogenannte p53 Netzwerk wird durch gestresste oder geschädigte Zellen aktiviert und verhindert über Inhibierung des Zellzyklus oder Induktion der Apoptose die Replikation. Anhand von diversen Untersuchungen wurden drei voneinander unabhängige Signalwege ermittelt, über die das p53 Netzwerk aktiviert wird:

1. DNA-Schäden, z.B. infolge von ionisierender Strahlung; es kommt zur Induzierung von zwei Proteinen: ATM (stimuliert durch Doppelstrangbrüche) und Chk2 (stimuliert durch ATM) (Carr et al. 2000).
2. Abnormale Wachstumssignale: Diese resultieren z.B. aus der Expression der Onkogene RAS und Myc, hierbei ist die p53-Aktivierung abhängig vom p14<sup>ARF</sup> Protein (Sherr et al. 2000, Lowe et al. 2000).
3. Chemotherapeutika, ultraviolettes Licht und Proteinkinaseinhibitoren involvieren Kinasen wie ATR und Casein Kinase II (Meek et al. 1999).

Über diese Mechanismen wird die Degradation von p53 verhindert und somit das Protein in einer hohen Konzentration stabilisiert. Dadurch ist es in der Lage seine Hauptfunktion auszuführen: die Bindung an bestimmte DNA Sequenzen und die Aktivierung der Expression (Transkription) angrenzender Gene. Diese Gene führen dann– direkt oder indirekt– zur Apoptose oder zum Zellzyklusstop (Vogelstein et al. 2000).

Im Zentrum des p53 Proteins befindet sich die DNA-Bindungsdomäne, mit der es an spezifische DNA-Sequenzen binden und somit die Transkription angrenzender Gene aktivieren kann. Die so kontrollierten Gene lassen sich formal in 4 Kategorien einordnen:

1. Zellzyklusinhibition:  
p53 stimuliert direkt die Expression des Proteins p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, einen Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen (cyclin-dependent-kinase, CDKs), die Schlüsselregulatoren im Zellzyklus sind. p21 hemmt außerdem den Übergang von der G1- zur S-Phase und von der G2-Phase zur Mitose (Ohki et al. 2000). In epithelialen Zellen stimuliert p53 die Expression von 14-3-3 $\sigma$  und führt somit über die Bildung des cyclinB1-CDK1-Komplexes zum G2-Block (Chan et al. 1999, Laronge et al. 2000).
2. Apoptose:  
Verschiedene Mediatoren von p53 können die Apoptose induzieren. So kann p53 den Promotor von Bax, ein Protein der Bcl-2 Familie, transaktivieren. Bei einer Überexprimierung von Bax kommt es zur Induktion der Apoptose (Reed et al. 1999). Auch Proteine, die Gemeinsamkeiten mit dem klassischen Todesrezeptor TNF und Fas haben, werden aktiviert (Lin et al. 2000).
3. Genetische Stabilität
4. Hemmung der Angiogenese

Durch diese verschiedenen Fähigkeiten und Funktionen wird dem p53 Protein eine Schlüsselrolle als Tumorsuppressor zugeschrieben (Vogelstein et al. 2000).

Eine weitere wichtige Bedeutung besitzt p53 bei der Induzierung der Apoptose durch die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale an den Mitochondrien (Johnson et al. 1996). Die p53-abhängige Apoptose involviert die Depolarisation des mitochondrialen transmembranen Potentials ( $\Delta\Psi_m$ ) und die ROS-Bildung, die als kritische Komponenten des p53-vermittelten programmierten Zelltodes angesehen werden. Der Abfall von  $\Delta\Psi_m$  zählt dabei zum frühesten Ereignis in apoptotischen Zellen und führt zur Freisetzung von Cytochrom c und AIF (apoptosis inducing factor) aus den Mitochondrien ins Zytoplasma (Lee 1998).

Polyak et al. wiesen in einer Studie nach, dass p53 transkriptionell spezifische Subpopulationen von Genen, wie Oxidoreduktasen, aktiviert, lange bevor morphologische oder biochemische Hinweise auf eine Apoptose vorliegen. Die Proteine, die durch diese Gene kodiert werden, führen kollektiv zu einem Anstieg des ROS-Gehaltes, der wiederum die Mitochondrien schädigt. Der Ausstrom von Kalzium und proteinösen Komponenten stimuliert die Caspasen. Anhand dieses Ablaufs wurde postuliert, dass p53 über einen dreistufigen Prozess zur Apoptose führt:

1. Transkriptionelle Induktion Redox-regulierter Gene
2. Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS)
3. Oxidative Degradierung von mitochondrialen Komponenten (Polyak et al. 1997)

### 1.2.2. Über die Eigenschaften der p53- Mutation

In über 50% aller Tumorzellen liegt eine Mutation von p53 (mutantp53, mtp53) vor. Dadurch sind die oben beschriebenen Hauptfunktionen von p53 in erheblichem Maße gestört. Neben der Entstehung und Progression von Tumoren resultieren daraus auch Therapieresistenzen (Vogelstein et al. 2000, Voudsen et al. 2002, Huang et al. 2009). Darüber hinaus besitzen einige p53 Mutationen neuartige

onkogene Funktionen, die sogar die Tumorprogression durch spezifische Regulierung der Tumordinvasion begünstigen (Kastan et al. 2007).

Basierend auf ihrem Einfluss auf die Struktur und Funktion von p53, können die p53 Mutationen in 2 Klassen unterteilt werden: DNA-Kontaktmutationen und strukturelle Mutationen, die zu einer Konformationsänderung führen. Es existieren 4 sogenannte hotspot Mutationen an Stelle 175, 248, 249 und 273, wobei R273H eine Kontaktmutation ist. Alle hotspot Mutationen heben die Wildtyp Tumorsuppressorfunktion von p53 auf (Liu et al. 2010).

Über 75% der p53-Mutationen sind sogenannte Missense-Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne, die zur Expression eines stabilen p53 Proteins mit Standardgröße führen (Hussain et al. 1998, Ying et al. 2006). Das ist in soweit ungewöhnlich, da die meisten Tumorsuppressorgene oft durch einen Frameshift oder eine Nonsense-Mutation inaktiviert werden, wodurch es entweder zur Produktion eines verkürzten Proteins oder zur kompletten Eliminierung der korrespondierenden Genprodukte kommt (Weisz et al. 2007). Die Stabilisierung des mutierten p53-Proteins erklärt sich durch das Verschwinden p53-induzierter Proteine, die normalerweise für die Degradierung von p53 verantwortlich sind (Blagosklonny et al. 2000). So führt die fehlende Rückkopplung von Mdm2 zu einer deutlichen Überexprimierung von mtp53 in Tumorgewebe (Haupt et al. 1997, Kubbutat et al. 1997).

Missense-Mutationen führen zum Verlust der Tumorsuppressorfunktion und zur Akkumulation des mutierten p53-Proteins, das selbst auch onkogene Eigenschaften und somit selektive Vorteile für die Karzinogenese besitzt. *In vitro* Studien zeigten, dass eine Reihe von p53-Mutationen die normale p53-Funktion inhibieren können, mutierte Proteine neue abnormale Funktionen besitzen sowie die verschiedenen Mutationen in ihrer Onkogenität variieren (Sigal et al. 2000). Korrespondierend mit den Ergebnissen aus experimentellen *in vivo* und *in vitro* Modellen zum Überlebensvorteil der Tumorzellen mit mtp53, zeigten die Analysen von klinischen Daten bezüglich Mamma- und Kolonkarzinomen, dass Patienten mit bestimmten Missense-p53-Mutationen zu einer schlechteren Prognose und einer höheren Chemotherapieresistenz tendieren, als diejenigen, die überhaupt kein p53-Protein exprimieren (Soussi et al. 2001).

An myeloischen Zellen konnte gezeigt werden, dass mutiertes p53 die Wildtyp p53-induzierte Apoptose inaktivieren und sogar die Wildtyp p53-unabhängige Apoptose blockieren kann (Peled et al. 1996). Zudem konnte gezeigt werden, dass eine p53 Mutation Zellen vor Induktoren der Apoptose, wie Chemotherapie, TNF- $\alpha$  und Vitamin D schützt (Blandino et al. 1999, Weisz et al. 2007, Stambolsky et al. 2010). Eine weitere zentrale tumorfördernde Eigenschaft ist die Fähigkeit von Tumoren lokales Gewebe zu infiltrieren und Metastasen zu bilden. So zeigte sich bei mutiertem p53 eine erhöhte Aktivierung des EGFR/Integrin Signallweges und somit eine Förderung der Zellmigration und Invasion (Muller et al. 2009).

Ein weiteres bedeutendes Charakteristikum maligner Zellen ist deren Fähigkeit Angiogenese zu induzieren, um den wachsenden Bedarf der Tumormasse bezüglich Nährstoffen und Sauerstoff anzupassen. Auch hier besteht eine enge Korrelation zwischen der Expression von mutiertem p53 und der VEGF-Expression sowie der Aggressivität der Tumore (Tian et al. 2006, Famulski et al. 2006).

Unterschiedliche Zelllinien können unterschiedlich auf die Expression eines mtp53 Proteins reagieren. So können Tumore mit einer *Missense*-Mutation aggressiver sein und eine schlechtere Prognose haben, als Tumore, die gar kein p53 besitzen. Ein mutiertes p53 Protein kann also die zelluläre Genexpression ändern, die verschieden ist von der des Wildtyp-Proteins (Dittmer et al. 1993).

Eine Mutation in der Aminosäure 273, bei der die Wildtyp-Konformation zu 98% beibehalten wird, besitzt nur einen schwachen dominant-negativen Effekt (Sigal et al. 2000).

### 1.2.3. Die „gain of function“ der p53-Mutation

Unter den Tumorsuppressorgenen ist p53 einzigartig, da seine Veränderung nicht einfach zum Funktionsverlust des Produkts führt, sondern auch eine Reihe an Mutationen entwickelt, die einen „gain of function“ Phänotyp aufweisen (Godai et al. 2009). So fand man zum Beispiel heraus, dass bei Mäusen, die ein null Allel und ein mutiertes Allel des p53-Gens tragen (R172H oder R270H) im Vergleich zu p53-null Mäusen völlig neuartige Tumore bilden. Desweiteren zeigte sich bei embryonalen Mausfibroblasten von mutierten Mäusen mit Homozygotie in R172H eine erhöhte Zellproliferation, DNA-Synthese sowie ein erhöhtes Transformationspotential. Demzufolge scheint es, dass die „gain of function“ abhängig ist von der Fähigkeit des mutierten p53 spezifische Zielgene, wie c-Myc, Fas und NF- $\kappa$ B2, zu transaktivieren oder zu reprimieren (Lang et al. 2004, Olive et al. 2004, Yan et al. 2010).

Zum Verständnis der mtp53 vermittelten „gain of function“ wurden zwei Modelle vorgeschlagen:

Zum einen bewirkt die verstärkende Funktion eine inhibitorische Interaktion mit den Mitgliedern der p53-Familie, p63 und p73, wodurch diverse tumorsuppressive Eigenschaften von p63 und p73 blockiert werden und so die Karzinogenese gefördert wird (Moll et al. 2001, Irwin et al. 2003, Lang et al. 2004, Olive et al. 2004). Es zeigte sich, dass mtp53 einen dominant-negativen Effekt auf die Mitglieder der p53-Familie ausübt. So beeinträchtigt es die durch p73 vermittelte Apoptose, die Wachstumshemmung sowie die Transaktivierung von p21 (Di Como et al. 1999, Marin et al. 2000, Strano et al. 2000).

Beim zweiten Modell wird dem mtp53 eine direkte onkogene Rolle durch Expressionsregulierung spezifischer Gene zugesprochen. Als erstes wurde hierbei das MDR 1 (multidrug resistant 1)-Gen identifiziert, das für die Begünstigung der Chemotherapieresistenz von Tumoren bekannt ist und dessen Promoter durch mtp53 hochreguliert wird (Chin et al. 1992). Dies führte zur Hypothese, dass diese transkriptionelle Aktivierung von MDR 1 einen Mechanismus der onkogenen Funktion von mtp53 darstellt.

Studien zeigten, dass diverse p53-Mutationen die Expression von Genen hochregulieren können, die in verschiedene zelluläre Prozesse der Karzinomprogression eingebunden sind, wie Wachstumsregulation, Metabolismus, Angiogenese, Medikamentenresistenz und genomische Instabilität. So zeigte sich für die 273H p53 Mutation u. a. eine erhöhte Expression von EGFR (Ludes-Meyers et al. 1996) und IGF-I-R (Werner et al. 1996).

Das mtp53 kann nicht nur Gene transaktivieren, sondern auch die Transkription anderer Gene reprimieren bzw. negativ regulieren, wie z. B. CD95/Fas/Apo1, ein Gen das für einen Todesrezeptor kodiert, der in die apoptotische Signalkaskade eingebunden ist (Zalcenstein et al. 2003). Diese Runterregulierung von CD95/Fas/Apo1 könnte teilweise die beschriebenen antiapoptotischen Effekte von mtp53 bedingen. Andere Gene wiederum, die mittels mtp53 hochreguliert werden, führen zur Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli, wie EGR1 (Weisz et al. 2004).

Von besonderem Interesse ist der Effekt von mtp53 auf den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, der eine wichtige Rolle bei der Übertragung des antiapoptotischen Status in den verschiedenen humanen Tumorarten spielt. Eine Überexprimierung von mtp53

zeigt eine gesteigerte Aktivität von NF- $\kappa$ B und bewahrt die Zellen vor dem chemotherapieinduzierten Tod (Scian et al. 2004). Desweiteren kann mtp53 die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch den Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) erhöhen und verlängern. Diese Beobachtung ist von großem Interesse, da dieser Mechanismus stark in die Tumorgenese einbezogen ist, besonders im Zusammenhang mit chronischen Entzündungen (Weisz L. et al. 2007).

Weiter unbeantwortet bleibt die Frage nach den molekularen Mechanismen, durch die das mtp53 Protein, das seine Fähigkeit zur sequenzspezifischen DNA-Bindung verloren hat, die Expression von Genen reguliert. Die eine Möglichkeit wäre, dass es direkt spezifische Elemente in der DNA erkennt. Die andere, dass mtp53 durch eine Protein-Protein-Interaktion mit ein oder mehr sequenzspezifischen DNA-Bindungsproteinen an Chromatin gebunden ist (Weisz et al. 2007).

### 1.3. Die Eigenschaften des Chemotherapeutikums 5-Fluorouracil

Der Antimetabolit 5-FU ist seit über 50 Jahren die Kernsubstanz in der Therapie des kolorektalen Karzinoms. Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium führt eine modulierte Therapie mit Folsäure zu einer Ansprechrate von nur 20-25%. Bemühungen die Effektivität zu verbessern führten zu Kombinationen von 5-FU mit dem Topoisomeraseinhibitor Irinotecan sowie Oxaliplatin mit einer verbesserten Ansprechrate von 40 bis 50%. Trotz dieser Verbesserungen erleidet die Mehrheit der Patienten, die zunächst auf diese Therapie ansprechen, ein Rezidiv mit einer mittleren Überlebenszeit von nur 22 bis 24 Monaten ( Proutski et al. 2009).

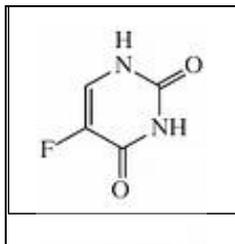


Abb. 2: Strukturformel 5-Fluorouracil, Quelle: Wikipedia

5-FU ist eine sogenannte Prodrug, die nach Konversion in den Metaboliten Fluorodeoxyuridine-Monophosphat (FdUMP) die Thymidylatsynthase (TS) hemmt. Die Thymidylatsynthase ist ein essentielles Enzym für die *de novo* Synthese von Thymidylat (dTMP), einem Vorläufer für die DNA-Synthese. Die Inhibition der TS stellt einen wichtigen Mechanismus der 5-FU vermittelten Zytotoxizität dar (Plasencia et al. 2003). Dabei kommt es durch den so entstandenen Thyminmangel zu DNA-Schäden und schließlich zum Zelltod. Dieser sogenannte Thyminmangel-Tod wird in Kolonkarzinomzellen über den Fas-Rezeptor reguliert (Petak et al. 2000).

Ein zweiter Metabolit von 5-FU, das Fluorouridine Triphosphat (FUTP), wird in die RNA eingebaut und führt zur Synthese defekter bzw. anormaler RNA (Sobrero et al. 1997). Der Einbau des 5-FU Metaboliten Fluorodeoxyuridine-Triphosphat (FdUTP) in die DNA während der Synthesephase führt zur Fehlkodierung, dem sogenannten miscoding, und schließlich zum Zelltod (Van Triest et al. 2000).



ökonomischen Aspekts relativ günstig und gut verfügbar (Gali-Muhtasib et al. 2004a).

Der Schwarzkümmel (*Nigella sativa*) ist eine vor allem im Mittelmeerraum und im mittleren Osten weit verbreitete Pflanze und stellt in den Ländern dieser Regionen einen wichtigen Bestandteil der Nahrung dar. Ihr werden gesundheitsfördernde und krankheitsprotektive Eigenschaften zugeschrieben. Traditionell wird sie bei einer Reihe von Erkrankungen auch als natürliches Heilmittel eingesetzt, wie Asthma bronchiale, Bluthochdruck, Diabetes, Entzündungen, Husten, Bronchitis, Kopfschmerzen und Ekzemen. Die sehr geringe Toxizität des Samens und des Öls der Pflanze wurde bereits in diversen Studien nachgewiesen (Ali et al. 2003).



Abb. 4: Pflanze und Samen des Schwarzkümmels (black seed),  
Quelle: Md. Aminur Rahman; wikimedia commons

Das volatile Öl des Schwarzkümmels enthält eine Reihe von bioaktiven Substanzen, wobei Thymoquinon (TQ) mit einem Anteil von etwa 54% die Hauptkomponente darstellt.

*In vivo* und *in vitro* Studien haben gezeigt, dass TQ antiinflammatorische, antioxidative und antineoplastische Effekte besitzt (Gali-Muhtasib et al. 2006).

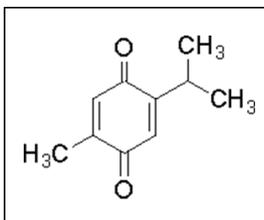


Abb. 5: Strukturformel TQ, C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>, Molekulargewicht: 164.2

Die signifikante antineoplastische Aktivität von TQ wurde bereits bei (multi-drug-resistenten) humanen Pankreasadenokarzinomen, Uterussarkomen und Leukämiezelllinie nachgewiesen, dem eine minimale toxische Wirkung auf normale Zellen gegenübersteht (Worthen et al. 1998). Im Tiermodell sowie in der Zellkultur zeigten sich antioxidative und antiinflammatorische Effekte (Mansour et al. 2002).

#### 1.4.2. Die Effekte von Thymoquinon in Zellkultur und im Xenograft- Model

Die Inhibition des Zellzyklus und die Triggerung der Apoptose stellen wichtige Komponenten in der Tumorbehandlung dar. Bei vielen Chemotherapeutika erfolgt dies über eine Aktivierung p53-abhängiger Mechanismen.

In diversen Studien wurde bereits die Rolle von TQ bei der Apoptose von Tumorzellen untersucht. So konnte in HCT116 Zellen (humane Kolonkarzinomzellen) ein p53-abhängiger Mechanismus bei der Induktion der Apoptose gezeigt werden, der über einen deutlichen Anstieg von p53 und p21<sup>WAF1</sup> sowie einer signifikanten Inhibition des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 vermittelt

wird. Zusätzlich führt ein G1/S-Phasearrest zur Inhibition des Zellwachstums. Diese Effekte von TQ sind zeit- und dosisabhängig. In der gleichen Studie zeigten hingegen p53-null HCT116 Zellen nur eine geringe Sensitivität auf die TQ-induzierte Apoptose (Gali-Muhtasib et al. 2004a).

In einer weiteren Studie wurden Wildtyp- und null-p53 kolorektale Tumorzelllinien untersucht und ein Zusammenhang zwischen Thymoquinon und der Checkpoint Kinase 1 (CHEK1), einem wichtigen Transducer für DNA-Schäden, beschrieben. Die Untersuchungen zeigten, dass es nach TQ-Behandlung zur Bindung von p53 an den CHEK1 Promoter und im weiteren Verlauf zur Inhibierung von CHEK-1, einer verstärkten Caspase-3 Aktivität und Apoptoseinduktion kam. Dieser Mechanismus ist p53-abhängig. *In vivo* Untersuchungen an humanen Tumorzellen mit einem mutierten p53 ergaben einen signifikant höheren Gehalt an CHEK1 mRNA sowie Proteinen und somit im Vergleich zu wtp53-Kolonkarzinomen eine geringere Caspase-3 Aktivität (Gali-Muhtasib et al. 2008a).

Mutationen in Genen, die für die Apoptose verantwortlich und entscheidend sind, führen im klinischen Alltag zu einer vermehrten Resistenz von Tumorengewebe gegenüber herkömmlichen Chemotherapeutika (Lowe et al. 2000). Vor allem der Tumorsuppressor p53 zählt zu den am häufigsten mutierten Genen in Tumorzellen. Neben Therapieresistenzen bedingt dies auch die Entstehung von Tumorgewebe (Gali-Muhtasib et al. 2004a).

In einer Studie von Roepke et al. an Osteosarkomzellen konnte ein p53-unabhängiger Mechanismus für die TQ-induzierte Apoptose ermittelt werden. Hierbei zeigte sich, dass TQ durch oxidativen Stress zu einem Schaden an der Mitochondrienmembran führt und daraus eine Aktivierung des intrinsischen Apoptosemechanismus resultiert. Die Untersuchung der aus Rattenlebern isolierten Mitochondrien ergab, dass TQ konzentrationsabhängig die Bildung mitochondrialer  $O_2^-$  Radikale induziert. Dieser Effekt wird durch zwei wichtige Eigenschaften von TQ erklärt:

1. seiner hohen Löslichkeit in der Lipidschicht der inneren Mitochondrienmembran
2. seiner Fähigkeit zusammen mit der oxidierten, semireduzierten und reduzierten Form von TQ ein Redoxpaar zu bilden.

Dies deutet daraufhin, dass in die innere Mitochondrienmembran eingebautes TQ ähnlich agiert wie Ubiquinon, ein mobiler Elektronenträger der mitochondrialen Atmungskette. Der TQ-induzierte mitochondriale Apoptoseweg wird mit seiner Eigenschaft, oxidativen Stress in Mitochondrien zu steigern, begründet.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass eine Behandlungskonzentration von 40  $\mu$ M TQ bei Osteosarkomzellen mit einem mutierten p53 (MNNG/HOS) nach 48h zu einem Anstieg der Zellpopulation in der subG1-Phase auf 31% sowie zu einem G2/M-Arrest führt. Es ließ sich eine verminderte Expression von Bcl-2 sowie eine leichte Verstärkung der p21-Expression im Western Blot nachweisen. Dies könnte auf einer noch vorhandenen transkriptionellen Aktivität von mtp53 auf das Zielgen p21 beruhen. Eine andere Erklärung wäre, dass die Hochregulation von p21<sup>WAF1</sup> p53-unabhängig vermittelt wird.

Bei p53-null Osteosarkomzellen (MG63) kam es nach der TQ-Behandlung zu einem Abfall von p21<sup>WAF1</sup> und Bcl-2. Das führte aufgrund des entstandenen DNA-Schadens zu einem Checkpoint Ausfall und in der Konsequenz zur Apoptose. In diesen Zelllinien wurde zudem ein signifikanter Anstieg der Bax/Bcl-2 Ratio ermittelt (Roepke et al. 2007).

Ein p53-unabhängiger Apoptosemechanismus wurde auch in einer Studie mit p53-null HL-60 Zellen (myeloblastische Leukämiezellen) festgestellt. Dabei führte TQ zeit- und dosisabhängig zu einer Aktivierung von Caspase-8 und weiterer Caspasen, wie Caspase-9 und Caspase-3 führte. Die Untersuchungen ergaben, dass Caspase-8 durch Verminderung des mitochondrialen antiapoptotischen Proteins Bcl-2 die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien bedingt. Zudem bewirkt TQ eine Veränderung der Bax/Bcl-2 Ratio, ein Ereignis, das ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Cytochrom c Freisetzung spielt. Diese Effekte lassen auf eine Involvierung der Mitochondrien bei der TQ-vermittelten Apoptose schließen (El-Mahdy et al. 2005).

In humanen Papillomazellen wurde der antiproliferative Effekt durch einen G1-Arrest vermittelt, der mit einem Anstieg von p16 assoziiert war. Diese p16 Modulation ist bedeutsam, da sie die Tumorsensitivität gegenüber Chemotherapeutika erhöht (Gali-Muhtasib et al. 2004b).

Beim Prostatakarzinom führt die TQ-Behandlung zu einer Inhibierung des hormonrefraktären Tumors durch Beeinflussung des Androgenrezeptors und des Transkriptionsfaktors E2F (Kaseb et al. 2007).

Beim Wachstum von soliden Tumoren spielt die Angiogenese eine wichtige Rolle, nicht nur bezüglich der Versorgung der Tumorzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen, sondern auch als Wegbereiter für metastatische Absiedelungen. Yi et al. zeigten in einer Studie, dass TQ ein effektiver Inhibitor der endothelialen Zellmigration, -invasion und -proliferation ist, vor Angiogenese *in vivo* und *in vitro* schützt und die Tumorangiogenese und das Tumorstadium *in vivo* vermindert. Dabei vermittelt TQ die Inhibition der Angiogenese/Tumorangiogenese durch die Supprimierung des AKT/ERK Signalweges (Yi et al. 2008).

In diversen Studien wurden die Antitumoreffekte bereits am Tiermodell überprüft und nachgewiesen. In einem Xenograft-Modell mit humanen HCT116 Kolonkarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass es bei der Behandlung von Mäusen mit TQ zu signifikant weniger sowie kleiner ausgebildeten Adenomen kam im Vergleich zur Behandlung mit der karzinogenen Substanz (DMH, dimethylhydrazine). Die neu gebildeten Karzinome wiesen zudem eine bessere Differenzierung auf. Die Versuchstiere zeigten in dieser Studie eine gute Toleranz gegenüber TQ, das allgemein als Indikator für eine geringe Toxizität der Substanz aufgefasst wurde (Gali-Muhtasib et al. 2008b).

## 1.5. Apoptose

### 1.5.1. Allgemeines zur Apoptose

Die Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, stellt einen wichtigen Mechanismus für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase dar. Der Begriff wurde erstmals von Kerr et al. 1972 geprägt und beschreibt einen komplexen, genetisch gesteuerten Prozess mit charakteristischen morphologischen Merkmalen, wie Veränderungen der Zellmembran mit Bläschenbildung, auch *membran blebbing* genannt, mit Zellschrumpfung, mit Kondensation des Chromatins und einer Fragmentierung der DNA. Im weiteren Verlauf zerfällt die Zelle in membranumschlossene apoptotische Körperchen, die von Nachbar- oder Fresszellen eliminiert werden. Die resorbierten Vesikel werden durch Lysozyme biochemisch aufgeschlossen und so die Reste der abgestorbenen Zelle vollständig wieder gewonnen. Alle apoptotischen Komponenten sind in wachsenden Zellen vorhanden und können durch eine Reihe von Stimuli aktiviert werden (Renehan et al. 2001).

Apoptose ist ein genetisch festgelegter Mechanismus, der über verschiedene molekulare Wege ausgelöst werden kann. Man unterscheidet:

1. den extrinsischen Signalweg, der über den Todesrezeptor getriggert wird
2. den intrinsischen Signalweg, der über die Mitochondrien vermittelt wird (Schulze-Bergkamen et al. 2009).

Die Caspase Aktivierung stellt ein zentrales Ereignis bei der Ausführung der Apoptose dar und kann über beide Mechanismen eingeleitet werden. Caspasen sind Aspartat-spezifische Cysteiny-Proteasen, die als inaktive Vorstufen in den Zellen vorliegen. Aktive Caspasen kommen als Tetramere vor, die aus zwei Heterodimeren bestehen und somit zwei aktive Zentren besitzen. Die Aktivierung der Caspasen kann über verschiedene Stimuli erfolgen und führt zum Ablauf des apoptotischen Programms (Shi et al. 2002).

Die Proteine der Bcl-2 Familie spielen eine Schlüsselrolle in der Apoptose. Bcl-2 selbst ist ein *prosurvival* Protein. Eine abnorme Expression ist verbunden mit einer Vielzahl verschiedener Tumore (Shankar et al. 2008). Das Bcl-2 Protein befindet sich an der äußeren Mitochondrienmembran und verhindert multiple Apoptose-signale, wie die Depolarisation von mitochondrialem  $\Delta\Psi_m$  (Susin et al. 1996) und die ROS-Produktion (Kane et al. 1993). Der Mechanismus, über den Bcl-2 hierbei agiert, ist nicht ganz geklärt, basiert aber anscheinend auf der Regulierung und Bildung von Ionenporen in der äußeren Mitochondrienmembran (Reed et al. 1997, Schendel et al. 1997).

Bax ist ein lösliches Zytosolprotein, das Konformationsänderungen durchlaufen und transmembrane Kanäle in der Außenmembran der Mitochondrien bilden kann. Dadurch wird diese permeabel, und es kommt zur Freisetzung von einer Reihe an Proteinen, wie Cytochrom c. Dadurch wird die ausführende Phase der Apoptose getriggert (Lin et al. 2011). Die Fähigkeit von Bax, Poren zu bilden oder mit porenbildenden Proteinen auf der Ebene der Mitochondrienmembran zu interagieren, kann durch Bcl-2 antagonisiert werden (Cotter 2009).

### 1.5.2. Die extrinsische Signalkaskade

Die Apoptose über den Todesrezeptor-Signalweg basiert auf der Aktivierung des Fas-Rezeptors. Fas, auch APO-1 oder CD95 genannt, gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren und ist der Hauptsignalweg bei der Induktion der Apoptose (Raisova et al. 2001). TNF-Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer konservierten intrazellulären Domäne (auch *death domain* genannt), die aus 80 Aminosäuren aufgebaut ist.

FasL, der Fas Ligand, bindet an Fas und induziert die Vernetzung von Fas Molekülen an der Zelloberfläche. Dadurch wird das apoptotische Signal in die Zelle übertragen und die Apoptose eingeleitet. Fas induziert die Polymerisation von FADD (Fas-associated death domain), diese aktiviert mittels der death effector domain (DED) die Caspase-8, C-FLIP und Caspase-10 um den death-inducing signaling complex (DISC) zu bilden (Yang et al. 2011).

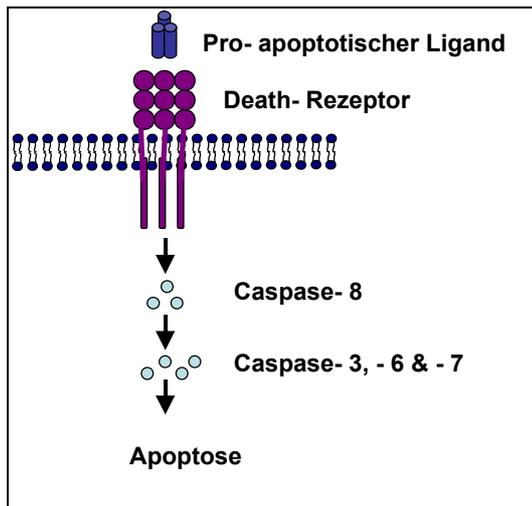


Abb. 6: Todesrezeptor-(extrinsischer) Signalweg, modifiziert nach Ashkenazi 2002

### 1.5.3. Die intrinsische Signalkaskade

Beim intrinsischen Signalweg kommt den Mitochondrien eine entscheidende Bedeutung zu. Die Apoptoseinduktion wird durch Veränderungen im Mitochondrien-Membranpotential ausgelöst. Verschiedene proapoptotische Stimuli führen so zur Freisetzung von Cytochrom c in das Cytosol, dies gilt als zentrales Ereignis bei der Apoptose. Cytochrom c bindet an das Adaptermolekül apoptosis protease-activating factor-1 (Apaf-1), der Apaf-1/Cytochrom c Komplex führt zur Aktivierung der Caspase-9, diese startet die nachgeschaltete Prozessierung von Caspasen (Raisova et al. 2001, Hosokawa et al. 2005).

Cytochrom c befindet sich normalerweise im inneren Mitochondrienraum und dient dort als Elektronenträger in der Atmungskette. Daher ist die mitochondriale Membranpermeabilisierung ein wichtiges Ereignis und verantwortlich für die Caspase Aktivierung im intrinsischen Signalweg. Die mitochondriale Membranpermeabilisierung kann auch ohne Caspasenaktivierung zum Zelltod führen. Dieser Caspase-unabhängige Tod entsteht durch einen irreversiblen Verlust der mitochondrialen Funktion sowie durch die mitochondriale Freisetzung von Caspase-unabhängigen Todeseffektoren, wie AIF, Endonuklease G und anderen (Kroemer et al. 2007).

Die Freisetzung von Cytochrom c wird durch das Verhältnis Apoptose-fördernder und Apoptose-inhibierender Bcl-2 Proteine in der Außenmembran der Mitochondrien bedingt. Dabei wirken die Effekte von Bcl-2 (antiapoptotisch) und Bax (proapoptotisch) gegensätzlich. Ein Missverhältnis in der Bax/Bcl-2 Ratio kann hier zur Verschiebung in Richtung Überleben führen und Tumorzellen resistenter gegen eine Reihe von Apoptosestimuli werden lassen, wie Chemotherapeutika, Bestrahlung, Hypoxie oder dem Entzug von Wachstumsfaktoren. Die erhöhte Resistenz gegenüber dem Zelltod, die auf einer gestörten Balance der Bax/Bcl-2 Ratio basiert, könnte auch für bestimmte Tumorzelleigenschaften verantwortlich sein, wie der Tumorzellinvasion, der Zelladhäsion oder dem Metastasierungspotential (Raisova et al. 2001).

Der mitochondriale Apoptoseweg kann durch die anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie blockiert werden. Sie können die Cytochrom c Freisetzung aus den Mitochondrien sowie die Bindung von Cytochrom c an Apaf-1 verhindern.

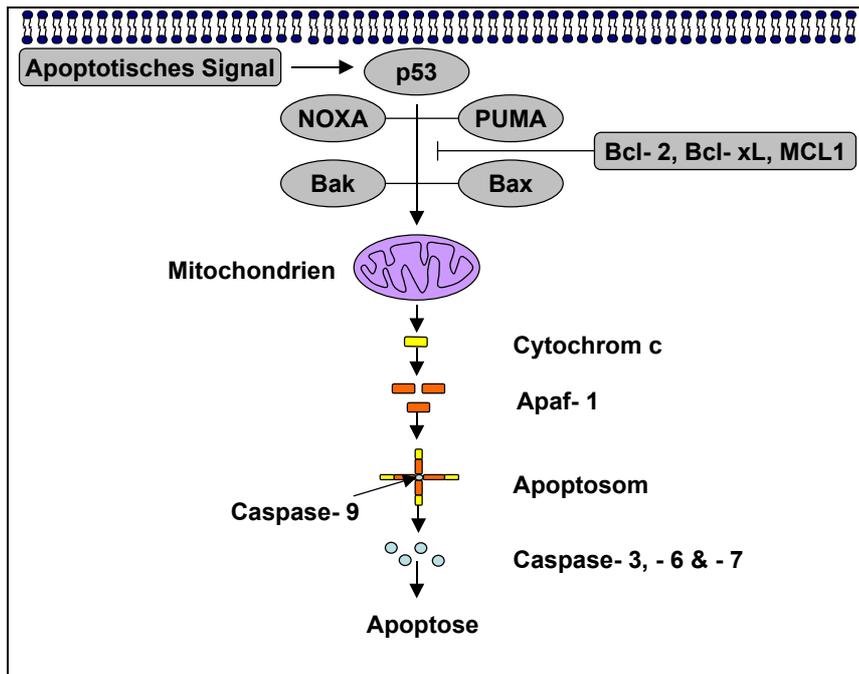


Abb. 7: Mitochondrialer- (intrinsischer) Signalweg, modifiziert nach Ashkenazi, 2002

Auch über den Todesrezeptor-Signalweg kann es zur Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges kommen. Dabei kommt es durch die Aktivierung der Caspase-8 zur Spaltung des zur BH3 Familie gehörenden Mitgliedes BID. Dieses transloziert zu den Mitochondrien und führt dort unter anderem zur Cytochrom c Freisetzung und Aktivierung der Caspase-9 (Shankar et al. 2008).

Somit ist eine exakte Trennung beider Signalwege nicht möglich.

## 1.6. Ziel der Arbeit

Das Kolonkarzinom zählt in den westlichen Industrienationen zu den zweithäufigsten tumorbedingten Todesursache. Über 50% der humanen Tumore tragen eine Mutation im Tumorsuppressorgen p53. Klinisch führt dies häufig zur Tumorprogression, Metastasierung und Resistenzbildung. 5-FU gehört, allein oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika, zur Standardtherapie des Kolonkarzinoms. Allerdings ist das Ansprechen auf die Behandlung in den meisten Fällen unzureichend. Resistenzentwicklungen und Tumorrezidive zählen zu den mittel- und langfristigen therapeutischen Problemen. Zusätzlich besitzen chemotherapeutische Substanzen ein toxisches, z. T. therapielimitierendes Potential und schädigen potentiell auch die DNA gesunder Zellen. Daher besteht seit langem ein großes Interesse an wirkungsvollen und nicht toxischen Substanzen, um die gegenwärtigen chemotherapeutischen Behandlungsstrategien zu verbessern. Dabei sind Kombinationsbehandlungen aufgrund der oftmals verschiedenen genetischen Defekte in Tumorzellen von besonderer Bedeutung.

In der vorliegenden Studie wurde die Effizienz einer Kombinationsbehandlung, bestehend aus den Wirksubstanzen 5-Fluorouracil (5-FU) und Thymoquinon (TQ), auf Kolonkarzinomzellen mit einem mutierten p53 untersucht. Die zentrale Fragestellung dabei war, ob mittels dieser Behandlungsmodalität eine wirksame Inhibition der Zellproliferation sowie eine Reduktion der 5-FU-Dosierung im Vergleich zu einer Einzelbehandlung mit 5-Fluorouracil erreicht werden kann. Durch das kombinierte Behandlungsregime sollte zum einen die notwendige Konzentration und somit das Ausmaß potentiell toxischer und schädigender Nebenwirkungen von 5-FU effektiv reduziert werden. Zugleich sollte ein vergleichbarer oder sogar besserer messbarer Einfluss auf die Kolonkarzinomzellen erreicht werden. Dabei wurde eine Zelllinie untersucht, die aufgrund einer p53 Mutation bekanntermaßen resistent ist gegenüber einer Reihe von Chemotherapeutika.

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurden zunächst Untersuchungen bezüglich Vitalität und Proliferation der Zellen anhand verschiedener Konzentrations- und Zeitkonzepte durchgeführt. Die weiterführenden Versuchsanordnungen fokussierten auf die Ermittlung des Effektes auf die Apoptose und den Zellzyklus. Im letzten Schritt sollten schließlich die zugrundeliegenden molekularen Wirkmechanismen auf Proteinebene eingehender untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden drei humane Kolonkarzinomzellen verwendet: HCT116 wt (+/+p53) von ATCC® (American Type Culture Collection), Nummer: CCL-247, HCT116 null (-/-p53) von INSERM, Lyon, France sowie HT29 von ATCC®, Nummer HTB-38.

Die humane kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie HT29 stammt ursprünglich vom Primärtumor einer 44-jährigen kaukasischen Frau mit einem kolorektalen Adenokarzinom aus dem Jahr 1964. Hierbei handelt es sich um eine epitheliale, adhären wachsende Zelllinie, deren Tumorsuppressorgen p53 eine G→A Mutation in Codon 273 trägt, daraus resultiert eine Arg→His Substitution.

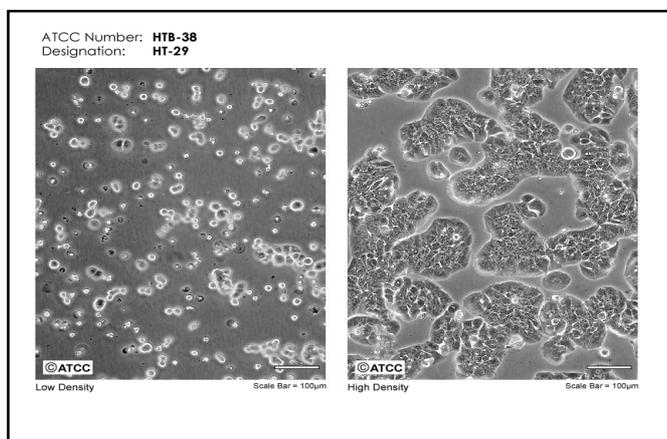


Abb. 8: HT29 Zellen in Kultur

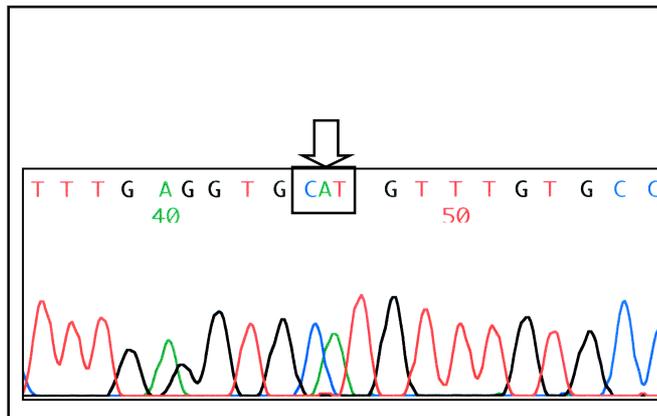


Abb. 9: Mutationsstatus HT29

### 2.2. Zellkultur und Behandlung

Die HT29 und HCT116 wt Zellen wurden jeweils in RPMI 1640 (Gibco, Germany) und die HCT116 null Zellen in DMEM (Gibco, Germany) unter Zusatz von Penicillin (100U/ml) (Gibco, Germany), Streptomycin (100µg/ml) (Gibco, Germany) und 10%igem fetalen Kälberserum (Gibco, Germany) kultiviert. Das Zellwachstum erfolgte bei 37°C im Brutschrank bei 5%igem CO<sub>2</sub>-Anteil und 95%iger Raumluft. Die Zellen wurden alle 4 bis 7 Tage, je nach Konfluenz, subkultiviert. Hierfür wurden die Zellen nach dem Entfernen des Mediums und einmaligem Waschen mit PBS mittels

Trypsin EDTA (1.250) (PAA Laboratorie, Germany) von der Platte gelöst, mit Nährmedium aufgenommen und in neue Kulturflaschen umgesetzt. Alle 2 bis 3 Tage erfolgte ein Wechsel des Mediums. Das Wachstum wurde mikroskopisch kontrolliert.

Für die Versuchsansätze wurden die Zellen mit Trypsin gelöst und in 10ml Kulturmedium aufgenommen. 500µl dieser Zellsuspension wurden in 9,5ml isotonische Lösung pipettiert und mit Hilfe des Zellcounters die Zellzahl pro ml bestimmt. Gemäß der jeweiligen Versuchsanordnung wurden die Zellen in entsprechender Zellzahl ausgesät. Nach 24h wurde der Überstand entfernt, nicht adhärenzte Zellen mittels PBS abgewaschen und die Behandlung gestartet.

Für die verwendeten Substanzen wurden Stammlösungen hergestellt. Von 5-Fluorouracil (5-FU) (Axxora) wurden 10mg/ml in DMSO, von Thymoquinon (TQ) (ACROS Organics, Geel Belgium)) 10mg/ml in Methanol gelöst. Die Kontrollen erhielten frisches Kulturmedium. Für die Einzellsbstanzversuche wurden jeweils 1µM, 5µM & 10µM 5-Fluorouracil bzw. 20µM bzw. 40µM Thymoquinon in Nährmedium gelöst. Für die Kombinationsversuche wurden die Zellen mit TQ für 24h vorbehandelt, anschließend erfolgte die Zugabe von 5-FU für weitere 24 bzw. 48h.

## 2.3. Untersuchungsmethoden

### 2.3.1. MTT-Test

Der MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid)-Test gilt als sensitive, genaue, schnelle und ökonomisch günstige Methode zur indirekten Messung der Zellproliferation und ist weit verbreitet zur Untersuchung und Beurteilung der Effekte von Antitumormedikamenten.

Das Prinzip dieses Verfahrens basiert auf der Fähigkeit des mitochondrialen Enzyms Succinatdehydrogenase den gelben, wasserlöslichen Farbstoff Diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) in ein violettes, wasserunlösliches Produkt (MTT-Formazan) umzuwandeln, das weitgehend impermeabel ist und in den gesunden Zellen akkumuliert. Durch Zugabe verschiedener Detergenzien kann die Zellmembran permeabel werden und es zur Freisetzung des Kristalls kommen, das löslich ist. Die Menge an entstandenem Formazan ist proportional zur Anzahl der vorhandenen lebenden Zellen und somit auch ein Maß für die zytotoxische Wirkung der zu untersuchenden Substanz. Die Farbe kann quantitativ bestimmt werden durch einen einfachen Colorimetric Assay. Das Ergebnis kann mittels eines multiwell scanning Spektrophotometers (ELISA reader) abgelesen werden.

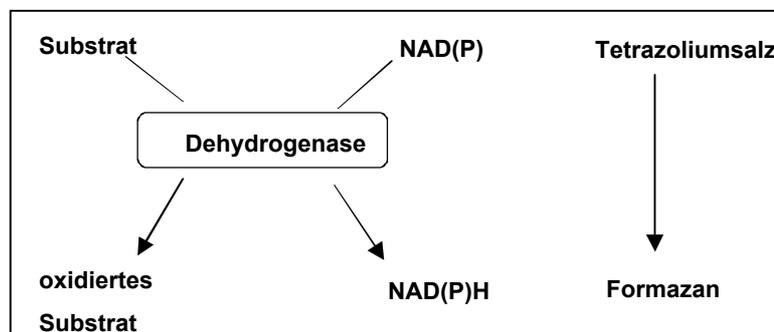


Abb. 10: Prinzip des MTT- Assay

Für die Untersuchungen wurden die HCT116 wt Zellen in einer Dichte  $1,0 \times 10^4$ , die HCT116 null Zellen in einer Dichte von  $1,5 \times 10^4$  und die HT29 Zellen in einer Dichte von  $2,5 \times 10^4$  Zellen in einer 96well Mikrotiterplatte angesetzt. Nach der Anhaftung über Nacht erfolgte die Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Konzen-

trationen für 5-FU (1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M) und TQ (20 $\mu$ M, 40 $\mu$ M). Für die entsprechenden Kombinationsbehandlungen wurden die Zellen zunächst mit TQ (20 $\mu$ M und 40 $\mu$ M) für 24h vorbehandelt und anschließend 5-FU (1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M) für weitere 24h bzw. 48h zugegeben. Alle Untersuchungen wurden in 4-fach Bestimmung durchgeführt und mindestens zweimal zu unterschiedlichen Zeiten wiederholt.

Nach Abschluss der jeweiligen Behandlungszeit wurde in jedes well 10 $\mu$ l der MTT-Lösung (5mg MTT-Salz [Sigma] in 1ml PBS gelöst) zugegeben und die Platten für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Der Überstand wurde sorgfältig abpipettiert und das MTT Formazanprodukt mittels 100 $\mu$ l DMSO/well gelöst. Die Messung der Absorption erfolgte bei 570nm in einem Mikroplatten Reader.

### 2.3.2. Colony Formation Assay

Der Colony Formation Assay ist eine anerkannte Methode zur Untersuchung der Überlebensfähigkeit von Zellen sowie der Fähigkeit von Zellen zur Koloniebildung. Bei diesem Testverfahren wachsen Zellen *in vitro* in sogenanntem semisoliden Agar. Viele normale Zellen zeigen das Phänomen der Adhärenz, d. h. Zellwachstum und -teilung ist nur möglich, wenn sie an einem soliden inerten Material, wie der Plastikoberfläche von Kulturflaschen, anhaften. Außerdem stoppen sie ihr Wachstum, wenn sie in Kontakt miteinander kommen, auch Kontaktinhibition genannt. Abnorme bzw. transformierte Zellen zeigen diese Eigenschaften nicht. Sie können unabhängig von der Matrix wachsen und Zellkolonien bilden. Mit dem Colony Formation Assay kann zudem die Sensitivität von humanen Tumorzellen nach *in vitro* Manipulation mit antineoplastischen Substanzen beurteilt und eine Voraussage über die Tumorantwort auf Chemotherapeutika getroffen werden.

Um festzustellen, ob die proapoptotische Funktion von 5-FU, TQ sowie deren Kombination ebenfalls einen Effekt auf das *in vitro* Tumorwachstum der HT29 Zellen ausübt, wurde der Soft Agar Colony Formation Assay durchgeführt.

In jede Kulturplatte wurde eine Basisschicht aus 1,5ml Nährmedium RPMI 1640 (10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin) und 0,5%iger Agarose eingebracht. Auf diese Untergrundschrift wurden pro Platte jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen in 1,5ml Nährmedium und unter Zusatz von 0,35%iger Agarose aufgetragen. Der oberen Zellschicht wurden die zu untersuchenden Substanzen in entsprechender Konzentration und Kombinationsanordnung zugesetzt (TQ: 40 $\mu$ M; 5-FU: 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M; TQ + 5-FU: 40 $\mu$ M + 1 $\mu$ M). Die Beobachtung der Koloniebildung erfolgte über 14 Tage, wobei den Zellen jeden 2. Tag 0,2ml Nährmedium zugesetzt wurde. Nach 14 Tagen wurden die Zellen mit 0,005%iger Kristallviolett-Lösung gefärbt und mittels Digitalkamera unter dem Invert-Mikroskop (Nikon) visualisiert.

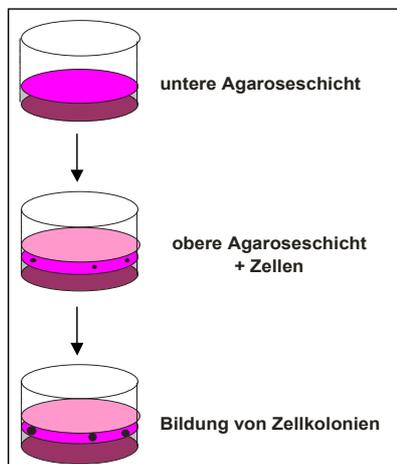


Abb. 11: Versuchsaufbau Colony Formation Assay

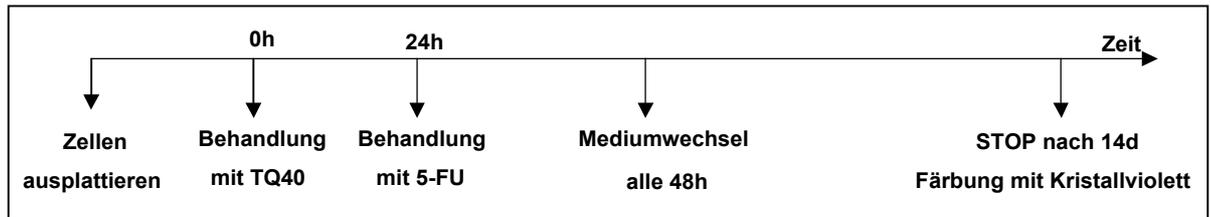


Abb. 12: Zeitverlauf Colony Formation Assay

### 2.3.3. Annexin-V-Test

Der Annexin-V-Fluos Test dient der Differenzierung von Zellen in die Kategorien: lebende, apoptotische, nekrotische, apoptotische und nekrotische (Doppelfärbung) Zellen.

Das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) befindet sich bei lebenden Zellen auf der Innenseite der Zellmembran. In apoptotischen Zellen kommt es frühzeitig zur Translokation von PS auf die Außenseite der Membran. Annexin-V ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges Phospholipid-bindendes Protein das spezifisch an Phosphatidylserin bindet. Der Nachweis von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche dient daher dem Nachweis von Apoptose.

Da auch bei nekrotischen Zellen aufgrund der permeabilisierten Zellmembran Annexin-V gebunden werden kann, erfolgt eine Gegenfärbung mit Propidiumjodid (PI). PI färbt nur die DNA von toten Zellen. Zellen, die sowohl mit Annexin-V als auch mit Propidiumjodid angefärbt werden, sind tot, wobei sie durch Apoptose oder Nekrose abgestorben sein können. Diejenigen, die nur mit Annexin-V angefärbt sind, befinden sich im Prozess der Apoptose. Zellen, die sich nur mit PI anfärben, sind durch Nekrose gestorben.

Durch die durchflusszytometrische Analyse am FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg) können die apoptotischen Zellen mittels Zweiphasenparameteranalyse als PI-negative und Annexin-V-positive Zellen detektiert werden. Die Auswertung der Durchflusszytometrie-Analyse erfolgte mit Hilfe des Programms CellQuest Pro.

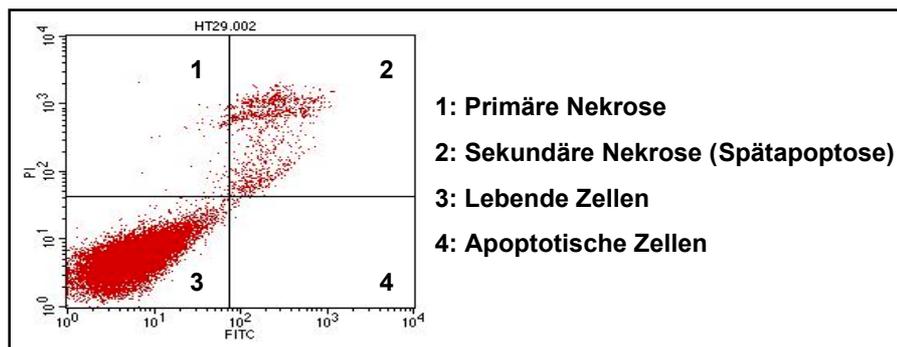


Abb. 13: Beispielabbildung Annexin-V-Fluos

Für die Untersuchung wurden  $3,5 \times 10^6$  Zellen je 100mm Kulturschale angesetzt. Nach 24h erfolgte die entsprechende Substanzenbehandlung. Nach abgeschlossener Inkubationszeit wurden die Zellen mittels Trypsin von der Kulturschale gelöst. Der Überstand, das PBS, das zum einmaligen Waschen genutzt wurde, das Trypsin sowie die gelösten Zellen wurden in einem Falcon-Röhrchen gesammelt. Aus dieser Suspension wurde mittels Zellcounter eine definierte Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen entnommen und bei 200g für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das entstandene Zellpellet mit 100 $\mu$ l des Annexin-V-Fluos-Staining Kit (Roche) resuspendiert und im Dunkeln für 15 Minuten bei Raum-

temperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung im FACSscan (Becton Dickinson, Heidelberg).

### 2.3.4. Zellzyklusanalyse

Die Regulation des Zellzyklus spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Organismen, aber auch bei der Entstehung von Tumoren. In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen der Dysregulation von Zellzyklusprozessen und der Entstehung und Progression von Tumoren gibt. Daher sind die komplexen Abläufe, die den Zellzyklus regulieren und beeinflussen, Gegenstand intensiver Forschung.

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, mit dem der DNA-Gehalt von Zellen gemessen werden kann. Mit dem speziellen Farbstoff Propidiumjodid (PI) wird die nukleäre DNA angefärbt. Mit einem Laser wird der gebundene Farbstoff zum fluoreszieren angeregt. Die Intensität der Fluoreszenz einer Zelle ist proportional zu ihrem DNA-Gehalt. Somit kann die Färbung zur Analyse des DNA-Gehalts, des Zellzyklusstatus einzelner Zellen oder Zellpopulationen mittels Durchflusszytometer bestimmt werden. Außerdem lässt sich ermitteln, ob eine Zellpopulation stark proliferiert oder in einer Zellzyklusphase blockiert wird.

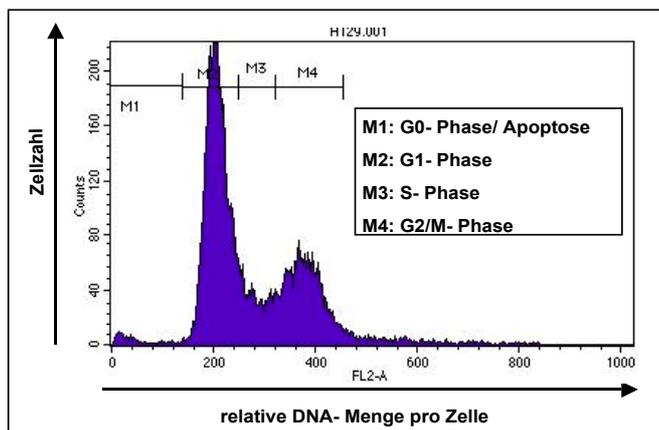


Abb. 14: Zellzyklusanalyse mit der Flow Cytometrie

Die G1/G0-Phase ist die Zeitspanne zwischen der letzten mitotischen Teilung und dem Beginn der DNA-Synthese. Zu diesem Zeitpunkt weist die Zelle einen einfachen diploiden DNA-Gehalt auf. In der sich anschließenden Synthese (S)-Phase wird die DNA repliziert, dadurch kommt es zu einem kontinuierlichen Anstieg bis letztlich ein doppelter diploider DNA-Gehalt vorliegt. Dadurch nimmt die Fluoreszenzintensität zur G2-Phase hin zu. Während der G2-Phase werden mitotisch aktive Enzyme in der Zelle synthetisiert, postreplikative Reparaturmechanismen laufen ab. Die DNA-Menge bleibt bei diesem Prozess konstant. In der sich anschließenden Mitose-Phase teilt sich die Zelle in zwei diploide Tochterzellen.

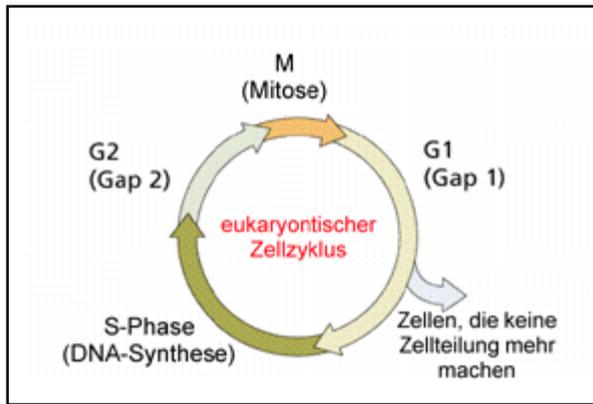


Abb. 15: Zellzyklusphasen

Ein typisches Merkmal von apoptotischen Zellen ist die Fragmentierung von chromosomaler DNA in kleine Bruchstücke durch die enzymatische Verdauung der DNA zwischen den Histonproteinen. Auch der Zellkern wird bei der Apoptose fragmentiert. Diese Bruchstücke können von der Zelle freigesetzt werden. Bei der Färbung wird nun ein DNA-Gehalt beobachtet, der geringer ist als bei einer normalen Zelle in der G1-Phase. Dies wird als sub-G1-Phase bezeichnet.

Für diese Untersuchung wurden  $3,5 \times 10^6$  Zellen je 100 mm Kulturschale angesetzt und entsprechend behandelt. Nach abgeschlossener Inkubationszeit wurden die Zellen mittels Trypsin von der Kulturschale gelöst. Der Überstand, das PBS, das zum einmaligen Waschen genutzt wurde, das Trypsin sowie die gelösten Zellen wurden in einem Falcon-Röhrchen gesammelt. Anschließend wurde die Zellzahl auf  $1 \times 10^6$  Zellen eingestellt und die Zellsuspension bei 750U/min für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Zellpellet in 200µl PI-Lösung (BD Biosciences) sorgfältig resuspendiert. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten im Dunkeln und auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte die Messung im FACSscan (Becton Dickinson, Heidelberg).

### 2.3.5. Western Blot

Diese Untersuchungsmethode dient der Identifikation und Quantifizierung spezifischer Proteine in komplexen Proteingemischen. Dabei können einzelne Proteine aus Virus-Präparationen, Gesamt-Zell-Protein oder Gewebe-Lysaten nachgewiesen werden. Durch ein senkrecht angelegtes elektrisches Feld können die in einer Polyacrylamidmatrix fokussierten Proteine unter Beibehaltung ihrer Auftrennung eluiert und auf eine Membranoberfläche transferiert werden. Hierbei dient die Membran als sogenanntes „Interface“ zur weiteren Analytik der Proteine. Durch diese Kombination von elektrophoretischer Trennung komplexer Proteinextrakte und anschließender Fixierung auf einer Membran, können mittels Antikörpern weitere Untersuchungen erfolgen. Es wurden  $3,5 \times 10^6$  Zellen je 100mm Kulturschalen angesetzt. Nach abgeschlossener Inkubationszeit wurden die Zellen von der Platte geschabt und zusammen mit dem zum Spülen genutzten PBS in ein Falcon- Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde dann für 10 Minuten bei 4°C bei 5000U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 10ml PBS resuspendiert und erneut unter oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit PBS gewaschen und in ein 2ml Eppendorfröhrchen pipettiert. Die Suspension wurde 10 Minuten bei 4°C und 12000U/min zentrifugiert, der Überstand sorgfältig abpipettiert und das Eppendorfröhrchen mit dem Zellpellet sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend in einer -80°C Truhe aufbewahrt.

Um Proteine zu detektieren, müssen sie aus den Zellen extrahiert werden. Hierfür wurde dem Lysispuffer (Calbiochem), Protease-Inhibitor-Cocktail Set III (Calbiochem) (10µl/ml) und Phenylmethansulfonfluorid (PMSF) zugefügt. Mit diesem Gemisch wurde das Zellpellet resuspendiert bis eine muköse Konsistenz erreicht wurde. Die Zellen wurden auf Eis lysiert und alle 10 Minuten gevortext über einen Gesamtzeitraum von 60 Minuten. Die Proteine wurden danach noch mit 10-15 Ultraschallimpulsen bearbeitet und wieder in die -80°C Truhe gegeben.

Um eine gleiche Proteinmenge von allen Proben zu gewährleisten, wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt und eine Eichreihe mit BSA (Roth) erstellt. Die BSA Reihe wurde in aufsteigender Konzentration gewählt (0,0mg; 0,1mg; 0,25mg; 0,5mg; 1,0mg; 1,5mg; 2,0mg; 3,0mg). Jeweils 5µl der Standardreihe sowie der Proben wurden als Doppelbestimmung in eine 96 well Platte pipettiert, dann je 25µl Reagenzgemisch (20µl Reagenz S in 1ml Reagenz A) zu gegeben sowie 200µl Reagenz B (Bio Rad Laboratories, CA). Die Proben in der Platte wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Tischschüttler gut durchgemischt und die Proteinkonzentration mit dem Bio-Rad DC Protein Assay (BioRad Laboratories, Hercules, CA) bei einer Wellenlänge von 630nm bestimmt.

Jeweils 30µg der Proben wurden in 3%iges Sammelgel pipettiert und in 12%igem Trenngel bei 50mA elektrophoretisch aufgetrennt.

In einem Blot-Sandwich wurden die Proteine im sogenannten Tank-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran (Schleisser and Schuell, Germany) über Nacht bei 30V geblottet. Um das Blot-Ergebnis zu verifizieren, wurde die Membran mit Ponceau-Rot (Sigma, Germany) angefärbt und anschließend mit TBS wieder ausgewaschen. Die Membran kam dann über Nacht für 4°C in Blockpuffer.

Es erfolgte zunächst die Inkubation mit dem Primär- und anschließend mit dem Sekundärantikörper. Die Visualisierung des Ergebnisses erfolgte mit Chemilumineszenz (Millipore, USA).

<b>Primär-AK</b>	<b>Verdünnungsfaktor Primär-AK</b>	<b>Inkubationszeit</b>	<b>Sekundär-AK</b>	<b>Verdünnungsfaktor Sekundär-AK</b>
β-Actin (Sigma)	1:20.000	2h RT (Raumtemperatur)	anti-mouse	1:30.000
Bcl-2 (Cell Signaling)	1:2.000	4°C ü. N. (über Nacht)	anti-rabbit	1:10.000
Bax (Dako Cytomatin)	1:500	4°C ü. N.	anti-rabbit	1:10.000
p21 <sup>WAF1</sup> (Santa Cruz Biotech)	1:500	4°C ü. N.	anti-mouse	1:30.000
p53 (Calbiochem)	1:50	2h RT	anti-mouse	1:30.000
Caspase-3 (Cell Signaling)	1:1.000	4°C ü. N.	anti-rabbit	1:10.000
Caspase-8 (Cell Signaling)	1:1.000	4°C ü. N.	anti-mouse	1:30.000

Caspase-9 (Cell Signaling)	1:1.000	4°C ü. N.	anti-rabbit	1:10.000
BID (Cell Signaling)	1:1.000	4°C ü. N.	anti-rabbit	1:10.000
Cytochrom c (BD Biosciences)	1:125	4°C ü. N.	anti-mouse	1:20.000
H2AX (Cell Signaling)	1:2.000	2h RT	anti-mouse	1:30.000

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Antikörper (AK)

Nach der Detektion wurde die Chemilumineszenz von der Membran gewaschen und die Antikörper mit Strippinglösung (Thermo Scientific Rockford, IL, USA) von der Membran entfernt (anti-mouse Sekundär-Antikörper: 10 Minuten bei Raumtemperatur; anti-rabbit Sekundär-Antikörpern: 15 Minuten bei 37°C).

## 2.4. Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten wurde das Programmsystem SPSS Version 20 verwendet. Zunächst erfolgte eine deskriptive Beschreibung der Untersuchungsgrößen. Zum Vergleich der quantitativen Daten wurden Mittelwertsvergleiche in Form von t-Test für unabhängige Stichproben gerechnet. Die dargestellten Graphen zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei verschiedenen Versuchsansätzen. Der Student t-Test wurde eingesetzt, um die statistische Signifikanz zwischen der 5-FU Einzelbehandlung und der Kombination zu berechnen. Als Signifikanzniveau bei den statistischen Tests wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  (alle p-Werte  $<0,05$  als signifikant) angenommen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. MTT-Test

Bei der Ermittlung zeit- und dosisabhängiger Effekte von Substanzen auf Zelllinien ist der MTT-Test die Standardmethode. Bei diesem Verfahren wird die metabolische (mitochondriale) Aktivität der Zellen nach Behandlung gemessen. Mit dieser Untersuchungsmethode ist es möglich, relativ günstig und mit einem angemessenen Aufwand ein breites Spektrum verschiedener Konzentrationen und Zeitspannen zu untersuchen und auszuwerten. Auf dieser Grundlage kann in weiteren, weitaus aufwendigeren Untersuchungen der Fokus auf ausgewählte Behandlungsmodalitäten gelegt werden.

Zunächst untersuchten wir die Auswirkungen verschiedener Konzentrationen, Zeitintervalle und Kombinationsvarianten auf die metabolische Aktivität der Zelllinien HCT116 wt, HCT116 null und HT29. Dabei sollte neben der Ermittlung der optimalen Behandlungsmodalitäten zur effektivsten Reduktion auch der Einfluss des p53-Status untersucht werden.

##### **3.1.1. Die Effekte von Thymoquinon und 5-Fluorouracil in Einzel- und Kombinationsbehandlung auf kolorektale Karzinomzelllinien mit unterschiedlichem p53-Status**

In den Einzelbehandlungen wurden die Zellen mit 20µM sowie 40µM Thymoquinon für Inkubationszeiten von 24h, 48h und 72h behandelt. Bezüglich der Substanz 5-Fluorouracil wurden Konzentrationen von 5µM und 10µM gewählt, die Behandlungsdauer lag hier bei 24h bzw. 48h.

In den Untersuchungen der Kombinationsbehandlungen erfolgte zunächst eine Behandlung und 24stündige Präinkubation der Zellen mit 20µM bzw. 40µM TQ. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5µM bzw. 10µM 5-FU für weitere 24h (Kombination I) bzw. 48h (Kombination II).

Die HCT116 wt Zelllinie besitzt ein Wildtyp p53-Protein. In den Einzelbehandlungen zeigt 5-FU eine stärkere Reduktion der mitochondrialen Aktivität im Vergleich zu TQ. Nach einer Behandlungsdauer von 48h erreicht sie sowohl für 5µM als auch für 10µM 5-FU ihr Maximum bei annähernd 20%, somit beträgt die Reduktionsrate 80%.

Bei einer Behandlung mit TQ kommt es auch zu einer Verminderung der mitochondrialen Aktivität, wobei hier beide Faktoren- höhere Konzentration und längere Inkubationszeit- von Bedeutung sind.

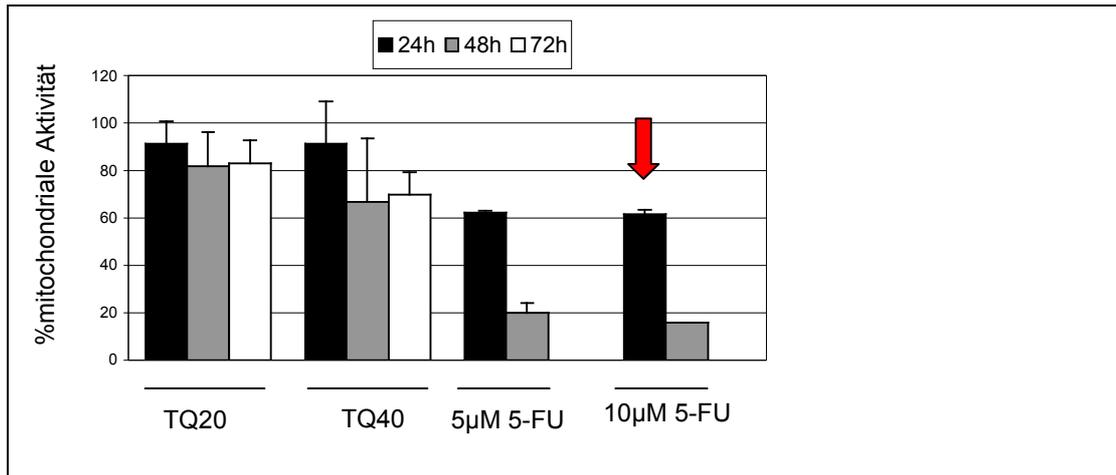


Abb. 16: HCT116 wt, mitochondriale Aktivität, Einzelbehandlung

Bei der Kombination beider Substanzen zeigt sich für HCT116 wt die stärkste Reduktion der mitochondrialen Aktivität in der Kombination I (schwarze Balken). Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt in der Kombination von 5-FU mit 40µM TQ. Hierbei ist bezüglich 5µM 5-FU eine 69%ige und für 10µM 5-FU sogar eine 73%ige Reduktion zu verzeichnen. In diesen Behandlungsmodalitäten ist die Kombination einer Einzelbehandlung mit 5-FU überlegen. Während die mitochondriale Aktivität nach Einzelbehandlung der Zellen mit 10µM 5-FU nach 24h 61,5% beträgt, liegt sie in der Kombination mit einer um die Hälfte reduzierte Dosierung- nämlich 5µM 5-FU- sogar bei 31% (siehe roter Pfeil). Diese, den 5-FU Einzelbehandlungen überlegenen Effekte, sind bei der Zelllinie HCT116 wt lediglich in der Kombination von 40µM TQ mit 5-FU und für eine Behandlungsdauer von insgesamt 48h (24h Präinkubation mit TQ, Zugabe von 5-FU und Inkubation für weitere 24h) zu beobachten.

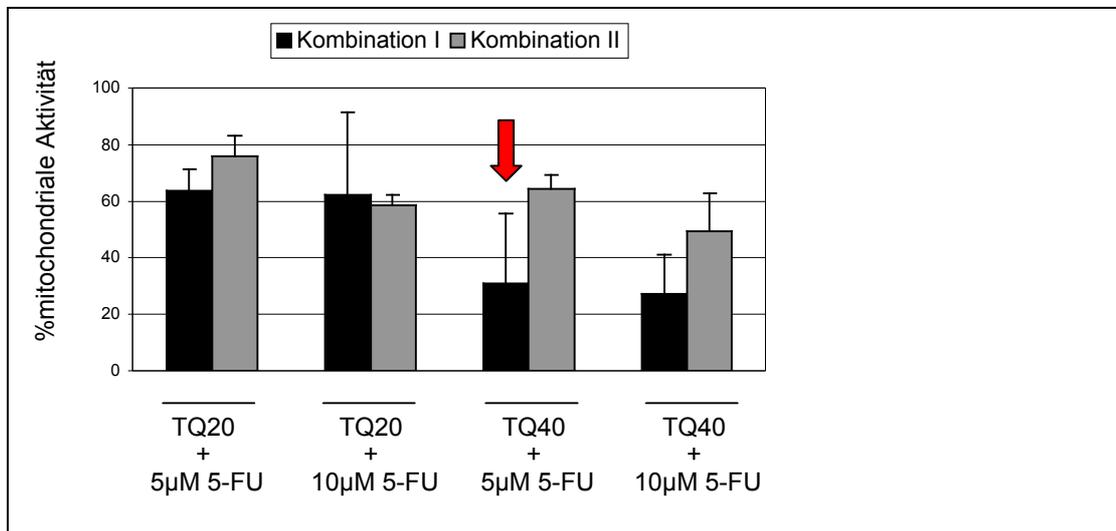


Abb. 17: HCT116 wt, mitochondriale Aktivität, Kombinationsbehandlungen

Bei der Zelllinie HCT116 null, die kein p53 Protein aufweist, sind die Effekte einer 5-FU Einzelbehandlung auf die mitochondriale Aktivität ähnlich denen bei der Zelllinie mit einem wtp53. Auch hier ist dies am deutlichsten nach einer Inkubationszeit von 48h zu beobachten. Die Reduktionsrate beträgt für 5µM 5-FU 74,5% und für 10µM 5-FU 81%. Des Weiteren ist auch eine Verminderung der mitochondrialen Aktivität nach TQ-Behandlung zu verzeichnen, die bei der HCT116 null Zelllinie größer ist, als bei HCT116 wt. Allerdings ist auch anzumerken, dass nach 48h bei beiden TQ-Konzentrationen die Schwankungsbreiten erheblich sind und möglicherweise die Versuchsanordnung hier erneut durchgeführt werden müsste.

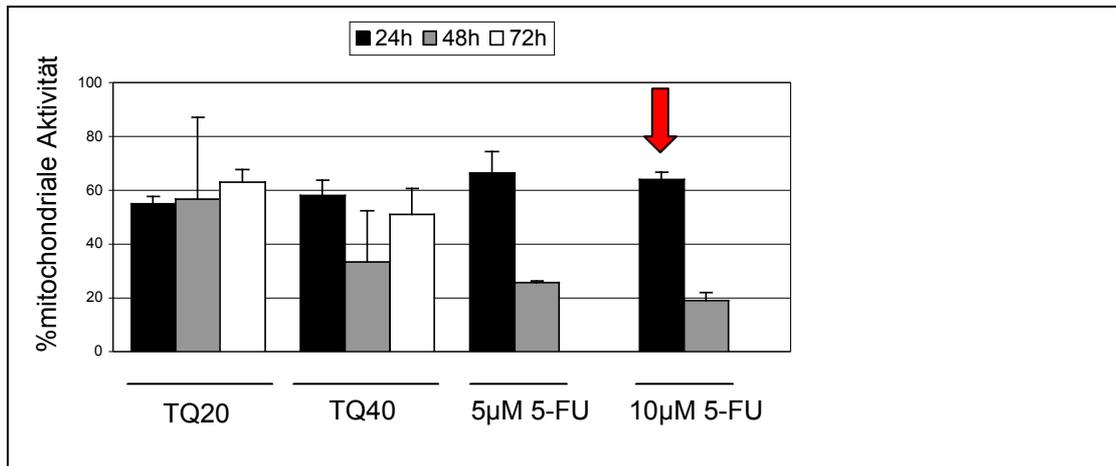


Abb. 18: HCT116 null, mitochondriale Aktivität, Einzelbehandlungen

In den Kombinationsbehandlungen zeigt sich dosisabhängig eine nahezu kontinuierliche Reduzierung der mitochondrialen Aktivität. Die größte Reduktion ist hierbei in der Kombination von 40µM TQ mit 5-FU zu beobachten. Vergleicht man nun diese Ergebnisse mit den äquivalenten 5-FU Einzelbehandlungen, so wird deutlich, dass die Kombination I (24h Präinkubation mit TQ, Zugabe von 5-FU und Inkubation für weitere 24h) überlegen ist. Auch eine Halbierung der 5-FU Dosierung auf 5µM zeigt in der Kombinationsbehandlung I mit TQ eine stärkere Verminderung der Aktivitätsrate als 10µM 5-FU, die Differenz beträgt hier 33,7% (siehe roter Pfeil).

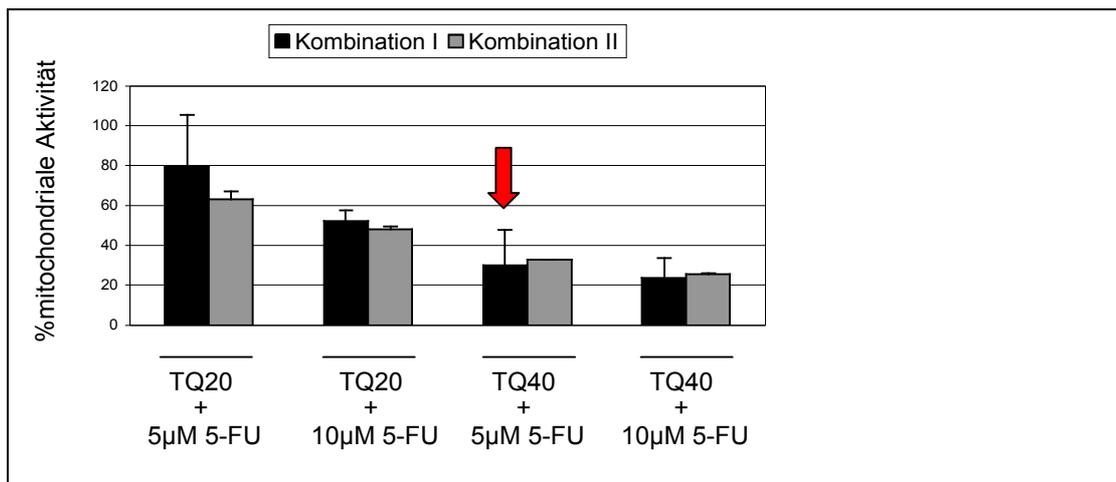


Abb. 19: HCT116 null, mitochondriale Aktivität, Kombinationsbehandlungen

Die Zelllinie HT29 besitzt ein mutiertes p53. Die Substanz TQ zeigt bei 20 $\mu$ M und 40 $\mu$ M nach 24h keinen Effekt. Ab einer Behandlungsdauer von 48h führen beide Konzentrationen zu einer Reduktion der metabolischen Aktivität. Dabei ist die maximale Reduktionsrate im Behandlungsansatz mit 40 $\mu$ M TQ für 48h zu verzeichnen und beträgt hier 25,7% (auf 74,3%). Somit scheint die Reduzierung der metabolischen Aktivität nach TQ-Behandlung dosis- und zeitabhängig zu sein. Diese Hypothese setzt sich in der längeren Behandlungsdauer mit TQ nicht stringent fort. Nach einer Gesamtbehandlungszeit von 72h stagniert der Zellmetabolismus bzw. scheint eine Erholung der Zellen einzusetzen.

Auch die Behandlung der Zellen mit 5-FU zeigt eine Verminderung des Zellmetabolismus. Die verschiedenen Zeitparameter haben kaum einen Einfluss, sodass die Inkubationszeiten von 24h und 48h ähnliche Auswirkungen haben. Die größte Reduzierung der mitochondrialen Aktivität ist nach Behandlung mit 10 $\mu$ M 5-FU für 24h zu beobachten und beträgt 76,3%. 5-FU zeigt nur einen dosisabhängigen Effekt auf die metabolische Aktivität der HT29 Zellen. Dieser ist aber im Allgemeinen deutlich geringer ausgeprägt als bei HCT116 wt und HCT116 null.

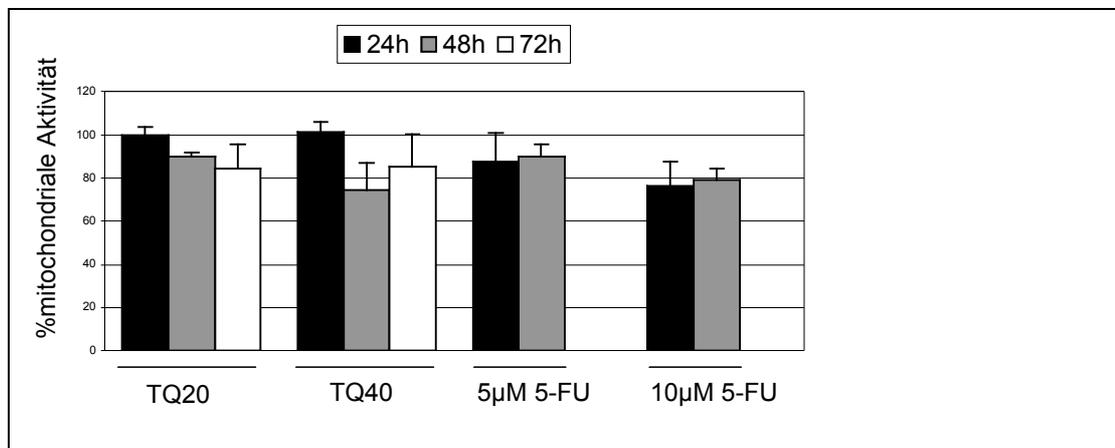


Abb. 20: HT29, mitochondriale Aktivität, Einzelbehandlungen

In den Kombinationsvarianten fällt zunächst eine zeitabhängige Stufenbildung auf, d.h. eine vermehrte Reduktion der metabolischen Aktivität bei längerer Inkubationszeit (Kombination II, graue Balken). Weiterhin ist zu erkennen, dass höhere Konzentrationen sowohl von TQ als auch von 5-FU zu einer Verminderung der metabolischen Aktivität führen. Vergleicht man die Ergebnisse der Kombinationsbehandlungen, bei denen eine gleiche TQ-Konzentration für die Präinkubation verwendet wurde, so wird hierbei der verminderte Zellmetabolismus durch eine steigende 5-FU-Konzentration erzielt. Aber auch die höhere TQ-Konzentration von 40 $\mu$ M wirkt sich auf die metabolische Aktivität aus.

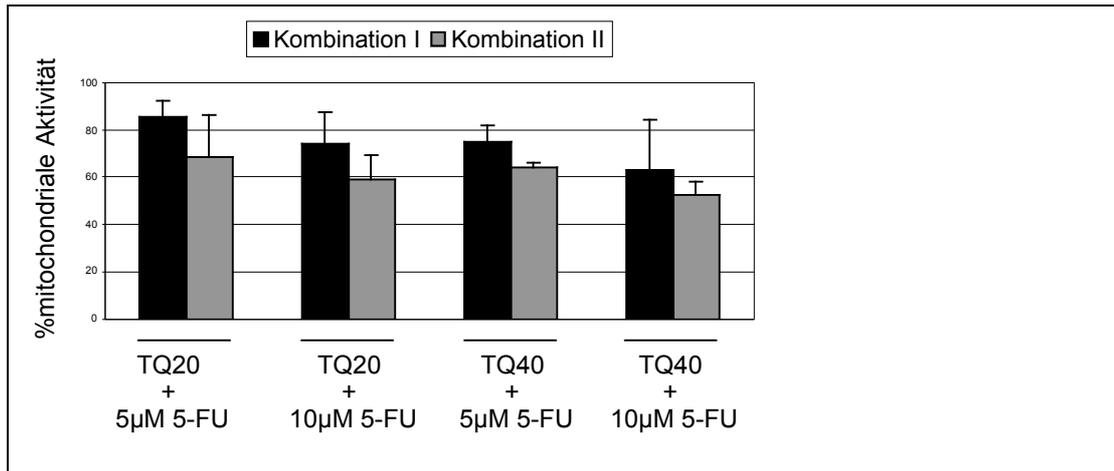


Abb. 21: HT29, mitochondriale Aktivität, Kombinationsbehandlungen

### 3.1.2. Vergleich der Auswirkungen der Kombinationsbehandlung II und der 5-FU Einzelbehandlung auf die metabolische Aktivität der Zelllinie HT29

Ein Ziel der Studie ist es, durch eine Kombinationsbehandlung die verwendete 5-FU Dosierung zu reduzieren bei gleichbleibenden oder stärkeren Effekten auf die Tumorzellen. Da über 50% der kolorektalen Tumorzellen ein mutiertes p53 aufweisen, fokussierten sich die weiteren Untersuchungen der Arbeit auf die Zelllinie HT29. Im MTT-Test zeigt diese die stärkste Reduzierung der metabolischen Aktivität in der Kombination II. Daher wurde diese Behandlungsmodalität für die weiteren Untersuchungen gewählt. Zusätzlich wurde im MTT-Test die Substanz 5-FU auf eine Minimaldosis von 1µM reduziert.

In dieser Abbildung sind die Ergebnisse für eine 24stündige Präinkubation mit 20µM TQ mit anschließendem Zusatz von 5-FU in den Konzentrationen 1µM, 5µM bzw. 10µM und weitere Inkubation für 48h dargestellt.

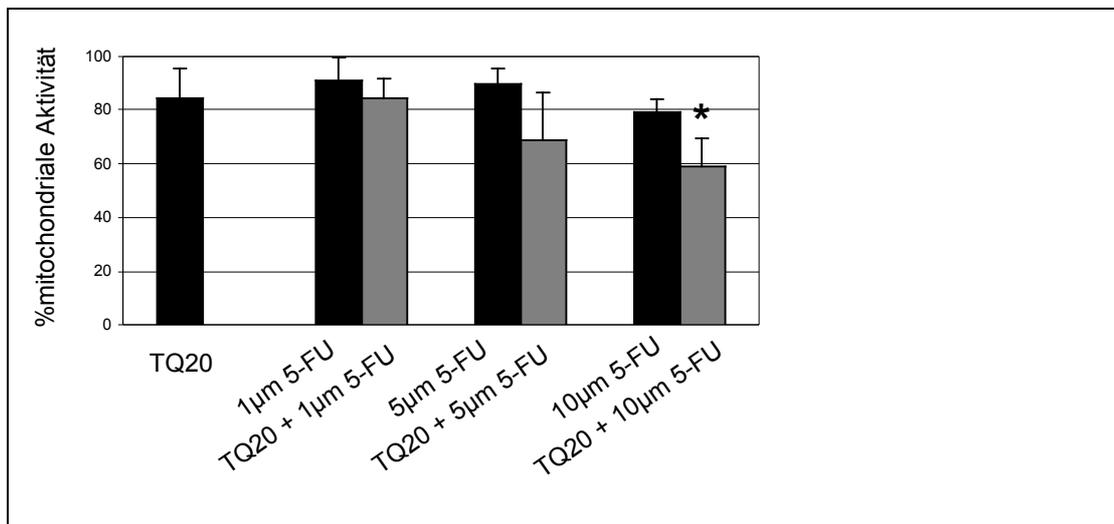


Abb. 22: HT29, mitochondriale Aktivität; \* p<0,05

Die Kombinationsbehandlungen zeigen im Vergleich zur 5-FU Einzelbehandlung eine stärkere Reduktion der metabolischen Aktivität. Besonders deutlich werden die Unterschiede, wenn man die Ergebnisse der Kombinationsbehandlungen mit den Ergebnissen höherer 5-FU Dosierungen in den Einzelbehandlungen vergleicht. Am deutlichsten wird dies bei der Kombination von TQ20 mit 5µM 5-FU erkennbar. Hier

liegt die metabolische Aktivität nach Abschluss der Inkubationszeit bei 68,8%. Bei einer doppelten 5-FU Dosis von 10 $\mu$ M 5-FU liegt diese bei 79%.

Gleiches zeigt sich für die Versuchsanordnung mit einer TQ-Konzentration von 40 $\mu$ M. Auch hier weisen die Kombinationsbehandlungen deutlich bessere Effekte im Vergleich zu den jeweiligen Einzelbehandlungen auf. Beträgt die metabolische Aktivität hier nach einer Behandlung mit 10 $\mu$ M 5-FU 79%, so liegt sie bei der Kombinationsbehandlung mit 5 $\mu$ M 5-FU bei 64%. Bei der Reduzierung der 5-FU Dosierung auf 1/10 ist derselbe Effekt zu verzeichnen, wie in der 5-FU Einzelbehandlung mit der maximal verwendeten Dosis.

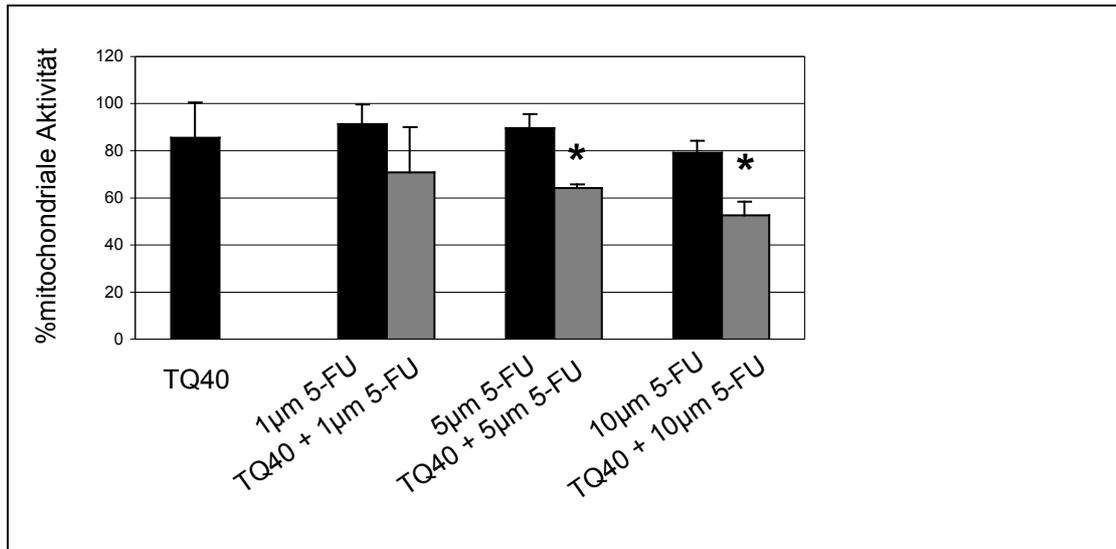


Abb. 23: HT29, mitochondriale Aktivität; \* p<0,05

Anhand dieser Darstellungen wird erkennbar, dass die Kombinationsbehandlung II zum einen zu einer deutlichen Verminderung der mitochondrialen Aktivität führt. Dieser Effekt ist abhängig von der verwendeten Substanzdosierungen und der Inkubationszeit. Zum anderen zeigen sich die Effekte einer Kombinationsbehandlung einer höheren 5-FU Einzeldosierung überlegen.

### 3.2. Colony Formation Assay

Beim Colony Formation Assay wird mittels einem semisoliden Kulturmediums über einen definierten Zeitraum das Wachstum von Zellen beobachtet, die neben einem Verlust der Kontaktinhibition auch die Fähigkeit aufweisen, unabhängig von einer Oberflächenbindung zu wachsen. Die daraus resultierende Kolonienbildung ist ein Maß für die Proliferationsfähigkeit von Zellen. Eine Zellkolonie wird dabei als Ansammlung von mindestens 50 Zellen definiert. Zusätzlich dient diese Untersuchungsmethode zur Ermittlung klinischer Anwendungsmöglichkeiten von Substanzen. Somit können Aussagen über die Tumorantwort nach Behandlung mit Chemotherapeutika getroffen werden.

In der vorliegenden Arbeit fokussierten wir uns im Colony Formation Assay auf ausgewählte Substanzkonzentrationen, die bereits im MTT-Test richtungsweisende Effekte erzielten.

In der Kontrollschale ist bereits makroskopisch ein dichter Zellrasen erkennbar. Bei der Betrachtung unter dem Mikroskop werden die vielen Kolonien, die sich im Agarosemedium gebildet haben, sichtbar. Bei exemplarischer Darstellung einer

Kolonie in der Vergrößerung 40 x 0,6 wird erkennbar, dass diese aus einer großen Anzahl von Einzelzellen besteht, wobei die jeweiligen Zellgrenzen nicht mehr klar voneinander differenzierbar sind.

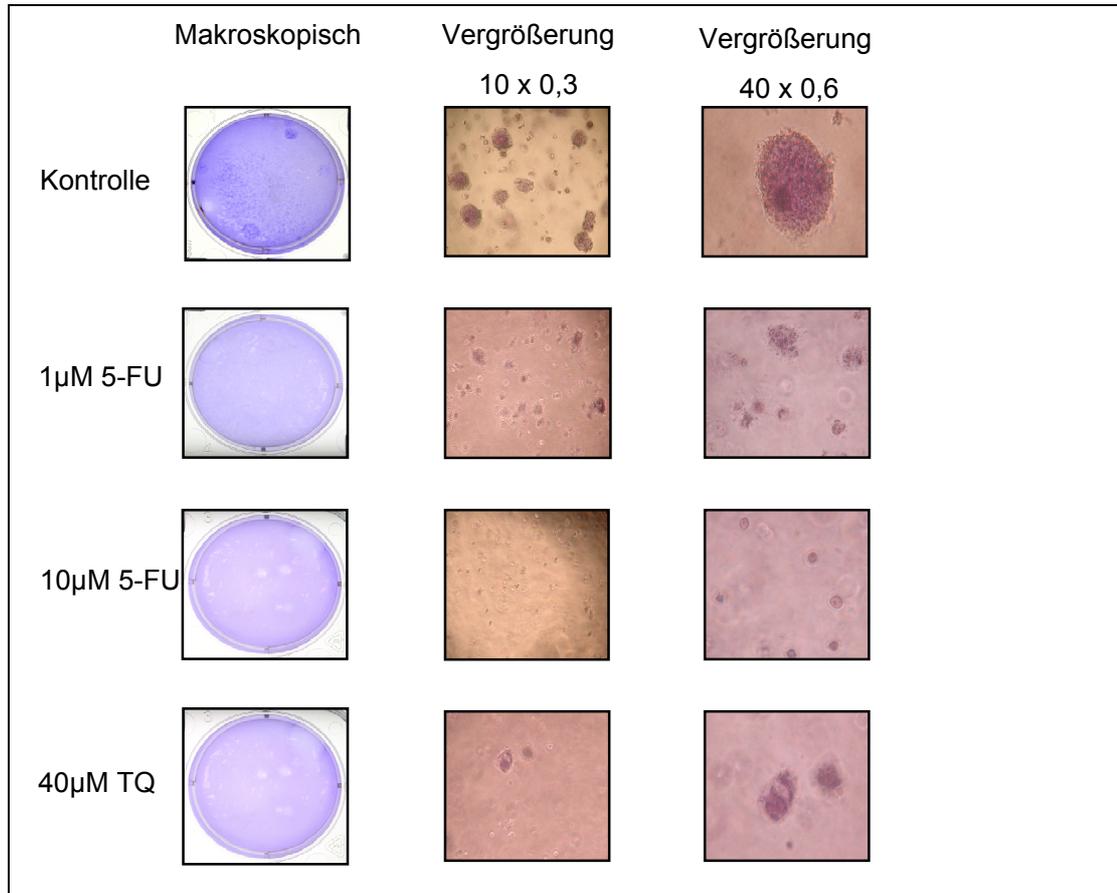


Abb. 24: Koloniebildung nach abgeschlossener Inkubationszeit

Die Behandlung der Zellen mit den Substanzen Thymoquinon und 5-Fluorouracil zeigt einen inhibierenden Effekt auf das Zellwachstums und die Kolonienbildung im Sinne einer Verminderung von Anzahl und Größe. Dabei zeigt sich unter Berücksichtigung der langen Inkubationszeit von 14 Tagen der Einfluss von TQ auf Zellzahl und Koloniebildung überlegen gegenüber der 5-FU Behandlung.

Zur Ermittlung des Kombinationseffektes wurde die Zellen zunächst mit 40µM TQ für 24h vorbehandelt, danach folgte die Zugabe von 1µM 5-FU. Die weitere Beobachtungs- und Inkubationsphase folgte nach oben genanntem Regime.

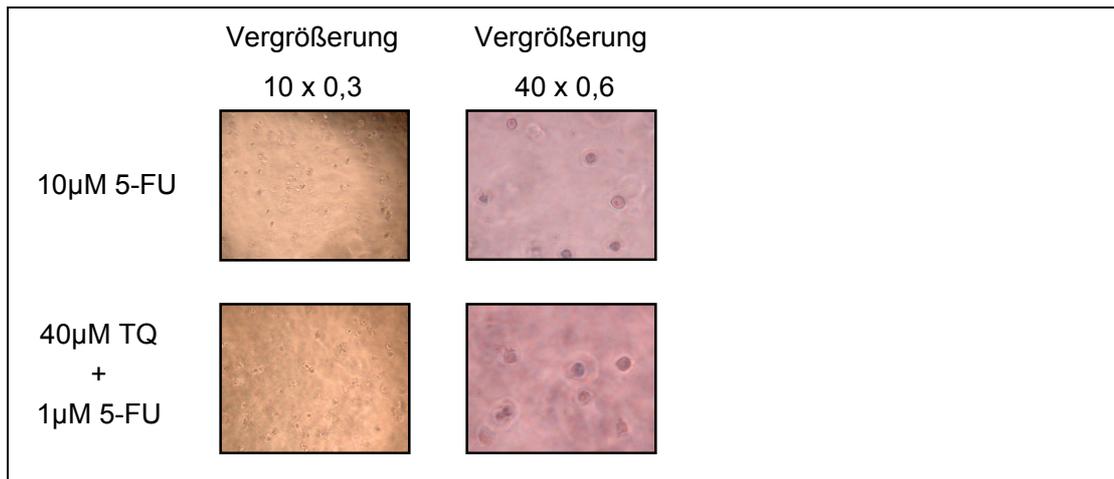


Abb. 25 : Vergleich Kombination mit 10µM 5-FU Einzelbehandlung

Bei beiden Versuchsansätzen ist ein Behandlungseffekt nach Abschluss der Inkubationszeit von 14 Tagen zu erkennen. Es liegen vor allem einzelne Zellen und kleinere Zellverbände vor. Die Kombinationsbehandlung zeigt bezüglich Kolonienzahl und –größe ein äquivalentes Ergebnis im Vergleich zu einer 10fach höheren Einzelbehandlung mit 5-FU.

Der Colony Formation Assay zeigt, dass die Präinkubation mit Thymoquinon und die Weiterbehandlung mit der geringen Konzentration von 1µM 5-Fluorouracil zu einer deutlichen Zellzahlreduktion und Entstehung von kleinen Zellverbänden führt, die vergleichbar ist, mit der 10fach höheren 5-FU Dosis in Einzelbehandlung. Somit zeigt sich eine Wirkungssteigerung in der Kombinationsbehandlung bezüglich des Zellwachstums.

### 3.3. Annexin-V-FITC

Der Annexin-Test stellt eine aufwendige und kostenintensive Untersuchungsmethode dar. Basierend auf den vorangegangenen Untersuchungsergebnissen wurden daher für die Substanzen konkrete Konzentrationen und Zeitwerte gewählt, im Folgenden aufgelistet:

1. 40µM TQ für 24h, 48h, 72h
2. 5µM 5-FU für 24h, 48h
3. Kombinationen: Präinkubation mit 40µM TQ für 24h, anschließend Zugabe von 5 µM 5-FU und Inkubation für weitere 24h bzw. 48h

Zur Ermittlung der Apoptoserate wurden die jeweiligen Werte aus der rechten Spalte zusammengefasst und in den Abbildungen mit entsprechender Markierung hervorgehoben.

#### 3.3.1. Zeitverlauf der TQ-Behandlung

Im Vergleich zur Kontrolle zeigt sich bei der Behandlung der Zellen mit 40µM TQ eine Reduktion der als lebenden und eine Zunahme der als apoptotisch definierten Population nach einer Behandlungszeit von 24h und 48h. Dieser Unterschied ist nach 72h nicht mehr feststellbar. Der Grund dafür könnte in einem Verbrauch der Substanz liegen.

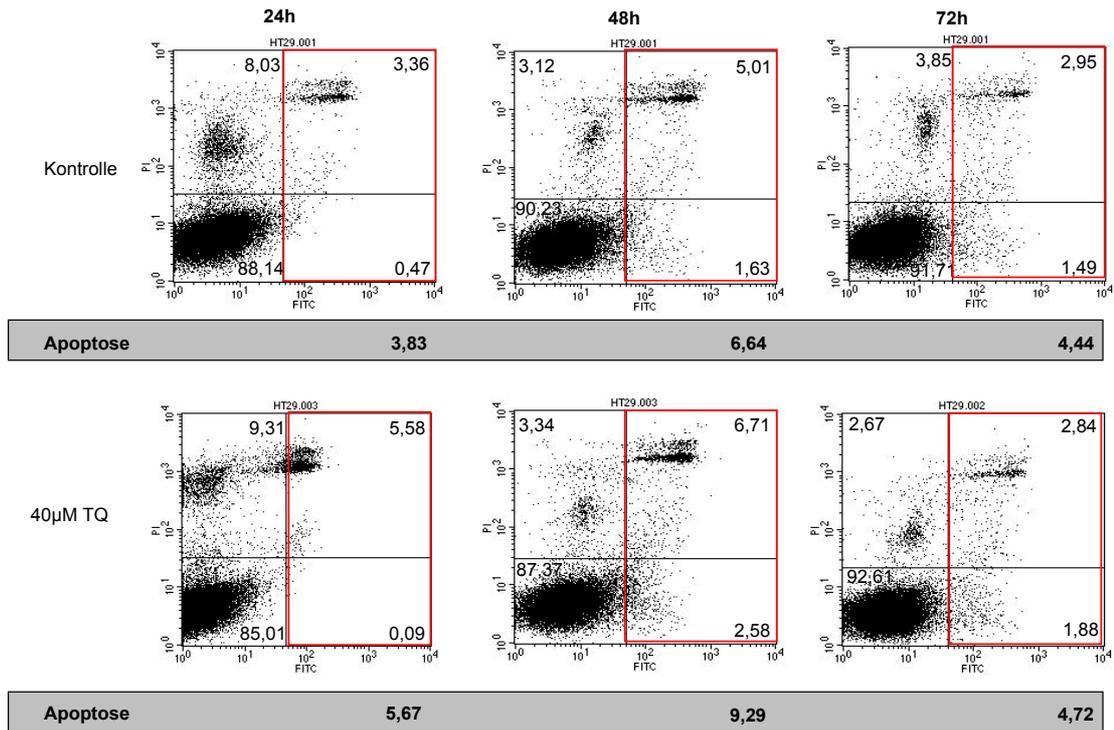


Abb. 26: Zeitverlauf der TQ-Behandlung

### 3.3.2. Zeitverlauf der FU-Behandlung

Die Behandlung der Zellen mit 5-FU zeigt im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle eine Zunahme der Apoptoserate für die hier untersuchten Zeitwerte. Nach 48h liegt eine deutliche Reduzierung der lebenden Zellen vor. Verglichen mit den Kontrollzellen liegt dies an einer gesteigerten Apoptoserate.

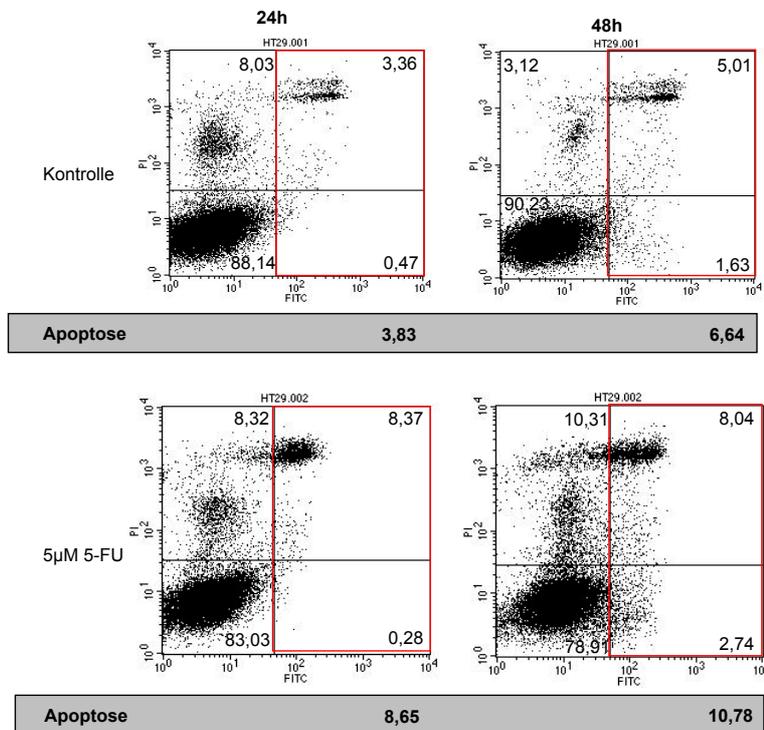


Abb. 27: Zeitverlauf der 5-FU-Behandlung

Bei der Untersuchung der Substanzen TQ und 5-FU in Monotherapie zeigt sich zeitabhängig eine Zunahme der apoptotischen Zellen und eine Verminderung der Population lebender Zellen. Dieser Effekt zeigt sich nach TQ-Behandlung und einer Inkubation von 72h rückläufig. Im Hinblick auf die Population lebender Zellen, scheint die Behandlung der Zellen mit 5-FU einer TQ-Behandlung überlegen.

### 3.3.3. Die Kombinationsbehandlungen

Bei der Kombination I wird zunächst 40µM TQ den Zellen zugesetzt, nach 24h erfolgt die Zugabe von 5µM 5-FU und eine Inkubation für weitere 24h. Das Behandlungsregime bei der Kombination II erfolgt ähnlich, wobei hier nach Zugabe von 5µM 5-FU die weitere Inkubationszeit 48h beträgt.

Bereits in der Einzelbehandlung zeigte die Substanz TQ ihr Wirkmaximum nach einer Inkubationszeit von 48h. Unter Zugabe von 5-FU lässt sich dieser Effekt noch verstärken und führt in der Kombinationsbehandlung I zu einer Verminderung des Anteils lebender Zellen. Zugleich ist ein Anstieg der apoptotischen Zellpopulation zu verzeichnen. So zeigt sich anhand dieser Untersuchung, dass der Effekt einer Kombination den jeweiligen Einzelbehandlungen überlegen ist. Auffallend ist aber auch, dass die Anzahl der nekrotischen Zellen mit der 5-FU Einzelbehandlung korreliert und somit als Einfluss dieser Substanz zu werten ist.

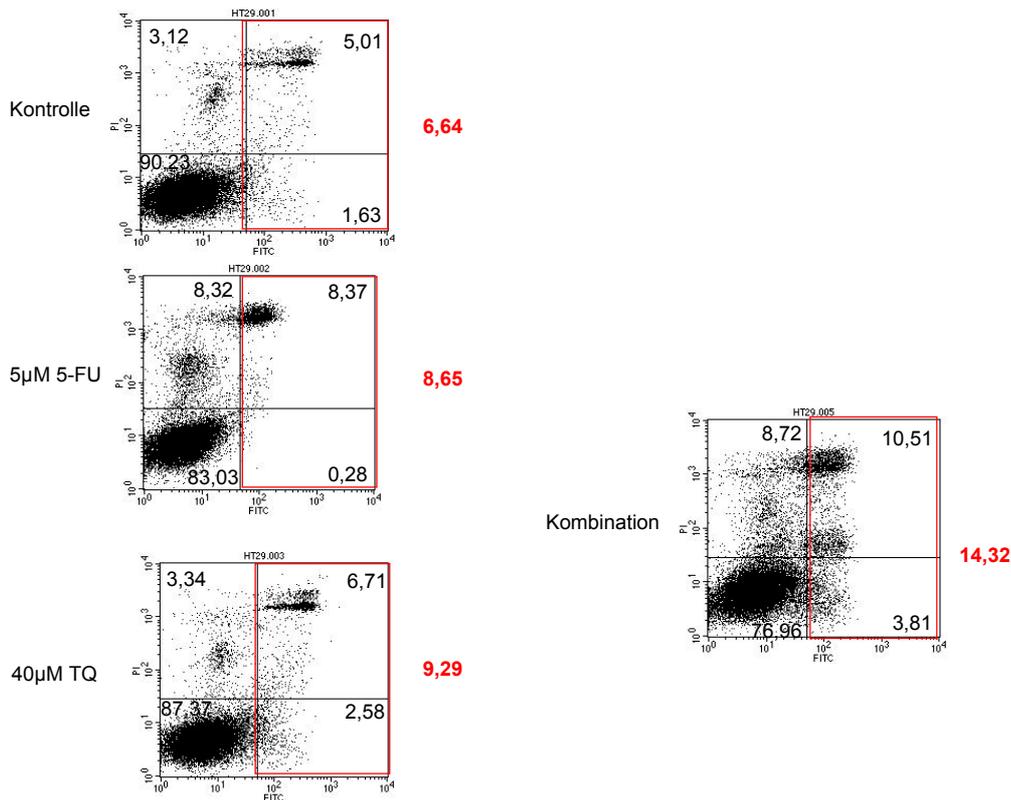


Abb. 28: Kombinationsbehandlung I

Erläuterung:

Kontrolle

24h 5µM 5-FU

48h 40µM TQ

Kombination: 24h Präinkubation mit TQ, Zugabe von 5-FU für weitere 24h

In der Kombination II ist der Effekt auf die Apoptoserate geringer als bei der Kombination I. Vielmehr erscheint der Effekt hier rückläufig zu sein, auch im Vergleich zur Einzelbehandlung mit 5-FU. In dieser Versuchsanordnung beträgt die Inkubation von TQ insgesamt 72h. Bereits in der Einzelbehandlung zeigte TQ für dieses Zeitintervall einen Wirkverlust, der auch in der vorliegenden Substanzkombination entsprechende Auswirkungen zeigt. Der Anteil lebender Zellen fällt zwar geringer aus, als bei der TQ-Einzelbehandlung, jedoch ist die Monobehandlung mit 5-FU hier eindeutig überlegen. Allerdings lässt sich auch feststellen, dass die Population nekrotischer Zellen in der 5-FU Einzelbehandlung fast doppelt so hoch ist, als in der Kombination II.

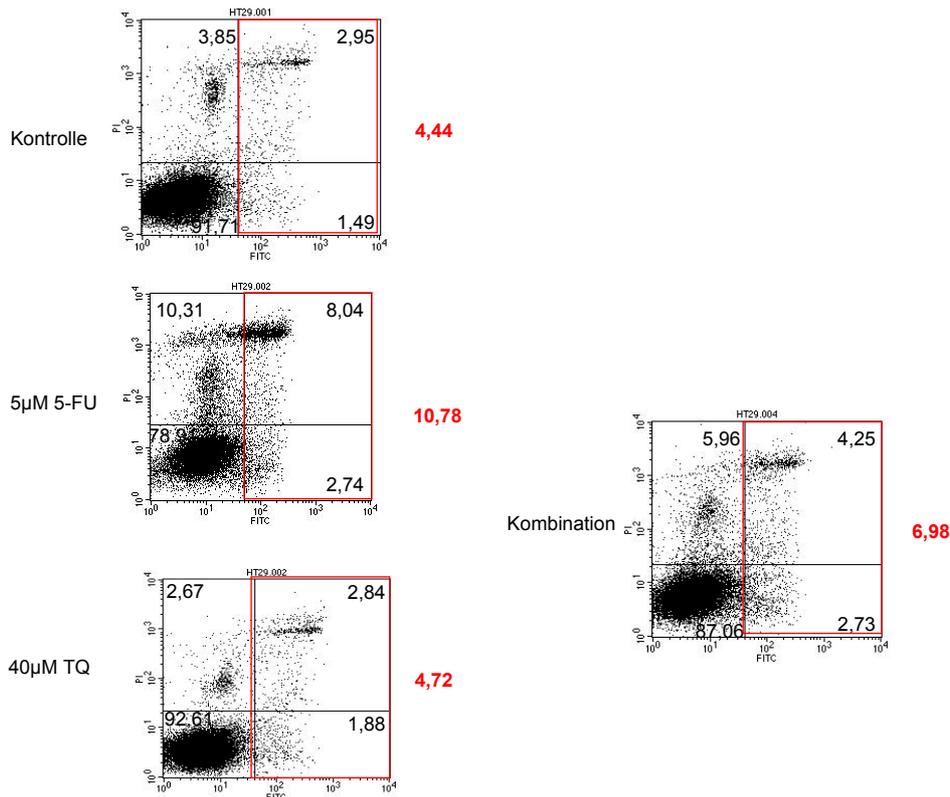


Abb. 29: Kombinationsbehandlung II  
Erläuterung:

Kontrolle

48h 5µM 5-FU

72h 40µM TQ

Kombination: 24h Präinkubation mit TQ, Zugabe von 5-FU für weitere 48h

### 3.4. Zellzyklus

Bei der Untersuchung des Zellzyklus mittels FACS-Analysen sollte ermittelt werden, ob und in welchem Ausmaße die Einzel- sowie die Kombinationsbehandlungen zu einer Beeinflussung der Zellzyklusphasen führen.

Die untersuchten Konzentrationen und Behandlungszeiten:

1. 40µM TQ für 24h, 48h, 72h
2. 5µM 5-FU für 24h, 48h
3. Kombinationen: Präinkubation mit 40µM TQ für 24h, anschließend Zugabe von 5µM 5-FU und Inkubation für weitere 24h bzw. 48h

Die Behandlung der Zellkulturen mit 5µM 5-FU zeigt im Vergleich zur Kontrolle eine Zunahme der Zellpopulation in der subG1-Phase, die allgemein als Apoptosephase definiert wird. Des Weiteren wird ein Zyklusarrest in der S-Phase induziert. Die Zellen akkumulieren in diesem Stadium und können die Mitose, die normalerweise im Anschluss durchlaufen wird, nicht mehr passieren. Die Zunahme der Zellpopulationen in der subG1- sowie der S-Phase sind somit ursächlich für die Zellzahreduktion in den Zellzyklusphasen G1 und G2/M.

Die Behandlung mit 40µM TQ zeigt nur eine geringe Zunahme der Zellen in der subG1-Phase. Verglichen mit der Kontrolle hat TQ bei der vorliegenden Zelllinie, der verwendeten Konzentration und den untersuchten Zeitwerten keinen Einfluss auf den Zellzyklus.

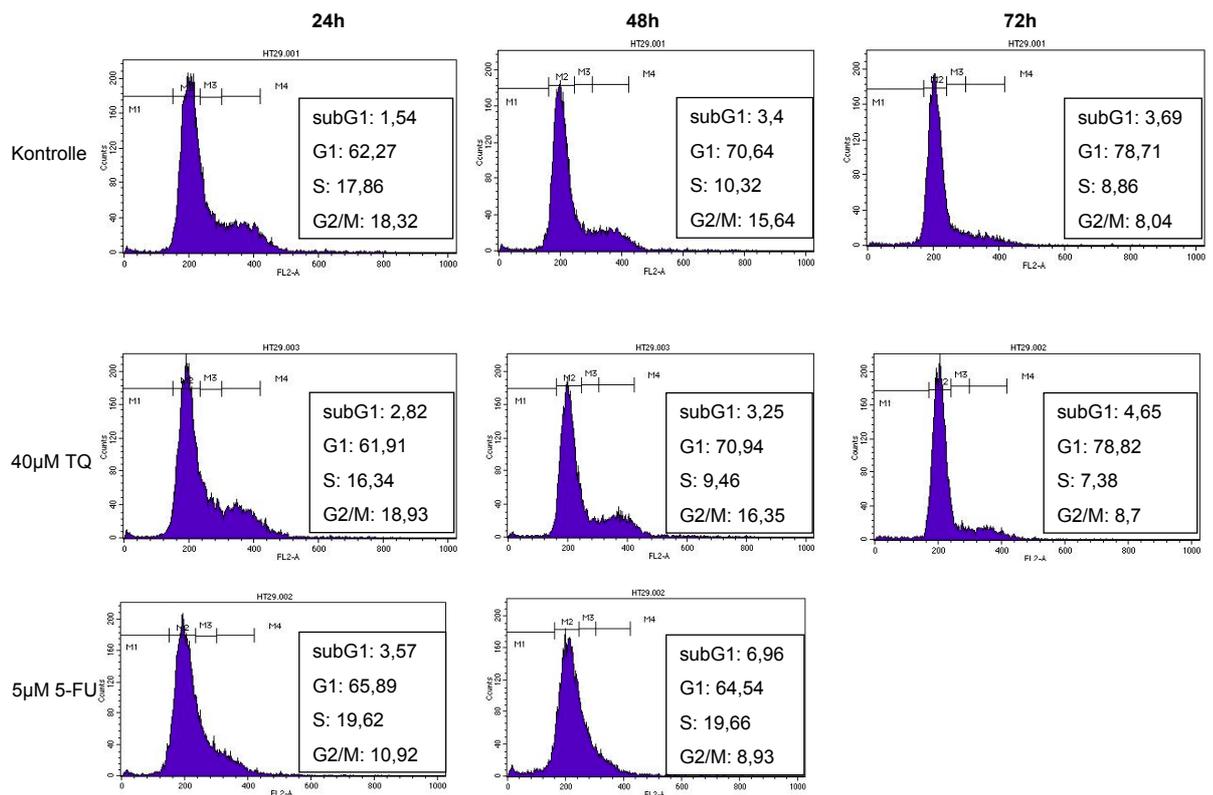


Abb. 30: Zeitverlauf Zellzyklusphasen, Einzelbehandlungen

Bei der Kombination von TQ und 5-FU ist ein Anstieg der subG1- und S-Phase zu verzeichnen. Dabei ist der sub-G1-Arrest in der Kombination II stärker ausgeprägt. Sowohl der subG1- als auch der S-Phase-Arrest sind aufgrund der Ergebnisse in den Einzelbehandlungen auf die 5-FU Wirkung zurückzuführen. Allerdings findet sich in beiden Kombinationsvarianten eine Abschwächung des 5-FU induzierten S-Phase-Arrestes.

Die Einzelbehandlung der HT29-Zelllinie mit 5µM 5-FU übt den stärksten Einfluss auf die Zellzyklusphasen aus, vor allem bezüglich der S-Phase, wohingegen eine TQ-Behandlung den Zellzyklus kaum beeinflusst. Eine kombinierte Behandlung führt vor allem zum Anstieg des subG1-Arrestes.

## Ergebnisse

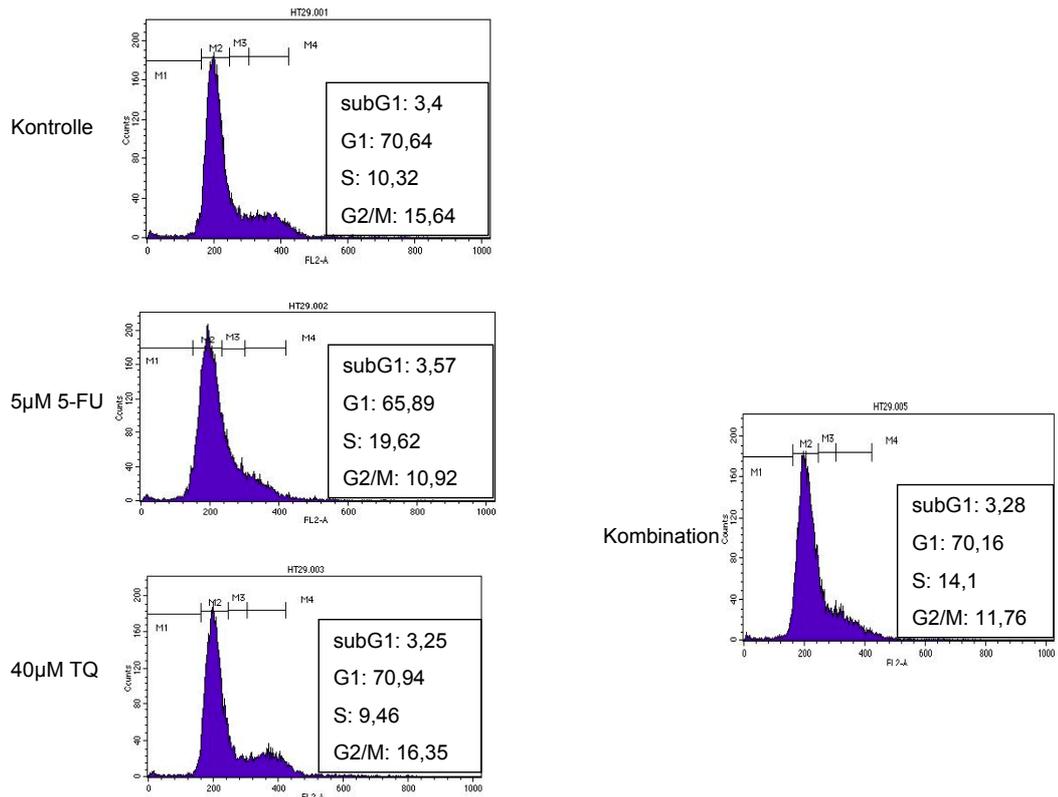


Abb. 31: Kombinationsbehandlung I

Erläuterung:

Kontrolle

24h 5µM 5-FU

48h 40µM TQ

Kombination: 24h Präinkubation mit TQ, Zugabe von 5-FU für weitere 24h

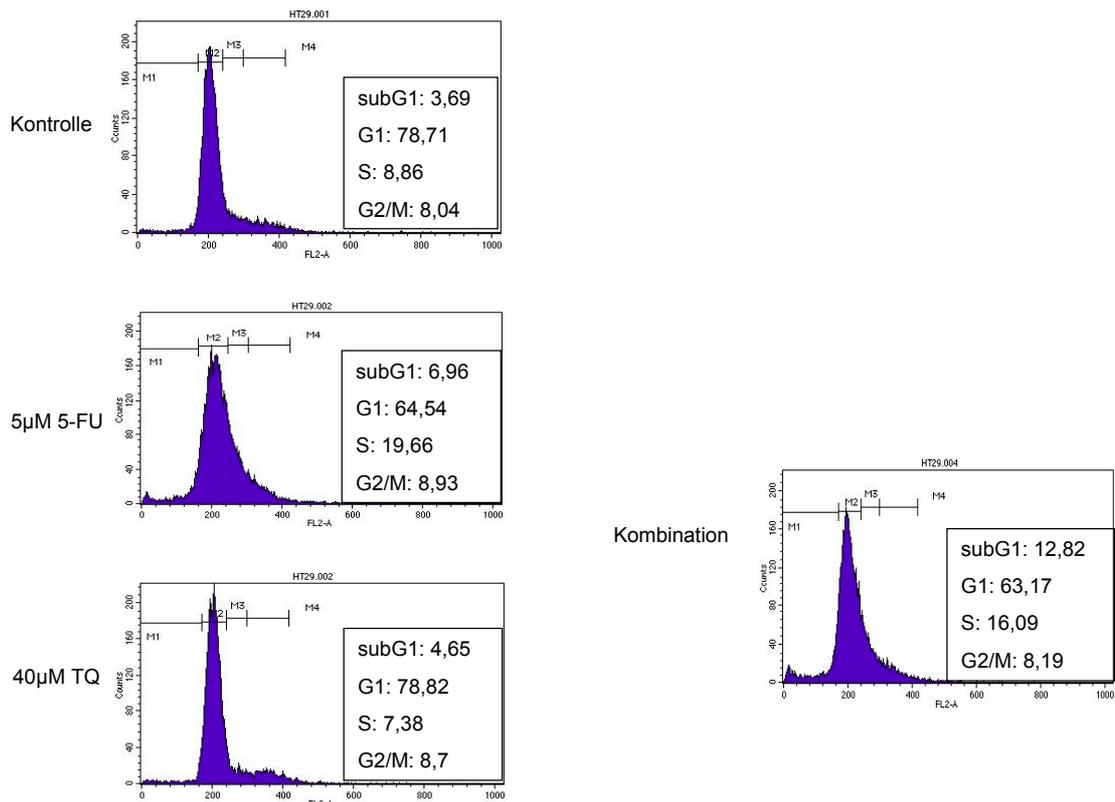


Abb. 32: Kombinationsbehandlung II

Erläuterung:

Kontrolle

48h 5µ 5-FU

72h 40µM TQ

Kombination: 24h Präinkubation mit TQ, Zugabe von 5-FU für weitere 48h

### 3.5. Western Blot

Um die anhand von Zellkultur- und Durchflusszytometrieexperimenten vorliegenden Ergebnisse genauer zu verifizieren, wurden Western Blot-Analysen zur Untersuchung der Veränderungen und Auswirkungen auf Proteine durchgeführt. Hierbei lag der Fokus vor allem auf der Ermittlung von apoptotischen Signalwegen, die bei Behandlung der HT29-Zelllinie mit den Substanzen TQ und 5-FU aktiviert werden. Für die folgenden Untersuchungen wurde die Kombination II (Präinkubation mit 40µM TQ, nach 24h Zugabe von 5µM 5-FU und Inkubation für weitere 48h) sowie die äquivalenten Einzelbehandlungen gewählt. Die Ladereihenfolge gestaltet sich somit wie folgt:

1. Kontrolle
2. 48h 5µM 5-FU
3. 72h 40µM TQ
4. Kombination II

#### 3.5.1. Zellzyklus: p53, p21 und Chk1

Bei den Untersuchungen auf Proteinebene zeigte sich, dass die Einzelbehandlungen zu einer vermehrten Expression von p53 und p21 führen. Bei der Kombinationsbehandlung verstärkt sich dieser Effekt sogar noch, wobei vor allem

der Einfluss der Substanz 5-FU eine maßgebliche Rolle spielt. Außerdem liegt die Menge an p21 in der Kombination bei auf 4.4 und somit über dem Wert von p53 (2.8). In den Einzelbehandlungen hingegen ist der Gehalt an p21 gleich oder etwas geringer als der von p53.

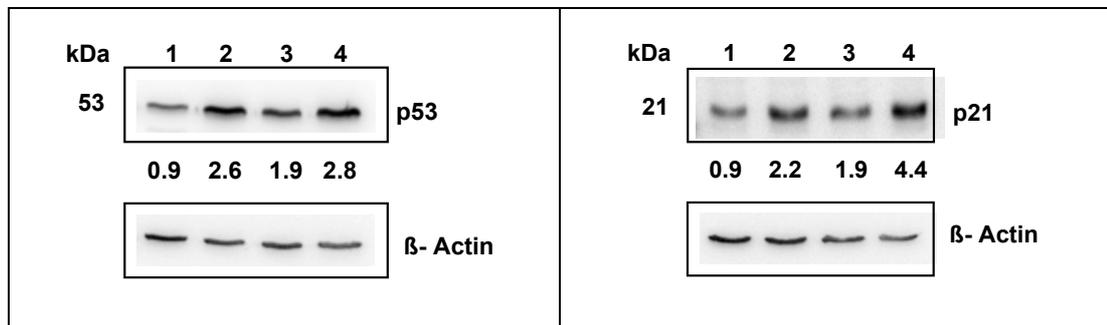


Abb. 33: Western Blot p53 und p21

Ganz anders sind die Ergebnisse bei der Untersuchung der Chk1 Expression nach abgeschlossener Behandlung. In der Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass eine TQ-Einzelbehandlung sowie die Kombination mit 5-FU zu einer Reduzierung der Proteinexpression führt. Die ermittelte Ratio liegt dabei jeweils unter dem Kontrollwert, wobei die Substanz 5-FU in der Kombination der negativen Regulierung von TQ entgegenzuwirken scheint.

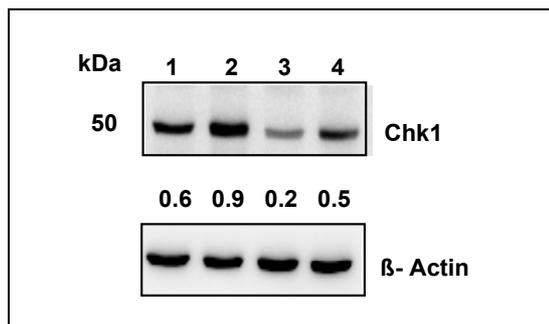


Abb. 34: Western Blot Chk1

Die Detektion von H2AX in der Proteinanalyse weist auf DNA-Schäden im Sinne von Doppelstrangbrüchen hin, die für 5-FU-Behandlung charakteristisch sind und sich auch hier zeigen. TQ induziert hingegen keine Doppelstrangbrüche und auch in der Kombinationsbehandlung zeigt sich nur eine geringe, 5-FU vermittelte H2AX-Expression.

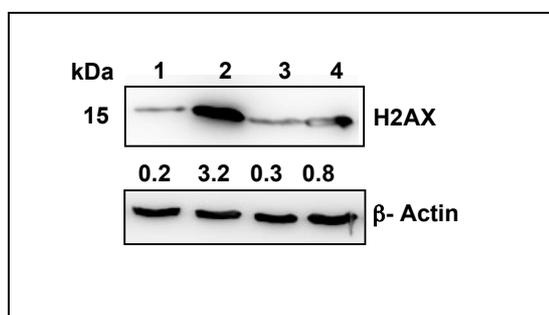


Abb. 35: Western Blot H2AX

### 3.5.2. Aktivierung des extrinsischen Signalweges

Die Caspase-8 zählt zu den Initiatorcaspasen. Sie wird nach Aktivierung des Fas-Rezeptors und Einleitung des extrinsischen Apoptoseweges mittels Autoproteolyse aktiviert. Im weiteren Verlauf spaltet sie Effektorcaspasen, wie die Procaspase-3, die dadurch wiederum aktiviert werden und den Apoptoseprozess fortleiten.

Die hier verwendete Substanz 5-FU induziert, sowohl in der Einzelbehandlung als auch in Kombination, die Aktivierung der Caspase-8 und Caspase-3. Thymoquinon hingegen führt nicht zu einer Spaltung der beiden Procaspasen.

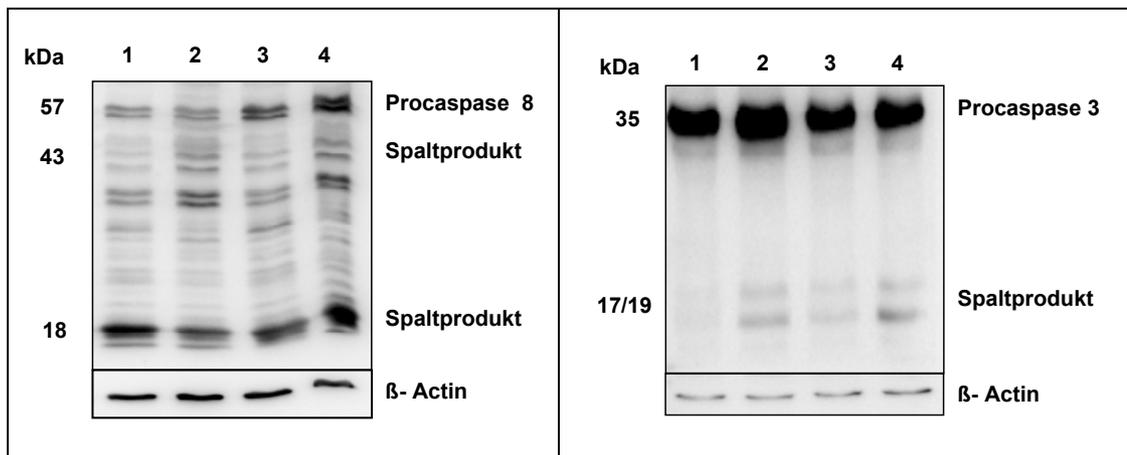


Abb. 36: Western Blot Caspase-8 und Caspase-3

### 3.5.3. Aktivierung des intrinsischen Signalweges

Bei der Aktivierung und Durchführung des intrinsischen Apoptoseweges spielen Mitochondrien die zentrale Rolle. Durch Ermittlung des Gehalts der daran beteiligten Proteine, können Rückschlüsse darüber gezogen werden, ob pro- oder antiapoptotische Stimuli überwiegen. Daher wurden Proteine untersucht, die Hinweise auf eine mögliche Einleitung dieses Signalweges geben.

Die Untersuchung des zytoplasmatischen Proteins BID ergab für Thymoquinon sowie die Kombinationsbehandlung eine Hochregulierung sowie eine Spaltung in das aktive t-BID.

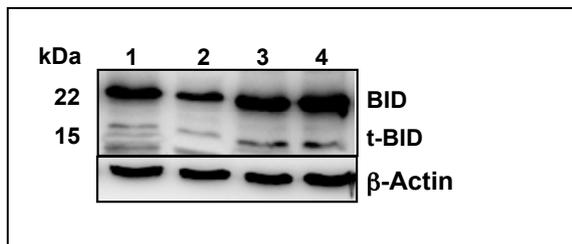


Abb. 37: Western Blot BID

Einen weiteren Hinweis auf die Einleitung der intrinsischen Signalkaskade stellt die Bax/Bcl-2 Ratio dar. Sie gilt als kritische Balance zwischen den Einflüssen regulatorischer apoptotischer und antiapoptischer Proteine. Ein Anstieg der Bax/Bcl-2 Ratio führt zur Cytochrom c Freisetzung. Das ist ein entscheidendes Ereignis im apoptotischen Signalweg.

Es zeigt sich, dass Thymoquinon sowie die Kombinationsbehandlung zu einer Verminderung des Bcl-2 Proteinlevels führt und zugleich ein Anstieg der Bax/Bcl-2

Ratio in der Kombinationsbehandlung auf 1.2 zu verzeichnen ist, die somit 3- bzw. 4-fach höher als in den jeweiligen Einzelbehandlungen liegt.

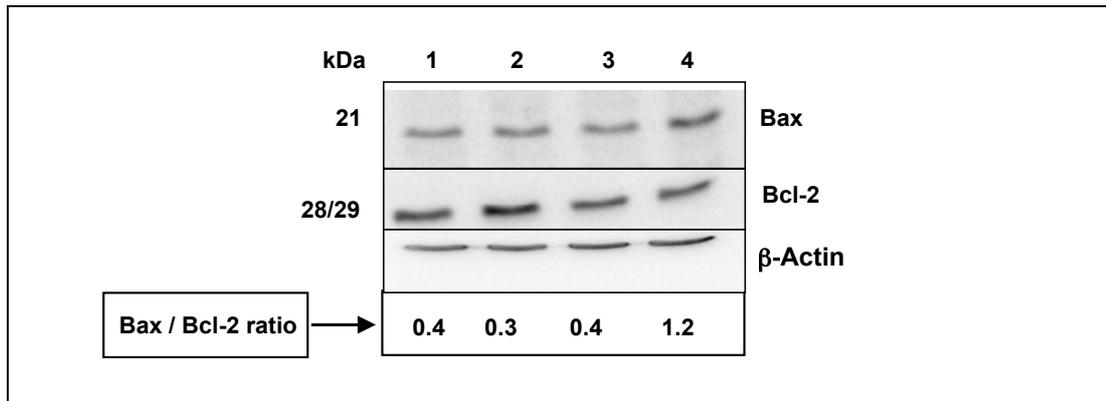


Abb. 38: Western Blot Bax und Bcl-2

Im Verlauf der Aktivierung der mitochondrialen Kaskade kommt es zur Freisetzung des mitochondrialen Cytochrom c ins Zytosol. Sowohl TQ als auch die 5-FU führen zu einem vermehrten Anstieg des Cytochrom c Gehaltes, wobei dieser nach 5-FU Behandlung etwas höher ist. Somit führt auch eine alleinige Behandlung der Zellen mit 5-FU zu einer Veränderung an der Mitochondrienmembran. Die ermittelte Ratio in der Kombinationsbehandlung ist nur minimal erhöht.

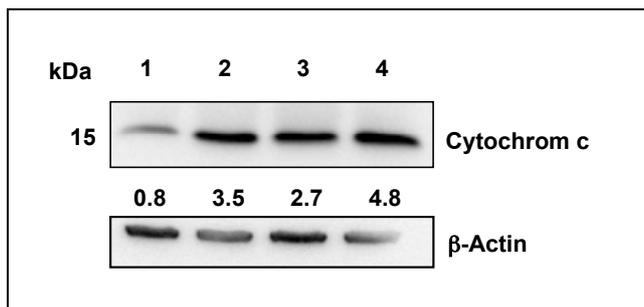


Abb. 39: Western Blot Cytochrom c

Resultierend aus den oben beschriebenen Aktivierungen des mitochondrialen Signalweges kommt es final zur einer Spaltung und somit Aktivierung der Pro-caspase 9. Diese Aktivierung findet sich sowohl für die TQ- und 5-FU-Einzelbehandlung und ist auch in der Kombination erkennbar.

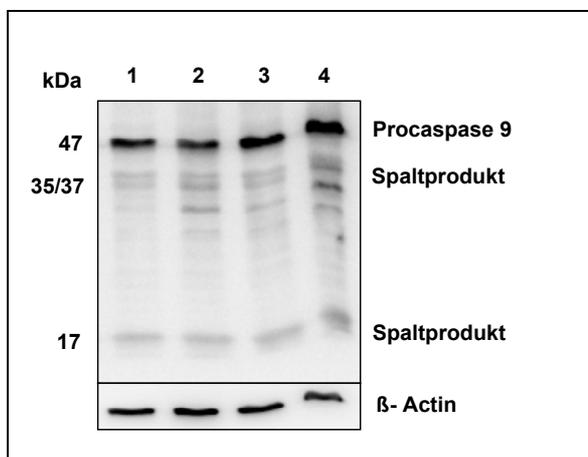


Abb. 40: Western Blot Caspase- 9

## 4. Diskussion

Das Fluoropyrimidin 5-Fluorouracil zählt seit Jahrzehnten zur Standardtherapie bei der Behandlung von Krebserkrankungen, wie dem kolorektalen Karzinom. Bemühungen die Effektivität von 5-FU weiter zu verbessern, führten zu Kombinationen mit anderen Chemotherapeutika, wie Irinotecan oder Oxaliplatin. Trotz der dadurch erreichten verbesserten Ansprechraten, erleidet die Mehrheit der Patienten ein Rezidiv mit einer mittleren Überlebenszeit von nur 22 bis 24 Monaten (Proutski et al. 2009). Erworbene und de novo Resistenzen stellen eine große klinische Herausforderung dar, die eine erfolgreiche Nutzung der chemotherapeutischen Substanzen beschränken. Die erforderliche Dosissteigerung, die notwendig wäre, um die zellulären Resistenzen zu überwinden, kann schwere zytotoxische Folgen für Normalgewebe haben (Arafa et al. 2011). In den vergangenen Jahren wurden daher zunehmend natürliche Extrakte untersucht. Dabei wurden vor allem natürliche Antioxidantien in Kombination mit Chemotherapeutika verwendet, um die Nebenwirkungen zu reduzieren und die Effektivität der Tumorbehandlung zu erhöhen (Badr et al. 2011).

Thymoquinon ist die bioaktive Hauptkomponente des Schwarzkümmels und besitzt antioxidative, antiinflammatorische und Antitumor-Eigenschaften (Badary et al. 2003, Gali-Muhtasib et al. 2008). Die zytotoxischen Eigenschaften dieser Substanz wurden bereits an verschiedenen malignen Tumoren nachgewiesen, wie dem Pankreaskarzinom (Kaseb et al. 2007), dem Osteosarkom (Roepke et al. 2007), der myeloblastischen Leukämie (El-Mahdy et al. 2005) sowie dem kolorektalen Karzinom (Gali-Muhtasib et al. 2004a).

In diversen Kombinationsstudien mit klinisch verwendeten Antitumormedikamenten zeigte sich, dass TQ eine positive Auswirkung auf den therapeutischen Index hat und zudem die Schädigung von Nichttumorgewebe durch Chemotherapeutika deutlich vermindert. Auch im Xenograft-Modell wurden der vielversprechende Antitumoreffekt und die protektiven Eigenschaften von TQ gegenüber gesundem Gewebe nachgewiesen. So konnte gezeigt werden, dass TQ die Antitumoraktivität von Cisplatin bei der Behandlung von Ehrlich-Asziteskarzinom-tragenden Mäusen steigert (Badary et al. 1997). Weiterhin zeigte die Behandlung mit der weit verbreiteten Substanz Ifosfamid und die Gabe von in Trinkwasser gelöstem TQ bei Mäusen eine verbesserte Antitumoraktivität und bei Ratten eine signifikant geringere Anfälligkeit gegen Ifosfamid-induzierte Nierenabnormalitäten (Badary et al. 1999). In einem weiteren Xenograftmodell führte die Behandlung von Ratten mit TQ zu einer signifikanten Reduktion der Doxorubicin-induzierten Proteinurie und Hyperlipidämie und zur Normalisierung der Biomarkerwerte für oxidativen Stress und Nephrotoxizität (Badary et al. 2000). Nagi et al. stellten fest, dass mit TQ angereichertes Trinkwasser ebenfalls einen protektiven Effekt auf die Doxorubicin-induzierte Kardiotoxizität ausübt. Dies erklärt man sich durch die Eigenschaft von TQ, ein guter Radikalfänger von Superoxidradikalen zu sein (Nagi et al. 2000).

Auch in einigen wenigen klinischen Studien wurde TQ bereits getestet. Bei erwachsenen Patienten mit hämatologischen Tumorerkrankungen oder soliden Tumoren ergab sich keine signifikante systemische Toxizität nach TQ Behandlung (Al-Amri et al. 2009). Bei an Epilepsie erkrankten Kindern zeigte TQ antiepileptische Effekte (Akhondian et al. 2011).

### 4.1. Die Auswirkungen einer Kombinationsbehandlung auf die Proliferation kolorektaler Tumorzellen mit unterschiedlichem p53-Status

Einführend wurden die Effekte unterschiedlicher Behandlungsmodalitäten auf die metabolische (mitochondriale) Aktivität kolorektaler Tumorzellen mit unterschiedlichem p53-Status (HCT116 wtp53, HCT116 nullp53, HT29 mtp53) untersucht.

Die Rolle von p53 auf die TQ-induzierte Apoptose stellt sich in der Literatur in Abhängigkeit zur untersuchten Zelllinie unterschiedlich dar. So zeigten kolorektale Tumorzellen mit einem p53-Verlust eine geringere Sensitivität gegenüber der antineoplastischen und proapoptotischen Aktivität von TQ als Zellen mit einem p53-Wildtyp. Daher wurde vermutet, dass hier ein p53-abhängiger Mechanismus vorliegt (Gali-Muhtasib et al. 2004a). In der vorliegenden Arbeit zeigten allerdings die HCT116 null Zellen eine stärkere Reduktion der metabolischen Aktivität als die HCT 116 Wildtyp Zellen. Auffallend sind bei beiden Zelllinien aber auch die großen Schwankungen in den Messwerten nach TQ-Behandlung, die in den 5-FU Einzelbehandlungen weniger stark ausgeprägt sind. Allerdings wurde bei myeloischen Leukämiezellen sowie bei Osteosarkomzellen eine p53-unabhängige Apoptose nach TQ-Behandlung nachgewiesen (El-Mahdy et al. 2005, Roepke et al. 2007).

Die HT29-Zellen zeigten nach 48h TQ sowie nach 10µM 5-FU Einzelbehandlung die größte Reduzierung der mitochondrialen Aktivität, wobei in den Einzelbehandlungen im Allgemeinen eine geringere Reduktion vorliegt, im Vergleich zu den HCT116 Zelllinien. Dies ist ganz offensichtlich auf den mutierten p53-Status zurückzuführen. Die Zellen reagieren hier nach Substanzbehandlung nicht gleichsinnig wie Zellen, die einen p53 Verlust aufweisen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Roepke et al., die zeigte, dass Osteosarkomzellen mit einem mutierten p53 resistenter gegenüber einer TQ-induzierten Apoptose sind als nullp53 Osteosarkomzellen. Dabei stellten sich die Effekte in den beiden Zelllinien nach TQ-Behandlung unterschiedlich dar: während es in den nullp53 Zellen zu einer p53-unabhängigen Induktion der Apoptose kam, in die der mitochondriale Signalweg involviert ist, wurde in den mtp53 Zellen ein DNA-Schaden ermittelt, der einen Zellzyklusarrest zur Folge hat. Somit scheint eine Mutation zu veränderten Bindungseigenschaften und neuartigen Konformationen von p53 zu führen. Dadurch entsteht die Möglichkeit zu neuen Bindungspartnern und zur Aktivierung neuer Targetgene (Roepke et al. 2007).

In den Kombinationsbehandlungen zeigt sich bei allen drei Zelllinien, ganz unabhängig von p53-Status, eine gleichartige Tendenz: Eine Kombination von TQ und 5-FU führt partiell zu besseren Effekten. In den HCT116 Zellen zeigt sich dies bei einer Vorbehandlung mit 40µM TQ und Inkubation mit 5-FU für 24h (Kombination I). Hier war die Reduktion der metabolischen Aktivität den jeweiligen Einzelbehandlungen deutlich überlegen, auch im Vergleich zu einer höheren 5-FU Dosierung. Bereits in anderen Studien zeigte sich, dass Thymoquinon in Verbindung mit chemotherapeutischen Substanzen zu einer Steigerung der Antitumoraktivität führt. Auch in nichtkleinzelligen Lungenkarzinomzellen konnte ein verbesserter Antitumoreffekt durch eine Kombination von TQ mit Cisplatin erreicht werden (Jafri et al. 2010). Bei multiplen Myelomzellen potenzierte TQ den apoptotischen Effekt von Thalidomid und Bortezomib (Li et al. 2010).

Bei den HCT116 Zellen ist in der Kombinationsvariante II, selbst bei höheren TQ- und 5-FU-Dosierungen, dieser Effekt nicht zu beobachten. Hier ist die äquivalente 5-FU Einzelbehandlung überlegen. Es ist bekannt, dass TQ in HCT116 Wildtyp-Zellen einen G1-Arrest induziert (Gali-Muhtasib et al. 2004a). Möglicherweise führt eine Kombinationsbehandlung hier, aufgrund des funktionsfähigen p53, zu einem noch ausgeprägteren Zellzyklusarrest, der womöglich die Zellen vor Apoptose schützt. Vielleicht ist aber auch der TQ-Umsatz in diesen Zellen höher, sodass dieses nach entsprechender Zeit erneut zugegeben werden müsste. Bei den HCT116 null-Zellen sind die Effekte in der Kombinationsvariante II mit 40µM TQ zwar auch den 5-FU Einzelbehandlungen unterlegen, allerdings ist hierbei die Differenz der jeweiligen Ergebnisse geringer als bei den HCT116 Wildtyp-Zellen. Somit lässt sich vermuten, dass im Rahmen einer längeren Inkubationszeit letztlich der Einfluss des p53 Proteins eine maßgebliche Rolle für das Ausmaß der Reduzierung der metabolischen Aktivität spielt.

In den HT29 Zellen stellt sich nun ein etwas anderes Bild dar. Hier führen die unterschiedlichen Kombinationsvarianten zu einer beinahe monotonen, zeit- und dosisabhängigen Reduktion der metabolischen Aktivität. Dabei sind zum einen die Kombinationen den äquivalenten Einzelergebnissen überlegen. Zum anderen ist die metabolische Aktivität in den Kombinationen geringer, als bei einer Einzelbehandlung mit höherer 5-FU Konzentration. Auch bei der Untersuchung im Colony Formation Assay zeigt die Kombination von 40µM TQ und 1µM 5-FU gleichwertige Effekte auf das Zellwachstum und die Koloniebildung wie eine alleinige Behandlung mit einer 10fach höheren 5-FU Konzentration. Somit scheint Thymoquinon die Antitumoraktivität von 5-Fluorouracil auf Zellen mit einem mutierten p53 zu erhöhen. Auch bei einer Untersuchung an Pankreaskarzinomzellen, die eine *de novo* oder erworbene Resistenz gegenüber den Chemotherapeutika Gemcitabine und Oxaliplatin aufweisen, zeigte sich, dass eine Präinkubation mit TQ die zytotoxischen Eigenschaften dieser Substanzen erhöht (Banerjee et al. 2009).

Die Auswirkungen einer Kombinationsbehandlung auf Zellen mit einem mutierten p53 Protein sind somit verschieden im Vergleich zu Zellen, die gar kein p53 besitzen. Dies könnte mit einer partiellen Restfunktion oder auch mit den neuartigen Funktionen, den sogenannten „gain of function“, zusammenhängen. Bei über 50% der humanen Tumorzellen liegt eine p53 Mutation vor, die neben einer Tumorprogression auch zur Resistenzentwicklung gegenüber herkömmlichen Chemotherapeutika führt und daher mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Aufgrund dieser Aspekte lag der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Ermittlung der genauen antineoplastischen Effekte einer Kombinationsbehandlung auf kolorektale Zellen mit einem mutierten p53.

### **4.2. Die Auswirkungen einer Kombinationsbehandlung auf den Zellzyklus**

Mehrere Studien haben gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der Regulation des Zellzyklus und Tumoren besteht und dass somit die Inhibition des Zellzyklus ein wichtiges Ziel bei der Tumorbehandlung darstellt (Gali-Muhtasib et al. 2004a).

Über die Fähigkeit von TQ, die Zellzyklusprogression zu blockieren, gibt es diverse Untersuchungen. Dabei zeigte sich, dass die Vermittlung eines Zellzyklusarrestes einen wichtigen Mechanismus in der Antitumoraktivität von TQ darstellt. Hierbei ist der jeweils induzierte Arrest abhängig von der untersuchten Zelllinie. So führt eine TQ-Behandlung bei Maus-Papillomtumorzellen zum G0/G1-Arrest durch eine vermehrte Expression des Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitors p16 sowie eine Reduzierung der Cyclin D1 Proteinexpression (Gali-Muhtasib 2004b). Bei akuten lymphatischen Leukämiezellen (Jurkat-Zellen) mit einem mutierten p53 führte TQ über einen p73-abhängigen Signalweg zu einem G0/G1-Arrest (Alhosin et al. 2010). In anderen Tumorzellen, wie Maus-Spindelkarzinomzellen und MCF-7/DOX Doxorubicin-resistenten Brustkrebszellen, induziert TQ einen G2/M-Arrest (Gali-Muhtasib et al. 2004b, Arafa et al. 2011).

In den vorliegenden Experimenten zeigte sich bei der Zelllinie HT29 nach TQ-Behandlung kein Effekt auf den Zellzyklus im Sinne eines Arrestes. Möglicherweise ist die Zelllinie aufgrund des mutierten p53 weniger sensitiv gegenüber einem TQ-vermittelten Zellzyklusarrest. Die Arbeitsgruppe von Gali-Muhtasib zeigte an Kolonkarzinomzellen, dass dem p53-Status ein wichtiger Stellenwert in Bezug auf die Tumorzellantwort nach einer TQ-Behandlung zukommt. So sind p53 null Zellen im Vergleich zu wt-p53 Zellen deutlich geringer sensitiv gegenüber einem Substanzvermittelten Wachstumsarrest (Gali-Muhtasib et al. 2006). Allerdings konnten Roepke et al. in ihrer Studie an Osteosarkomzellen mit einem mutierten p53 und einer in der vorliegenden Studie gleichzusetzenden TQ-Konzentration einen G2/M-Arrest nachweisen (Roepke et al. 2007).

Ebenso wie in den Einzelbehandlungen zeigte TQ auch in Kombination mit 5-FU keinen Zellzyklusarrest, der dieser Substanz zuzuschreiben wäre. In beiden Untersuchungszeiträumen, 48h bzw. 72h Gesamtbehandlungsdauer, liegt ein S-Phasearrest vor, der vornehmlich durch 5-FU, einer S-Phase aktiven Substanz, induziert wird. Auffallend ist, dass der Arrest in der Kombination etwas geringer ausfällt, als in der Einzelbehandlung mit 5-FU. Möglicherweise wirkt TQ hier dem 5-FU vermittelten S-Phase-Arrest entgegen.

Aufgrund des fehlenden TQ-induzierten Zellzyklusarrestes wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, um mögliche Veränderungen auf Proteinebene zu ermitteln.

#### **4. 2.1. Der Einfluss von Thymoquinon auf die Proteinexpression von p53 und p21**

Das Tumorsuppressorgen p53 ist der Hauptaktivator für die Transkription von p21, einem Cyclin-abhängigen Kinase-(Cdk) Inhibitor, der die Zellzyklusprogression negativ moduliert und die DNA Synthese blockieren kann (Gartel et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit führten sowohl die TQ wie auch die 5-FU Einzelbehandlung zu einer Erhöhung der p53- und p21<sup>WAF1</sup>-Proteinexpression. Neben einem Beibehalten dieses Effektes auch im Rahmen der Kombinationsbehandlung zeigte sich hier zudem eine auffallend stärkere Expression des p21<sup>WAF1</sup> Proteins im Vergleich zu p53 (siehe Abb. 33). Dieser Effekt könnte durch verschiedene Mechanismen erklärt werden: Zum einen könnte die Expressionssteigerung von p21<sup>WAF1</sup> unabhängig von p53 verlaufen. Für diese Hypothese spricht, dass zwar in den Einzelbehandlungen die Expression von p21<sup>WAF1</sup> analog der von p53 steigt, aber im Rahmen der Kombination in einem deutlich stärkeren Ausmaß, als es bei einer p53-abhängigen Induktion zu erwarten wäre. Zum anderen könnte aber auch das mutierte p53 noch die Fähigkeit besitzen auf transkriptioneller Ebene das Zielgen p21<sup>WAF1</sup> zu induzieren.

Da sich der Effekt der Expressionssteigerung von p21<sup>WAF1</sup> besonders deutlich in der Kombinationsbehandlung zeigt, ist anzunehmen, dass hier vor allem der Einfluss von TQ eine wichtige Rolle spielt. Auch Roepke et al. belegten in ihren Untersuchungen an Osteosarkomzellen mit einem mtp53, dass die Thymoquinon-Behandlung zu einer leichten Hochregulierung von p21<sup>WAF1</sup>, allerdings in Konsequenz auch zu einem G2/M-Arrest führt (Roepke et al. 2007), der hier an den HT29 Zellen nicht nachzuweisen war.

Die Rolle von p21<sup>WAF1</sup> stellt sich in der Literatur recht komplex dar.

Humane HCT116 Kolonkarzinomzellen zeigen nach Adriamycin-Behandlung einen Zellzyklusarrest, wohingegen p21-null HCT116 Zellen nach der gleichen Behandlung in die Apoptose übergehen. Hier bewahrte die Expression von p21 die Zellen vor der Adriamycin-induzierten Apoptose (Gartel et al. 2002). Es scheint, dass p21 eine wichtige Rolle beim Schutz der Zellen vor der Apoptose spielt. So führt eine künstliche Expression von p21<sup>WAF1/CIP1</sup> zur Apoptosehemmung während der Myozytendifferenzierung (Wang et al. 1996). In einer anderen Untersuchung zeigten sich p21<sup>WAF1/CIP1</sup>(-/-) Zellen sowie Zellen, deren p21<sup>WAF1/CIP1</sup> Expression herunterreguliert wurde, im Hinblick auf die Apoptose deutlich empfindlicher gegenüber einer Behandlung mit Prostaglandine A2 oder ionisierenden Strahlen als die Wildtypzellen (Gorospe et al. 1996).

Die Fähigkeit zur Proliferationsinhibition von p21 trägt zu seiner tumorsuppressiven Funktion bei. Daher ist es nicht verwunderlich, dass eine Reihe von Onkogenen p21 hemmen, um somit das Zellwachstum und die Tumorgenese zu fördern. Auf der anderen Seite ist p21 auch ein Inhibitor der Apoptose, somit kann dessen Repression einen Antitumoreffekt als Folge haben (Gartel et al. 2005).

Verschiedene Arten von zellulärem Stress können über p53-abhängige und –unabhängige Mechanismen zur Induktion der p21-Expression führen. Der p21-induzierte Wachstumsstopp kann die Zellen schützen und Apoptose inhibieren. Jedoch haben eine Reihe von Studien auch gezeigt, dass p21 unter gewissen Umständen in spezifischen Systemen auch proapoptotische Funktionen besitzt (Gartel et al. 2002). So bewirkt eine p21 Überexpression in Gliom- und Ovarialkarzinomzellen die Erhöhung der apoptotischen Antwort gegenüber dem Chemotherapeutikum Cisplatin (Kondo et al. 1996, Lincet et al. 2000).

Die genaue Funktion von p21 bleibt trotz diverser Studien weiterhin unklar. Allerdings weisen die unterschiedlichen Ergebnisse der Untersuchungen darauf hin, dass p21, in Abhängigkeit von der verwendeten Substanz und der untersuchten Zelllinie, entweder zytoprotektive oder proapoptotische Eigenschaften besitzt.

In einer Studie an HT29 Kolonkarzinomzellen führte die Überexpression von p21<sup>Cip1/Waf1</sup> zu einer beträchtlichen Wachstumsinhibition in Monolayer- und Softagarkulturen, wohingegen die durch 5-FU induzierte Apoptose nicht beeinträchtigt wurde (Izawa et al. 2005). An den in der vorliegenden Arbeit untersuchten HT29 kommt es in der Kombinationsbehandlung ebenfalls zu einer vermehrten p21 Expression sowie einer deutlichen Inhibition von Zellzahl und Kolonienbildung im Colony Formation Assay. Zugleich konnte zeitabhängig ein deutlicher Anstieg der subG1-Phase auf insgesamt 12,82% (siehe Abb. 32) verzeichnet werden, der möglicherweise in Zusammenhang mit der erhöhten Proteinexpression von p21 steht.

In einer Studie an Mammakarzinomzelllinie mit einem mutierten p53 induzierte eine Proteintyrosinkinase über einen p53-unabhängigen Mechanismus den Anstieg des p21 und Bax Proteinlevels, wobei die p21 Expression mit der Induktion des proapoptotischen Proteins Bax korreliert und letztlich zur Einleitung der Apoptose führt (Li et al. 1999). In p53-defizienten humanen Hepatomazelllinie führte die Überexpression von p21 zur Induktion des proapoptotischen Proteins Bax und zur Modulierung der Bcl-2/Bax Ratio. Es zeigte sich dabei auch, dass die p21 Überexpression keine Auswirkung auf die Zellzyklusprogression hatte. Während des Zelltodes erfolgte eine entgegengesetzte Regulierung der Bcl-2 und p21 Expression. Anhand der Ergebnisse wurde angenommen, dass p21 einen indirekten Einfluss entweder auf die Induktion oder die Protektion des Apoptose ausübt, abhängig vom Zelltyp, den Wachstumsbedingungen und den einwirkenden Stimuli (Kang et al. 1999).

### 4.2.2. Thymoquinon und Chk1

Einen weiteren interessanten Hinweis auf die Modulation des Zellzyklus zeigte sich in Bezug auf die Expression des Proteins Chk1.

Wie bereits ausführlich geschildert, führt eine DNA-Schädigung bei normalen proliferierenden Zellen zum Zellzyklusarrest, in dem die DNA repariert und so das Genom stabilisiert und geschützt wird. Neben p53 ist dieser Zellzyklusarrest noch von einem weiteren Netzwerk abhängig, in dem Chk1 eine entscheidende Rolle spielt.

Chk1 (checkpoint kinase 1) ist eine Serin/Threonin Kinase und der Hauptvermittler der Zellzykluskontrollpunkte und reguliert die S- und G2/M-Checkpoints. Es unterliegt den zahlreichen Facetten der Regulierung, wie der transkriptionellen Suppression durch p53 und der Ubiquitin-abhängigen Degradierung (Tse et al. 2007). Chk1 wird über einen DNA-Schaden, wie Doppelstrangbrüche, aktiviert. Während der DNA Schädigung führt eine ATM/ATR-vermittelte Phosphorylierung zur Aktivierung von Chk1. Das aktivierte Chk1 phosphoryliert und inaktiviert die Proteinphosphatase Cdc25 und verhindert so die Aktivierung seines nachgeschalteten Targets Cdc25 Kinase, das für den G2/M Übergang verantwortlich ist (Peng et al. 1997, Sanchez et al. 1997). In verschiedenen Studien wurde der Effekt

einer Inhibition von Chk1 untersucht und es zeigte sich, dass dadurch die zytotoxischen Eigenschaften u. a. von Chemotherapeutika gesteigert werden können. Xiao et al. konnten bei Untersuchungen an humanen Zervix- und Lungentumorzelllinien nachweisen, dass die Chk1 Phosphorylierung eine indirekte Konsequenz der 5-FU Behandlung ist und die Herunterregulierung von Chk1 zur Steigerung der 5-FU Effizienz führte. Zum einen erfolgte diese chemotherapeutische Potenzierung durch die Induktion der sogenannten premature chromosomal condensation (PCC). Allgemein beschreibt PCC das abnormale Phänomen chromosomaler Kondensation aufgrund inkompletter DNA Replikation oder unreparabler DNA-Schäden. Dadurch wurde im weiteren Verlauf die Apoptose induziert. Zum anderen wurde eine mitotische Katastrophe induziert, ein spezifischer Typ von Zelltod, der gewöhnlich bei einem unreparablen DNA Schaden oder defekten Mikrotubulistrukturen auftritt. Die Potenzierung der 5-FU Wirkung durch die Chk1 Inhibition erfolgte in dieser Studie über den Caspase-8 Signalweg (Xiao et al. 2005).

Auch Robinson et al. konnten in einer Untersuchung an B-Lymphom-Zellen nachweisen, dass es infolge einer Behandlung mit 5-FU wirksam zu einer relativ raschen Aktivierung von Chk1 kommt, die mit einer ausgeprägten Akkumulation der Zellen in der S-Phase korrelierte. Die durch 5-FU getriggerte Chk1-abhängige Checkpoint Reaktion führt zu einer Verlangsamung der allgemeinen Rate der DNA Replikation noch bevor die Nukleotidpool Depletion die DNA Polymerase Aktivität hemmte. In einem *clonogenic survival assay* zeigten sich Chk1 *-/-* Zellen wesentlich sensitiver gegenüber einer 5-FU Behandlung als die wt-Zellen (Robinson et al. 2006).

In einer Studie an HCT116 wtp53 Zellen konnte gezeigt werden, dass bei diesen als Reaktion auf eine TQ-Behandlung eine p53-Bindung am Chk1 Promoter auftritt. Daher wurde angenommen, dass die p53-abhängige Chk1 Inhibition durch die Wirkung von TQ der allgemein verantwortliche Mechanismus bei der Apoptose-induktion in kolorektalen Tumoren ist. Zugleich fand sich bei *in vivo* Untersuchungen an humanem Kolonkarzinomgewebe mit einem gut charakterisierten Mutationsstatus für p53 ein signifikant höherer Gehalt an Chk1 mRNA und Protein, mit einer zusätzlich nur geringen Caspase-3 Aktivierung (Gali-Muhtasib et al. 2008).

In den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich, dass die Inkubation der HT29 Zellen mit 5-FU einen Anstieg des Chk1 Proteinlevels zur Folge hat. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte das Ergebnis des Proteingehaltes von H2AX liefern. H2AX ist ein Indikator für DNA Doppelstrangbrüche. Infolge eines DNA-Schadens kommt es zur Phosphorylierung zur Bildung von  $\gamma$ -H2AX, dieses ist für die Rekrutierung von Komponenten der DNA Reparatur an den Ort des Schadens verantwortlich (Roepke et al. 2007). Dadurch kann der Umfang der DNA-Schädigung ermittelt werden. Die Behandlung der Zellen mit 5-FU zeigte einen deutlichen Anstieg des Proteingehaltes von H2AX und lässt vermuten, dass eine erhebliche DNA-Schädigung vorliegt, die im Folgenden zur Aktivierung von Chk1 führt. Nach TQ-Behandlung zeigte sich eine deutlich geringere Proteinexpression von H2AX. Somit liegt nach TQ-Einzel- und in Kombinationsbehandlung eine geringe DNA-Schädigung vor. Dies ist auf das antioxidative Potential von TQ zurückzuführen: es ist ein potenter Radikalfänger verschiedener ROS, wie der Superoxidanionen-Radikale und kann die mikrosomale Lipidperoxidation inhibieren (Nagi et al. 2000, Mansour et al. 2002).

Eine alleinige Behandlung der Zellen mit TQ führt kaum zu einer Veränderung der H2AX Expression im Vergleich zur Kontrolle. Gleichzeitig zeigte die Kombinationsbehandlung eine Reduktion des Chk1-Proteinlevels, die allerdings weniger stark ausgeprägt ist, im Vergleich zur alleinigen TQ-Behandlung. Möglicherweise wirkt hier die DNA-schädigende Wirkung von 5-FU dem Effekt entgegen. Der Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle erwähnt, dass in der vorliegenden Arbeit die Veränderungen der Expression von p-Chk1, der phosphorylierten aktiven Kinase von Chk1, nicht untersucht wurden.

Viele Antitumor-Medikamente induzieren Schäden an der DNA und aktivieren dadurch die Zellzyklus-Checkpoints. Der Zellzyklusarrest, der eigentlich zum Schutz der Zellen infolge eines DNA-Schadens dient, ermöglicht den Tumorzellen ihre geschädigte DNA zu reparieren. So könnte eine Aufhebung von Zellzyklus-Checkpoints in Tumorzellen vor Abschluss der DNA-Reparatur die apoptotische Kaskade aktivieren und so zum Zelltod führen (Schwartz et al. 2005) oder die Zellen gegenüber DNA-schädigenden Substanzen sensibilisieren (Shao et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit zeigte die Kombinationsbehandlung keinen Einfluss auf den Zellzyklus. Zwar kommt es zu einer vermehrten p21 Expression, dies bleibt allerdings ohne Folge für die Zellzyklusprogression. Gleichzeitig wird sogar die Checkpoint Kinase 1 (Chk1) herunterreguliert, sodass ein Zellzyklusstop in der G2/M-Phase verhindert wird. In der Kombinationsbehandlung ist lediglich ein 5-FU vermittelter S-Phase-Arrest zu verzeichnen, der allerdings geringer ist, als in der Einzelbehandlung.

#### **4.3. Die Auswirkungen einer Kombinationsbehandlung auf Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges**

Die Apoptose (auch: programmierter Zelltod) spielt eine grundlegende Rolle in vielen physiologischen Abläufen und Entwicklungsstadien, wie der Gewebehomöostase und der Zellzahlkontrolle (Arepalli et al. 2009). Störungen der Apoptose bedingen eine Reihe von Erkrankungen, wie die Entstehung von Tumoren (Ray et al. 2006). Die Regulierung und somit Induktion der Apoptose und apoptotischer Signalwege durch Substanzen stellt somit einen wichtigen Ansatz in der Tumorbehandlung dar (Li et al. 2007).

Der Transkriptionsfaktor p53 ist in vielen humanen Tumoren mutiert und viele seiner direkten Zielgene, wie Bax, Bid und die BH3-only Proteine PUMA und NOXA, sind proapoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie. Jede Schädigung der p53 Funktion führt zur Deregulation der Apoptose-Signalwege (Cotter et al. 2009). Eine deaktivierte Apoptose ist ein pathologisches Ereignis, das zur Onkogenese und Tumorprogression führt (Kroemer et al. 2007).

Die TQ-induzierte Apoptose kann über p53-abhängige und –unabhängige Signalwege erfolgen. Eine wichtige Bedeutung kommt hierbei den Mitochondrien zu.

Untersuchungen an sogenannten *primary effusion lymphoma* Zellen, einem Subtyp des Non-Hodgkin B-Zell-Lymphoms, haben erbracht, dass eine TQ-Behandlung zur Bildung von ROS und im Folgenden zur Induzierung der Apoptose führt. Hierbei vermittelt TQ eine Konformationsänderung von Bax, das Protein transloziert an die Mitochondrienmembran und führt schließlich zur Änderung des Membranpotentials. Durch eine Vorbehandlung der Zellen mit einem universellen Caspaseinhibitor kam es nicht zur Blockierung der TQ-abhängige Konformationsänderung von Bax. Hingegen konnte die Konformationsänderung durch den potenten Radikalfänger N-acetylcystein blockiert werden. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass der TQ-induzierte Verlust des mitochondrialen Membranpotentials von der ROS-Bildung abhängig ist und die Konformationsänderung des proapoptotischen Proteins Bax vor der Aktivierung der Caspasekaskade erfolgt (Hussain et al. 2011).

In einer Studie an p53-null myeloblastischen Leukämiezellen (HL-60 Zellen) wurde gezeigt, dass die Aktivierung der Caspase-8 verantwortlich ist für zwei wichtige nachfolgende Ereignisse: die Aktivierung der Caspase-3 und die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Somit scheinen die Mitochondrien eine (wichtige) Rolle bei der TQ-vermittelten Apoptose zu spielen. Darüber hinaus moduliert TQ die Bax/Bcl-2 Ratio durch eine Hochregulierung des proapoptotischen Bax und eine Herunterregulierung des antiapoptotischen Bcl-2. Durch die Verminderung des anti-apoptotischen mitochondrialen Proteins Bcl-2 wurde zudem die Cytochrom c Freisetzung begünstigt. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen,

dass Thymoquinon in dieser Zelllinie die Apoptose p53-unabhängig induziert (El-Mahdy et al. 2005).

Dahingegen erbrachten die Untersuchungen an humanen Kolonkarzinomzellen mit einem wt-Status für p53, dass eine TQ-Behandlung zu einer signifikanten Inhibition des antiapoptotischen Bcl-2 Proteins führt. HCT116(-/-) Zellen zeigen eine deutlich geringere Sensitivität gegenüber der TQ-vermittelten Apoptose. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass die TQ-Wirkung p53-abhängig ist (Gali-Muhtasib et al. 2006).

TQ besitzt die Fähigkeit, verschiedene molekulare Ziele in diversen Signalwegen zu modulieren. So supprimiert TQ in humanen myeloischen Zellen NF- $\kappa$ B-regulierte Genprodukte, wie IAP1, IAP2, Bcl-2, Bcl-xL u. a. (Sethi et al. 2008). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass TQ in Pankreas-Adenokarzinomzellen zur Inhibition der konstitutiven und TNF- $\alpha$ -induzierten Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt sowie die Translokation von NF- $\kappa$ B zum Nukleus der Zellen verhindert. Zusätzlich blockiert TQ die Transkription von NF- $\kappa$ B über die Reduzierung seiner Promotor Aktivität. Somit scheint TQ bei diesen Zellen einen dualen inhibitorischen Effekt auszuüben: Zum einen über die Inhibition des NF- $\kappa$ B-Signalweges und zum anderen über die Inhibition seiner Transkription (Chehl et al. 2009).

Eine andere Studie hat gezeigt, dass TQ die Aktivierung der Signalwege AKT und ERK inhibieren kann. Unter den endothelialen Zellsignalwegen, die für die Regulierung von Zellmigration, Proliferation, Wachstum und Überleben verantwortlich sind, stellen diese beiden *pathways* zwei Hauptsignalwege dar. *In vitro* und *in vivo* kam es zu einer effektiven Inhibition der Angiogenese. Im Xenograft-Modell konnte zudem das Tumorstadium durch eine Blockade der Tumorangio-genese verhindert werden (Yi et al. 2008).

Um den Mechanismus hinter der proapoptotischen Wirkung der Einzelsubstanzen Thymoquinon und 5-FU sowie der Kombination auf die Kolonkarzinomzellen genauer zu ermitteln, wurde die Expression verschiedener apoptoseregulierender Proteine untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte zwar eine Hochregulierung des Bax-Proteins bei der Einzelbehandlung mit TQ sowie in Kombination nicht ermittelt werden, allerdings kam es im Vergleich zur Kontrolle und der 5-FU Einzelbehandlung zu einer leichten Verminderung des Bcl-2 Proteinlevels. In der Kombinationsbehandlung ist dieser Effekt noch etwas stärker ausgeprägt. In der Folge ist ein leichter Anstieg der Bax/Bcl-2 Ratio zu verzeichnen. Das lässt vermuten, dass dies ein möglicher Mechanismus in der TQ-vermittelten Apoptose sein könnte. Als weiterer Hinweis für eine mitochondriale Dysfunktion kommt es in der Kombinationsbehandlung zu einem leichten Anstieg der Cytochrom c Proteinexpression sowie einer vermehrten Expression und Spaltung der Procaspase 9.

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass für eine genauere Verifizierung der Cytochrom c Freisetzung eine Auftrennung in eine mitochondriale und eine zytosolische Fraktion nach entsprechender Behandlung erforderlich wäre.

Eine Herunterregulierung der Bcl-2 Proteinexpression und ein Anstieg der Bax/Bcl-2 Ratio nach TQ-Behandlung wurde auch in myeloischen Leukämiezellen, Osteosarkomzellen und Brustkrebszellen beschrieben (El-Mahdy et al. 2005, Roepke et al. 2007, Woo et al. 2011). Auch in Zervixkarzinomzellen konnte dieser Effekt nachgewiesen werden, wobei hier die Zytotoxizität von TQ zu einem Anstieg der p53 Aktivität führte und die Apoptoseinduktion somit in p53-abhängiger Weise vermittelt wird. Interessanterweise zeigte sich in der Studie auch, dass TQ im Vergleich zu Cisplatin zu einer deutlich geringeren Schädigung von Normalgewebe führt (NG et al. 2011).

Bezüglich des Chemotherapeutikums 5-FU ist bekannt, dass bei der Induzierung der Apoptose in kolorektalen Tumorzellen der mitochondriale und der Caspase-8-abhängige Signalweg involviert sind. Bei der Vermittlung des mitochondrialen Signalweges kommt es dabei zur Cytochrom c Freisetzung und nachfolgender Aktivierung von Caspase-9 und -3 (Sun et al. 2002). In einer Untersuchung an Magenkarzinomzellen kam es nach 5-FU Behandlung zu einem Abfall der Bcl-2 und einem Anstieg der Bax Proteinexpression. Zudem konnte die Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom c in die zytosolische Fraktion und die Stimulation der Caspase-3 und -9 Aktivität nachgewiesen werden (Lei et al. 2012).

Auch in den vorliegenden Untersuchungen führt die 5-FU Behandlung zu einer minimalen Aktivierung des Caspase-8 Signalweges. Zusätzlich zeigt sich ein Anstieg der Cytochrom c Proteinexpression und eine Aktivierung der Caspase-3 und -9. Allerdings kommt es nicht zu einer proapoptotischen Modulierung der Bax/Bcl-2 Ratio. Somit scheint hier 5-FU auf anderem Wege in die mitochondriale Balance einzugreifen, womöglich durch eine direkte DNA-schädigende Wirkung.

Die TQ-induzierte Aktivierung des mitochondrialen Signalweges bei HT29 Zellen lässt sich noch auf eine andere Weise, als dessen Einfluss auf die Proteinexpression von Bax und Bcl-2 und die Modulierung der Ratio erklären. So induziert die Einzelbehandlung mit TQ als auch die Kombination mit der Substanz 5-FU eine Spaltung und Aktivierung des zytosolischen Proteins BID.

BID ist ein proapoptotisches Protein, das zur Bcl-2 Familie gehört und sowohl an das proapoptotische Bax, als auch an das antiapoptotische Bcl-2 binden kann. Während der Apoptose kann BID nicht nur durch Caspase-8 infolge des Todesrezeptorsignalweges gespalten werden, sondern auch durch andere Caspasen, Granzym B, Calpain (calpains) und Cathepsin. Das Protease-gespaltene BID transloziert zu den Mitochondrien, wo es die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran induziert und so als Wächter des Protease-vermittelten Todessignals fungiert (Billen et al. 2008). Das gespaltene Fragment von BID (t-BID), als BH3-only Aktivatorprotein, interagiert mit Bax und triggert die Translokation von Bax an die Mitochondrien, gefolgt von dessen Insertion in die äußere Mitochondrienmembran, Oligomerisierung und schließlich Freisetzung von Proteinen im inneren Membranraum (Danial et al. 2004). Allerdings ist t-BID nicht zwingend erforderlich für die Aktivierung von Bax. Untersuchungen haben gezeigt, dass Bax auch in Abwesenheit von BH3-only Proteinen an Mitochondrien binden und diese permeabilisieren kann, jedoch kann t-BID diesen Prozess beschleunigen (Ott et al. 2009).

Trotz Aktivierung der Caspase-8 nach 5-FU Einzelbehandlung kommt es hier nicht zu einer nachfolgenden Spaltung von BID. Der Mechanismus, über den zytotoxische Substanzen oder anderer zellulärer Stress zur Cytochrom c Freisetzung führen, ist bislang nicht vollständig geklärt. Allerdings ist bekannt, dass über diese Freisetzung die Caspase-3 aktiviert wird, die über einen Feedback-Mechanismus zur Spaltung von BID führen kann und somit die weitere Cytochrom c Freisetzung getriggert wird. Allerdings kann dieser Mechanismus durch eine Überexpression von Bcl-2 blockiert werden (Slee et al. 2000). Auch in der vorliegenden Arbeit kommt es nach 5-FU Behandlung zu einem Anstieg der Bcl-2 Expression, die möglicherweise verantwortlich ist für die ausbleibende BID Spaltung und Aktivierung.

Letztlich stellen sich die pro- und antiapoptotischen Vorgänge an den Mitochondrien sehr komplex dar und beinhalten neben den hier untersuchten Proteinen noch eine ganze Reihe weiterer Faktoren. In den letzten 10 Jahren gab es eine Fülle an Untersuchungen über den molekularen Signalweg, der zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran führt. Dabei zeigte sich, dass die Proteine der Bcl-2 Familie eine entscheidende Rolle bei der Regulierung und der Ausführung dieses

Prozesses spielen. So wurden bis jetzt drei verschiedene Arten von Proteinen dieser Familie identifiziert:

1. die proapoptotischen Vermittler Bax und Bak
2. die antiapoptotischen Effektoren, besonders Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> und Mcl-1
3. eine Reihe von Bcl-2 homologe Domäne (homology domain) 3 (BH3-only) Proteinen, wie BID, Noxa oder Puma, die entweder pro- und antiapoptotische Proteine kontrollieren oder nur ein spezifisches Mitglied einer Gruppe (Youle et al. 2008).

Der exakte Mechanismus und das Zusammenspiel der verschiedenen Proteine ist weiterhin Teil lebhafter Diskussionen.

Die in der vorliegenden Arbeit erbrachten Ergebnisse der Untersuchungen auf Proteinebene lassen darauf schließen, dass TQ die Apoptose in der H29 Zelllinie über die Aktivierung des intrinsischen Signalweges induziert und somit der Einfluss dieser Substanz auf die Mitochondrien eine entscheidende Rolle bei der Apoptosevermittlung spielt. Auch die Ergebnisse des MTT-Assay lassen vermuten, dass TQ die mitochondriale Funktion, d. h. die mitochondriale Aktivität, reduziert und sich dieser Effekt in Kombination mit der Substanz 5-FU potenziert.

Eine Erklärung für die Fähigkeit von TQ die mitochondriale Funktion zu verändern, liefert die Studie von Roepke et al., in der die Modulation der O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Bildung durch TQ an isolierten Mitochondrien aus Rattenlebern untersucht wurde. Dabei zeigte sich, dass diese Substanz dosisabhängig zu einer potenten Induzierung der mitochondrialen O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Bildung führte und so der TQ-induzierte mitochondriale Apoptoseweg im Rahmen seiner Fähigkeit, oxidativen Stress in Mitochondrien zu erhöhen, interpretiert wurde (Roepke et al. 2007). Diese Aussage steht allerdings in Konflikt mit anderen Untersuchungen, die zeigten, dass Thymoquinon ein potentes Antioxidant und ein Radikalfänger verschiedener Sauerstoffspezies ist (Badary et al. 2003). Sauerstoffradikale, vor allem Sauerstoffoxide, verursachen p53 Genmutationen, chromosomale Veränderungen und die Aktivierung von Signalwegen, die für das Zellwachstum mitverantwortlich sind. Für TQ konnten inhibitorische Effekte auf die Superoxidanionen- und Stickstoffoxidproduktion gezeigt werden, die verantwortlich sind für das Tumorstadium (Mansour et al. 2002, El-Mahmoudy et al. 2002, El-Mahmoudy et al. 2005). Die Fähigkeit von TQ sich in die innere Mitochondrienmembran einzubauen lässt zudem vermuten, dass es ähnlich wie Ubiquinon, ein mobiler Elektronencarrier der mitochondrialen Atmungskette, arbeitet und somit anti- und prooxidative Aktivität besitzt (Nohl et al. 2003).

An einer Reihe unterschiedlicher humaner Kolonkarzinomzellen konnte das prooxidative Potential von TQ durch die Verursachung von oxidativem Stress aufgrund von ROS-Bildung nachgewiesen werden. Die hierbei ermittelten antiproliferativen Effekte sowie die Induktion der Apoptose verschwanden nach Behandlung mit dem starken Antioxidant N-acetylcystein. Die TQ-induzierte ROS-Bildung und der daraus resultierende oxidative Stress führte in den Untersuchungen zur Aktivierung des ERK und JNK Signalweges. ERK (extracellular signal-regulated kinase) und JNK (c-jun N-terminal kinase) sind zwei Untergruppen des MAP Kinase Signalweges. Die Mitglieder der MAPK-Familie spielen eine Schlüsselrolle in der Regulierung von Zellprozessen, wie Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Es wurde angenommen, dass die Hochregulierung von ERK und JNK in dem Bestreben erfolgte, dem schädigenden Einfluss der TQ-Behandlung zu umgehen. Allerdings konnte eine Überlebensfähigkeit auf die Zellen nicht übertragen werden und so durchliefen sie die Apoptose. Dieser antineoplastische Effekt von TQ konnte durch eine Vorbehandlung mit einem ERK- und JNK-Inhibitor verstärkt und durch Vorbehandlung mit einem Radikalfänger beseitigt werden. In dieser Studie fand sich darüber hinaus auch eine Erklärung für die besondere Resistenz

der HT29 Zellen. Diese Zellen besitzen große Menge des Quinon-reduzierenden Enzyms DT-Diaphorase. Aufgrund der ausbleibenden ROS-Produktion waren die Zellen letztlich resistenter gegenüber der TQ-Behandlung. Durch Behandlung mit einem DT-Diaphorase-Inhibitor konnten die HT29 Zellen bezüglich TQ sensibilisiert werden (El-Najjar et al. 2010).

Auch in Pankreaskarzinomzellen konnte ein gleichsinniger Effekt auf Untergruppen der MAPK-Familie beobachtet werden. Hier führte eine TQ-Behandlung zur Herunterregulierung von Mucin4, einem membrangebundenen Muzin, das zur Regulierung der Differenzierung, der Proliferation und der Metastasierung von Pankreaskarzinomzellen beiträgt. Dieser Effekt stand in direktem Zusammenhang mit der Aktivierung des JNK und p38 MAPK Signalweges. Auch hier wurde vermutet, dass die TQ-stimulierte Bildung von ROS zur Aktivierung des JNK Signalweges und zur Induzierung der Apoptose führt (Torres et al. 2010).

In der Gesamtschau haben die diversen Studien gezeigt, dass die biologischen Effekte von TQ je nach untersuchter Karzinomzelllinie sehr unterschiedlich sein können, da sie unterschiedliche Mechanismen der Substanzmetabolisierung besitzen. Daher bleibt letztlich auch der genaue biochemische Mechanismus von TQ im Hinblick auf den durch oxidativen Stress induzierten Schaden an den Mitochondrien zum jetzigen Zeitpunkt weiterhin nicht vollständig geklärt.

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass eine Kombinationsbehandlung von Thymoquinon und 5-Fluorouracil das Wachstum von Kolonkarzinomzellen mit einem mutierten Tumorsuppressor p53 hemmt und die mitochondriale Aktivität deutlich vermindert. Die Effekte sind einer 5-FU Einzelbehandlung in höherer Konzentration überlegen. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass mittels einer kombinierten Behandlung die verwendete Dosierung des Chemotherapeutikums 5-FU reduziert werden könnte bei zumindest gleichwertigem antiproliferativem Effekt. Einen möglichen Mechanismus hinter dieser Wirkung stellt die Induktion proapoptotischer und die Inhibition anti-apoptotischer Proteine sowie die Aktivierung und Potenzierung des mitochondrialen Apoptoseweges dar. Zusätzlich konnten Veränderungen im Expressionsmuster von Proteinen, die den Zellzyklus regulieren, festgestellt werden. So führt eine Kombinationsbehandlung zur Herunterregulierung des Proteinlevels von Chk1, einem Hauptvermittler der S- und G2/M- Zellzykluscheckpoints. Des Weiteren kommt es zu einer Potenzierung des Einflusses auf das zellzyklusregulierende Protein p21. Im Ergebnis ist in der Kombinationsbehandlung kein Zellzyklusarrest zu verzeichnen. Das Ausbleiben eines Zellzyklusarrestes könnte hier zur Erhöhung der apoptotischen Antwort gegenüber dem Chemotherapeutikum 5-FU beitragen.

Weitere experimentelle Untersuchungen sind notwendig, um die genauen Mechanismen hinter dem Effekt einer Kombinationsbehandlung von Thymoquinon und 5-Fluorouracil auf Proliferation und Apoptose von Kolonkarzinomzellen zu klären.

## 5. Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom zählt in den westlichen Industrienationen zur zweithäufigsten tumorbedingten Todesursache bei beiden Geschlechtern. Bei über 50% der humanen Tumore liegt eine Mutation im Tumorsuppressorgen p53 vor. Die Expression eines mutierten p53 bedingt Tumorprogression und Chemotherapieresistenz und ist assoziiert mit einer schlechten klinischen Prognose. In den letzten Jahren ist das Interesse an natürlich vorkommenden phytochemischen Extrakten mit antineoplastischen Potential deutlich gestiegen, da sie im Gegensatz zu den herkömmlich verwendeten Chemotherapeutika erheblich geringere zytotoxische Effekte auf Nichttumorgewebe aufweisen. Thymoquinon (TQ) ist die bioaktive Hauptkomponente des Schwarzkümmels (*Nigella sativa*). Bereits in diversen *in vivo* und *in vitro* Studien wurden seine antiinflammatorischen, antioxidativen und antineoplastischen Eigenschaften auf verschiedene humane Tumorzellen nachgewiesen. Dabei sind die genauen Mechanismen von Thymoquinon auf resistente Tumorzellen bislang nicht vollständig geklärt.

In der vorliegenden Dissertation wurden die antiproliferativen und proapoptischen Effekte einer Kombinationsbehandlung von Thymoquinon und dem vielfach verwendeten Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil (5-FU) auf kolorektale Tumorzellen, die eine Mutation im Tumorsuppressorgen p53 besitzen, untersucht. Im MTT-Test sowie dem Colony Formation Assay zeigte eine Vorbehandlung der Zellen mit TQ eine deutliche Reduzierung der mitochondrialen Aktivität sowie der Zellzahl und Kolonienbildung, die vergleichbar bzw. stärker ausgeprägt ist, als bei einer höheren 5-FU Dosierung. Trotz vermehrter Proteinexpression von p53 und p21 kam es nicht zur Induzierung eines Zellzyklusarrestes. Zusätzlich konnte eine TQ-induzierte Herunterregulierung von Chk1, einem Hauptvermittler von Zellzykluscheckpoints, ermittelt werden. Durch das Ausbleiben eines Zellzyklusstops kam es zu einem Anstieg der subG1-Phase in der Kombinationsbehandlung. In den Untersuchungen auf Proteinebene zeigte sich, dass TQ die 5-FU induzierte Apoptose durch Herunterregulierung des antiapoptischen Proteins Bcl-2 und daraus folgender proapoptischer Modulierung der Bax/Bcl-2 Ratio erhöht. Des Weiteren wurde eine TQ-induzierte Spaltung des Proteins BID nachgewiesen, die zur Cytochrom c Freisetzung und Aktivierung der Procaspase 9 führt. Somit scheint die gesteigerte Aktivierung der mitochondrialen Apoptosekaskade bei der Kombinationsbehandlung eine maßgebliche Rolle zu spielen. Durch Untersuchung der H2AX Proteinexpression zeigte sich, dass TQ der 5-FU vermittelten DNA-Schädigung deutlich entgegenwirkt. Die erhobenen Daten lassen vermuten, dass TQ zu einer Sensibilisierung von kolorektalen Tumorzellen mit einem mutierten p53 gegenüber dem Chemotherapeutikum 5-FU und zu einer Erhöhung der Behandlungseffizienz führt. Dadurch könnte mittels einer Kombinationsbehandlung die verwendete 5-FU Konzentration effektiv vermindert und somit potentiell zytotoxische Nebenwirkungen reduziert werden.

## **6. Veröffentlichungen**

Vortrag zur Promotionsarbeit auf der 91. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e. V. in Magdeburg, Mai 2007:

Morgenthal S, Poehlmann A, Gali-Muhtasib H, Roessner A, Schneider-Stock R: Pretreatment with thymoquinone overcomes 5-Fluorouracil-induced drug resistance in p53 mutant colorectal cancer cells. *Pathology Research and Practice* (2007), 203, 254-255

## 7. Literaturverzeichnis

1. Akhondian J, Kianifar H, Raoofziaee M, Moayedpour A, Toosi MB, Khajedaluae M: The effect of thymoquinone on intractable pediatric seizures (pilot study). *Epilepsy Res.* (2011), 93, 39-43
2. Al- Amri AM, Bamosa AO: Phase I safety and clinical activity study of thymoquinone in patients with advanced refractory malignant disease. *Shiraz E- Med J* (2009), 10, 107-11
3. Alhosin M, Abusnina A, Achour M, Sharif T, Muller C, Peluso J, Chataigneau T, Lugnier C, Schini-Kerth VB, Bronner C, Fuhrmann G: Induction of apoptosis by thymoquinone in lymphoblastic leukemia Jurkat cells is mediated by a p73-dependent pathway which targets the epigenetic integrator UHRF1. *Biochem Pharmacol* (2010), 79, 1251- 60
4. Ali BH, Blunden G: Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother Res* (2003), 17, 299-305
5. Arafa el-SA, Zhu Q, Shah ZI, Wani G, Barakat BM, Racoma I, El-Mahdy MA, Wani AA: Thymoquinone up-regulates PTEN expression and induces apoptosis in doxorubicin-resistant human breast cancer cells. *Mutat Res.* (2011), 706, 28-35
6. Arepalli SK, Sridhar V, Venkateswara Rao J, Kavin Kennady P, Venkateswarlu Y: Furano-sesquiterpene from soft coral, *Sinularia kavarittiensis*: induces apoptosis via the mitochondrial-mediated caspase-dependent pathway in THP-1, leukemia cell line. *Apoptosis.* (2009), 14, 729-40
7. Ashkenazi A: Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* (2002), 2, 420-430
8. Badary OA, Abdel- Naim AB, Abdel- Wahab MH, Hamada FM: The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats. *Toxicology* (2000), 143, 219-26
9. Badary OA, Nagi MN, al-Shabanah OA, al-Sawaf HA, al-Sohaibani MO, al-Bekairi AM: Thymoquinone ameliorates the nephrotoxicity induced by cisplatin in rodents and potentiates its antitumor activity. *Cancer Journal Physiol Pharmacol* (1997), 75, 1356-1361
10. Badary OA, Taha RA, Gamal el-Din AM, Abdel-Wahab MH: Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug Chem Toxicol.* (2003) 26, 87-98
11. Badary OA: Thymoquinone attenuates ifosmide-induced Fanconi syndrome in rats and enhances its antitumor activity in mice. *J Ethnopharmacol* (1999), 67, 135-142
12. Badr G, Lefevre EA, Mohany M: Thymoquinone inhibits the CXCL12-induced chemotaxis of multiple myeloma cells and increases their susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *PLoS One.* (2011), 6, e23741
13. Banerjee S, Kaseb AO, Wang Z, Kong D, Mohammad M, Padhye S, Sarkar FH, Mohammad RM: Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer. *Cancer Res* (2009), 69, 5575- 5583
14. Billen LP, Shamas-Din A, Andrews DW: Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene.* (2008), 27, 93-104
15. Blagosklonny MV: p53 complexity to simplicity: mutant p53 stabilization, gain-of-function, and dominant-negative effect. *FASEB Journal* (2000), 14, 1901-1907
16. Blandino G, Levine AJ, Oren M. Mutant p53 gain of function: differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy. *Oncogene* (1999), 18, 477 – 485

17. Bunz F, Hwang PM, Torrance C, Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, Williams J, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest* (1999) 104, 263–269
18. Carr AM: Cell cycle. Piecing together the p53 puzzle. *Science* (2000), 287, 1763-1766
19. Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: 14-3-3 $\sigma$  is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* (1999), 401, 616-620
20. Chehl N, Chipitsyna G, Gong Q, Yeo CJ, Arafat HA: Anti-inflammatory effects of the *Nigella sativa* seed extract, thymoquinone, in pancreatic cancer cells. *HPB* (2009), 11, 373-81
21. Chin KV, Ueda K, Pastan I, Gottesman MM: Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science* (1992), 255, 459–462
22. Chun SY, Johnson C, Washburn JG, Cruz-Correa MR, Dang DT, Dang LH: Oncogenic KRAS modulates mitochondrial metabolism in human colon cancer cells by inducing HIF-1a and HIF-2a target genes. *Molecular Cancer* (2010), 9, 293
23. Cotter TG: Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nature Reviews Cancer* (2009), 9, 501- 507
24. Danial NN, Korsmeyer SJ: Cell death: critical control points. *Cell* (2004), 116, 205–219
25. Di Como CJ, Gaiddon C, Prives C: p73 function is inhibited by tumor-derived p53 mutants in mammalian cells. *Mol Cell Biol* (1999), 19, 1438 – 1449
26. Dittmer D, Pati S, Zambetti G, Chu S, Teresky AK, Moore M, Finlay C, Levine AJ : Gain of function mutations in p53. *Nature Genetics* (1993), 4, 42-46
27. El-Mahmoudy A, Matsuyama H, Borgan MA: Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages. *Int Immunopharmacol* (2002), 2, 1603-1611
28. El-Mahmoudy A, Shimizu Y, Shiina T, Matsuyama H, El- Sayed M, Takewaki T: Successful abrogation by thymoquinone against induction of diabetes mellitus with streptozotocin via nitric oxide inhibitory mechanism. *Int Immunopharmacol* (2005), 5, 195-207
29. El-Mahdy MA, Zhu Q, Wang Q-E, Wani G, Wani AA: Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells. *Int J Cancer* (2005), 117, 409- 417
30. El-Najjar N, Chatila M, Moukadem H, Vuorela H, Ocker M, Gandesiri M, Schneider-Stock R, Gali-Muhtasib H: Reactive oxygen species mediate thymoquinone-induced apoptosis and activate ERK and JNK signaling. *Apoptosis* (2010), 15, 183-95
31. Famulski W, Sulkowska M, Wincewicz A, et al . P53 correlates positively with VEGF in preoperative sera of colorectal cancer patients. *Neoplasma* (2006), 53, 43 – 48
32. Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* (1990), 61, 759-67
33. Gali-Muhtasib H, Diab- Assaf M, Boltze C, Al- Hmaira J, Hartig R, Roessner A, Schneider- Stock R: Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *Int J Oncol*, (2004 a), 25, 857- 866
34. Gali-Muhtasib HU, Abou Kheir WG, Kheir LA, Darwiche N, Crooks PA: Molecular pathway for Thymoquinone-induced cell cycle arrest and

- apoptosis in neoplastic keratinocytes. *Anticancer Drugs* (2004b), 15, 389-399
35. Gali-Muhtasib H, Roessner A, Schneider- Stock R: Thymoquinone: A Promising anti-cancer drug from natural sources. *Int J Biochem Cell Biol* (2006), 38, 1249- 1253
  36. Gali-Muhtasib H, Kuester D, Mawrin C, Bajbouj K, Diestel A, Ocker M, Hahold C, Foltzer- Jourdainne C, Schoenfeld P, Peters B, Diab- Assaf M, Pommrich U, Itani W, Lippert H, Roessner A, Schneider- Stock R: Thymoquinone triggers inactivation of stress response pathway sensor CHEK1 and contributes to apoptosis in colorectal cancer cells, *Cancer Res* (2008a), 68, 5609-5618
  37. Gali-Muhtasib H, Ocker M, Kuester D, Krueger S, El- Hajj Z, Diestel A, El- Najjar N, Peters B, Jurjus A, Roessner A, Schneider- Stock R: Thymoquinone inhibits invasion of mouse colon tumor cells and growth of murine colon cancer models. *J Cell Mol Med* (2008b), 12, 330-342
  38. Gartel AL, Radhakrishnan SK: Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res* (2005), 65, 3980-3985
  39. Gartel AL, Tyner AL: The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* (2002), 1, 639-649
  40. Godai T, Suda T, Sugano N, Tsuchida K, Shiozawa M, Sekiguchi H, Sekiyama A, Yoshihara M, Matsukuma S, Sakuma Y, Tsuchiya E, Kameda Y, Akaike M, Miyagi Y : Identification of colorectal cancer patients with tumors carrying the TP53 mutation on the codon 72 proline allele that benefited most from 5-fluorouracil (5-FU) based postoperative chemotherapy. *BMC Cancer* (2009), 9, 420
  41. Gorospe M, Wang X, Guyton KZ, Holbrook NJ: Protective role of p21(Waf1/Cip1) against prostaglandin A2-mediated apoptosis of human colorectal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* (1996), 16, 6654–6660
  42. Grem JL: 5-Fluoropyrimidines. In: Chabner BA, Longo DL (eds) *Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice*. Lippincott-Raven, Philadelphia, (1996), 149–211
  43. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M: Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* (1997), 387, 296-299
  44. Hosokawa Y, Sakakura Y, Tanaka L, Okumura K, Yajima T, Kaneko M: Radiation-induced apoptosis is independent of caspase-8 but dependent on cytochrome c and the caspase-9 cascade in human leukemia HL60 cells. *Journal of radiation research* (2005), 3, 293- 303
  45. Huang C, Zhang XM, Tavaluc RT, Hart LS, Dicker DT, Wang W, El-Deiry WS: The combination of 5-Fluorouracil plus p53 pathway restoration is associated with depletion of p53-deficient or mutant p53-expressing putative colon cancer stem cells. *Cancer Biology & Therapy* (2009), 8, 2184-2191
  46. Hussain SP, Harris CC: Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res* (1998), 58, 4023–4037
  47. Hussain AR, Ahmed M, Ahmed S, Manogaran P, Plataniias LC, Alvi SN, Al-Kuraya KS, Uddin S: Thymoquinone suppresses growth and induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in primary effusion lymphoma. *Free Radic Biol Med*. (2011), 50, 978-87
  48. Irwin MS, Kondo K, Marin MC, Cheng LS, Hahn WC, Kaelin Jr WG: Chemosensitivity linked to p73 function. *Cancer Cell* (2003), 3, 403–410
  49. Izawa H, Yamamoto H, Damdinsuren B, Ikeda K, Tsujie M, Suzuki R, Kitani K, Seki Y, Hayashi T, Takemasa I, Ikeda M, Ohue M, Sekimoto M, Monden T, Monden M: Effects of p21cip1/waf1 overexpression on growth, apoptosis and differentiation in human colon carcinoma cells. *Int J Oncol* (2005), 27, 69-76

50. Jafri SH, Glass J, Shi R, Zhang S, Prince M, Kleiner-Hancock H: Thymoquinone and cisplatin as a therapeutic combination in lung cancer: *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Clin Cancer Res* (2010), 29, 87
51. Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Lowenstein RA, Finkel T: Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Medical Sciences* (1996), 93, 11848-11852
52. Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Valentine JS, Ord T, Bredesen DE: Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* (1993), 262, 11671-11673
53. Kang KH, Kim WH, Choi KH: p21 promotes ceramide- induced apoptosis and antagonizes the antideath effect of Bcl-2 in human hepatocarcinoma cells. *Exp Cell Res* (1999), 253, 403-412
54. Karaca-Mandic P, McCullough JS, Siddiqui MA, Van Houten H, Shah ND: Impact of new drugs and biologics on colorectal cancer treatment and costs. *Am J Manag Care* (2011), 1, 160- 168
55. Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, Sivanandam A, Tejwani S, Menon M, Ping Dou Q, Prem- Veer Reddy G: Androgen receptor and E2F-1 targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Canc Res* (2007), 67, 7782-7788
56. Kastan MB, Berkovich E: p53: a two-faced cancer gene. *Nat. Cell Biol.* (2007), 9, 489-491
57. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* (1972), 26, 239–257
58. Kondo S, Barna BP, Kondo Y, Tanaka Y, Casey G, Liu J, Morimura T, Kaakaji R, Peterson JW, Werbel B, Barnett GH: WAF1/CIP1 increases the susceptibility of p53 non-functional malignant glioma cells to cisplatin-induced apoptosis. *Oncogene* (1996), 13, 1279 –1285
59. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C: Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol Rev* (2007), 87, 99 –163, 2007
60. Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH: Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* (1997), 387, 299-303
61. Lang GA, Iwakuma T, Suh YA, Liu G, Rao VA, Parant JM, Valentin-Vega YA, Terzian T, Caldwell LC, Strong LC, El-Naggar AK, Lozano G: Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li- Fraumeni syndrome. *Cell* (2004), 119, 861-87
62. Laronga C, Yang HY, Neal C, Lee MH: Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3 sigma negatively regulates cell cycle progression. *J Biol Chem* (2000) 275, 23106-23112
63. Lee JM: Inhibition of p53- dependent apoptosis by the KIT tyrosine kinase regulation of mitochondrial permeability transition and reactive oxygen species generation. *Oncogene* (1998), 17, 1653-1662
64. Lei X, LV X, Liu M, Yang Z, Ji M, Guo X, Dong W: Thymoquinone inhibits growth and augments 5- fluorouracil- induced apoptosis in gastric cancer cells both *in vitro* and *in vivo*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2012), 417, 864- 868
65. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJC: The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *British Journal of Surgery* (2002), 89, 845- 860
66. Li F, Rajendran P, Sethi G: Thymoquinone inhibits proliferation, induces apoptosis and chemosensitizes human multiple myeloma cells through suppression of signal transducer and activator of transcription 3 activation pathway. *Br J Pharmacol.* (2010), 161, 541-54
67. Li Y, Upadhyay S, Bhuiyan M, Sarkar FH: Induction of apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 by genistein. *Oncogene* (1999), 18, 3166 –3172

68. Li ZB, Wang JY, Jiang B, Zhang XL, An LJ, Bao YM: Benzobijuglone, a novel cytotoxic compound from *Juglans mandshurica*, induced apoptosis in HeLa cervical cancer cells. *Phytomedicine*. (2007), 14, 846-52
69. Lin SH, Perera MN, Nguyen T, Datskovykyi D, Miles M, Colombini M: Bax forms two types of channels, one of which is voltage-gated. *Biophysical Journal* (2011), 101, 2163-2169
70. Lin Y, Ma W, Benchimol S: Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis. *Nature Genet* (2000), 26, 122-127
71. Lincet H, Poulain L, Remy JS, Deslandes E, Duigou F, Gauduchon P, Staedel C: The p21(cip1/waf1) cyclin-dependent kinase inhibitor enhances the cytotoxic effect of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Lett* (2000), 161, 17–26
72. Liu D-P, Song H, Xu Y: A common Gain of function of p53 cancer mutants in inducing genetic instability. *Oncogene* (2010), 29, 949- 956
73. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG: 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Canc* (2003), 3, 330-338
74. Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, Housman DE, Jacks T: p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* (1994), 266, 807–810
75. Lowe SW, Lin AW, Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* (2000), 21, 485-495
76. Ludes-Meyers JH, Subler MA, Shivakumar CV, Munoz RM, Jiang P, Bigger JE: Transcriptional activation of the human epidermal growth factor receptor promoter by human p53. *Mol Cell Biol* (1996), 16, 6009–6019
77. Mansour MA, Nagi MN, El- Khatib AS, Al- Bekairi AM: Effect of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: a possible mechanism of action. *Cell Biochem Func* (2002), 20, 143-151
78. Marin MC, Jost CA, Brooks LA, Irwin MS, O’Nions J, Tidy JA, James N, McGregor JM, Harwood CA, Yulug IG, Vousden KH, Allday MJ, Gusterson B, Ikawa S, Hinds PW, Crook T, Kaelin WG Jr: Common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behavior. *Nat Genet* (2000), 25, 47–54
79. Meek DW : Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene* (1999), 18, 7666-7675
80. Moll UM, Erster S, Zaika A: p53, p63 and p73 – solos, alliances and feuds among family members. *Biochim Biophys Acta* (2001), 1552, 47–59
81. Muller PA, Caswell PT, Doyle B et al.: Mutant p53 drives invasion by promoting integrin recycling. *Cell* (2009), 139, 1327–1341
82. Nagi MN, Mansour MA: Protective effects of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection. *Pharmacol Res* (2000), 41, 283-28
83. Ng WK, Yazan LS, Ismail M: Thymoquinone from *Nigella sativa* was more potent than cisplatin in eliminating of SiHa cells via apoptosis with downregulation of Bcl-2protein. *Toxicol* (2011), 25, 1392-1398
84. Nohl H, Staniek K, Kozlov AV, Gille L: The biomolecule ubiquinone exerts a variety of biological functions. *Biofactors* (2003),18, 23-31
85. O’Connor PM, Jackman J, Bae I, Myers TG, Fan S, Mutoh M, Scudiero DA, Monks A, Sausville EA, Weinstein JN, Friend S, Fornace AJ, Kohn J, Kohn KW: Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res* (1997), 57, 4285–4300
86. Ogino S, Brahmandam M, Kawasaki T, Kirkner GJ, Loda M, Fuchs CS: Epigenetic profiling of synchronous colorectal neoplasia by quantitative DNA methylation analysis. *Modern Pathology* (2006), 19, 1083-1090

87. Ogini S, Goel A: Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *Journal of Molecular Diagnostics* (2008), 10, 13-27
88. Ohki R, Nemoto J, Murasawa H, Oda E, Inazawa J, Tanaka N, Taniguchi T: Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase. *J Biol Chem* (2000), 275, 22627-22630
89. Olive KP, Tuveson DA, Ruhe ZC, Yin B, Willis NA, Bronson RT, Crowley D, Jacks T: Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* (2004), 119, 847- 860
90. Ott M, Norberg E, Zhivotovsky B, Orrenius S: Mitochondrial targeting of tBid/Bax: a role for the TOM complex? *Cell death and differentiation* (2009), 16, 1075–1082
91. Peled A, Zipori D, Rotter V. Cooperation between p53-dependent and p53-independent apoptotic pathways in myeloid cells. *Cancer Res* (1996), 56, 2148 – 2156
92. Peng CY, Graves PR, Thoma RS, Wu Z, Shaw AS, Piwnica-Worms H: Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* (1997), 277, 1501- 1505
93. Petak I, Tillmann DM, Houghton JA: p53 dependence of Fas induction and acute apoptosis in response to 5-fluorouracil-leucovorin in human colon carcinoma cell lines. *Clinical Cancer Research* (2000), 6, 4432-4441
94. Phelps RA, Broadbent TJ, Stafforini DM, Jones DA: New perspectives on APC control of cell fate and proliferation in colorectal cancer. *Cell Cycle* (2009), 8, 2549–2556
95. Plasencia C, Rooney PH, Taron M, Martinez- Balibrea E, McLeod HL, Abad A: Chromosomal imbalance maps of human 5FU-resistant colorectal cancer cell lines: Implications in the analysis of 5FU-acquired resistance mechanisms. *Int J Oncol* (2003), 22, 945-953
96. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B: A model for p53-induced apoptosis. *Nature* (1997), 389, 300-3005
97. Proutski I, Stevenson L, Allen WL, McCulla A, Boyer J, McLean EG, Longley DB, Johnston PG: Prostate-derived factor—a novel inhibitor of drug-induced cell death in colon cancer cells. *Molecular Cancer Therapy* (2009), 8, 2566-2574
98. Raisova M, Hossini AM, Eberle J, Riebeling C, Wieder T, Sturm I, Daniel PT, Orfanos CE, Geilen CC: The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas- mediated apoptosis. *J Invest Dermatol* (2001), 117, 333-340
99. Ray RS, Rana B, Swami B, Venu V, Chatterjee M: Vanadium mediated apoptosis and cell cycle arrest in MCF7 cell line. *Chem Biol Interact.* (2006), 163, 239-47
100. Redston M: Carcinogenesis in the GI Tract: From Morphology to Genetics and Back Again. *Mod Pathol* (2001),14, 236 –245
101. Reed JC : Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* (1999), 17 , 2941-2953
102. Reed JC: Cytochrome c: can't live with it--can't live without it. *Cell* (1997), 91, 559-562
103. Renehan AG, Booth C, Potten CS: What is apoptosis and why is it important? *BMJ* (2001), 322,1536- 1538
104. Riede U-N, Werner M, Schäfer H-E: *Allgemeine und Spezielle Pathologie* (2004), Thieme Verlag, 5. Auflage
105. Robinson HMR, Jones R, Walker M, Zachos G, Brown R, Cassidy J and Gillespie DAF: Chk1-dependent slowing of S-phase progression protects DT40 B-lymphoma cells against killing by the nucleoside analogue 5-fluorouracil. *Oncogene* (2006), 25, 5359–5369

106. Roepke M, Diestel A, Bajbuoj K, Schoenfeld P, Roessner A, Schneider-Stock R, Gali-Muhtasib H: Lack of p53 augments thymoquinone-induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells. *Cancer Biol Ther* (2007), 6, 160-169
107. Roger L, Jullien L, Gire Y, Roux P: Gain of oncogenic function of p53 mutants regulates E-cadherin expression uncoupled from cell invasion in colon cancer cells. *Journal of Cell Science* (2010), 123, 1295-1305
108. Sanchez Y, Wong C, Thoma RS, Richman R, Wu Z, Piwnica-Worms H, Elledge SJ: Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science* (1997), 277, 1497-1501
109. Santi DV, McHenry CS, Raines RT, Ivanetich KM: Kinetics and thermodynamics of the interaction of 5-fluoro-2'-deoxyuridylate with thymidylate synthase. *Biochem* (1987), 26, 8606-8613
110. Schendel SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M, Reed JC: Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci* (1997), 94, 5113-5118
111. Schulze-Bergkamen H, Weinmann A, Moehler M, Siebler J, Galle PR: Novel ways to sensitize gastrointestinal cancer to apoptosis. *Gut* (2009), 58, 1010-1024
112. Schwartz GK, Shah MA: Targeting the cell cycle: A new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol* (2005), 36, 9408-9421
113. Scian MJ, Stagliano KE, Ellis MA, Hassan S, Bowman M, Miles MF et al.: Modulation of gene expression by tumor-derived p53 mutants. *Cancer Res* (2004), 64, 7447-7454
114. Sethi G, Ahn KS, Aggarwal BB: Targeting nuclear factor-kappa B activation pathway by thymoquinone: role in suppression of antiapoptotic gene products and enhancement of apoptosis. *Mol Cancer Res*. (2008), 6, 1059-70
115. Shankar S, Ganapathy S, Srivastava RK: Sulforaphane enhances the therapeutic potential of TRAIL in prostate cancer orthotopic model through regulation of apoptosis, metastasis and angiogenesis. *Clin Cancer Research* (2008), 14, 6855-6866
116. Shao RG, Cao CX, Pommier Y: Abrogation of Chk1-mediated S/G2 checkpoints by UCN-01 enhances ara-C-induced cytotoxicity in human colon cancer cells. *Acta Pharmacol Sin* (2004), 25, 756-762
117. Sherr CJ, Weber JD: The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* (2000), 10, 94-99
118. Shi Y: Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* (2002), 9, 459-470
119. Siddiqui AD, Piperdi B: KRAS mutation in colon cancer: a marker of resistance to EGFR-I therapy. *Ann Surg Oncol*. 2010, 17, 1168-1176
120. Sigal A, Rooter V: Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: The demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* (2000), 60, 6788-6793
121. Slee EA, Keogh SA, Martin SJ: Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and is catalysed by caspase-3: a potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release. *Cell Death and Differentiation* (2000), 7, 556-565
122. Sobrero AF, Aschele C, Bertino JR: Fluorouracil in colorectal cancer: a tale of two drugs—implications for biochemical modulation. *J Clin Oncol* (1997), 15, 368-381
123. Soussi T, Beroud C: Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* (2001), 1, 233-240

124. Stambolsky P, Tabach Y, Fontemaggi G, et al . Modulation of the vitamin D3 response by cancer-associated mutant p53. *Cancer Cell* (2010), 17: 273 – 285
125. Strano S, Munarriz E, Rossi M, Cristofanelli B, Shaul Y, Castagnoli L, Levine AJ, Sacchi A, Cesareni G, Oren M, Blandino G: Physical and functional interaction between p53 mutants and different isoforms of p73. *J Biol Chem* (2000), 275, 29503–29512
126. Sun Y, Tang XM, Half E, Kuo MT, Sinicrope FA: Cyclooxygenase-2 overexpression reduces apoptotic susceptibility by inhibiting the cytochrome c-dependent apoptotic pathway in human colon cancer cells. *Cancer Res.* (2002), 62, 6323-8
127. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Daugas E, Wang HG, Geley S, Fassy F, Reed JC, Kroemer G: The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *J Exp Med* (1997), 186, 25-37
128. Tian Y, Ding RY, Zhi YH, et al . Analysis of p53 and vascular endothelial growth factor expression in human gallbladder carcinoma for the determination of tumor vascularity. *World J Gastroenterol* (2006), 12, 415 – 419
129. Tóth E, Serester O, Gallai M, Gurzu S, Jung I, Szentirmay Z: Molecular pathways and pathomorphology of colorectal cancers. *Rom J Morphol Embryol* (2011), 52, 767–773
130. Torres MP, Ponnusamy MP, Chakraborty S, Smith LM, Das S, Arafat HA, Batra SK: Effects of thymoquinone in the expression of mucin 4 in pancreatic cancer cells: implications for the development of novel cancer therapies. *Mol Cancer Ther* (2010), 9, 1419-31
131. Tse AN, Carvajal R, Schwartz GK: Targeting Checkpoint Kinase 1 in cancer therapeutics. *Clin Canc Res* (2007), 7, 1955-1960
132. Van Triest B, Pinedo HM, Giaccone G, Peters GJ: Downstream molecular determinants of response to 5-fluorouracil and antifolate thymidylate synthase inhibitors. *Annals of Oncology* (2000), 11, 385-391
133. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ: Surfing the p53 network. *Nature* (2000), 408 , 307-310
134. Vousden KH, Lu X: Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* (2002), 2, 594–604
135. Wang J, Walsh K: Resistance to apoptosis conferred by Cdk inhibitors during myocyte differentiation. *Science* (1996), 273, 359–361
136. Weisz L, Damalas A, Liontos M, et al . Mutant p53 enhances nuclear factor kappaB activation by tumor necrosis factor alpha in cancer cells. *Cancer Res* (2007), 67, 2396 – 2401
137. Weisz L, Zalcenstein A, Stambolsky P, Cohen Y, Goldfinger N, Oren M et al.: Transactivation of the EGR1 gene contributes to mutant p53 gain of function. *Cancer Res* (2004), 64, 8318–8327
138. Weisz L, Oren M, Rotter V : Transcription regulation by mutant p53. *Oncogene* (2007), 26, 2202-221
139. Werner H, Karnieli E, Rauscher FJ, LeRoith D: Wild- type and mutant p53 differentially regulate transcription of the insulin-like growth factor I receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* (1996), 93, 8318–8323
140. Woo CC, Loo SY, Gee V, Yap CW, Sethi G, Kumar AP, Tan KHB: Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: Possible involvement of PPAR- $\gamma$  pathway. *Biochem Pharm* (2011), 82, 464-475
141. Worthen DR, Ghosheh OA, Crooks PA: The in vitro anti-tumor activity of some crude purified components of black seed *Nigella sativa*. *Anticancer Res* (1998), 18, 1527-32,

142. Xiao Z, Xue J, Sowin TJ, Rosenberg SH, Zhang H: A novel mechanism of checkpoint abrogation conferred by Chk1 downregulation. *Oncogene* (2005), 24, 1403-1411
143. Yan W, Chen X: Characterization of Functional Domains Necessary for Mutant p53 Gain of Function. *J Biol Chem* (2010), 285, 14229-14238
144. Yang C, Liu HZ, Fu ZX: PEG-liposomal oxaliplatin induces apoptosis in human colorectal cancer cells via Fas/FasL and caspase-8. *Cell Biol Int.* (2011), [Epub ahead of print]
145. Yi T, Cho s-G, Yi Z, Pang X, Rodriguez M, Wang Y, Sethi G, Aggarwal BB, Liu M: Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing AKT and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Mol Cancer Ther* (2008), 7, 1789-96
146. Ying L, Bodmer WF: Analysis of p53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. *Canc Res* (2006), 103, 976-981
147. Youle RJ, Strasser A: The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2008), 9, 47-59
148. Zalcenstein A, Stambolsky P, Weisz L, Muller M, Wallach D, Goncharov TM, Krammer PH, Rotter V, Oren M: Mutant p53 gain of function: repression of CD95(Fas/APO-1) gene expression by tumor-associated p53 mutants. *Oncogene* (2003), 22, 5667-5676

## 8. Danksagung

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. A. Roessner und Frau Prof. Dr. rer. nat. R. Schneider-Stock für die Überlassung des interessanten und aktuellen Themas der Promotion sowie die Unterstützung bei der Umsetzung und die wertvollen Hinweise und Ratschläge.

Herzlicher Dank gebührt auch Frau Simone Staeck und Frau Uta Schönborn, die mich in die „Geheimnisse“ von Zellkultur, Western Blot und Co. einführten und mir bei der Durchführung der Experimente aufgrund ihrer langjährigen Erfahrung eine große Unterstützung waren. Dank gilt auch Frau Dr. rer. nat. Angela Poehlmann, Frau Scharfenort und Frau Schinlauer, die mit ihrer ausgeglichenen und freundlichen Art eine Bereicherung im Laboralltag waren. Allen zusammen danke ich für eine wunderbare Zeit!

Ein besonderer Dank gilt dem Referat für Forschung für deren Doktorandenförderung im Rahmen der LOM Mittel.

Meinen Eltern danke ich für ihre bedingungslose Unterstützung und den emotionalen Rückhalt. Durch ihr tiefes Vertrauen und ihre stete Zuversicht konnte ich eigene Wege ganz vorbehaltlos beschreiten und eines der spannendsten Fächer studieren.

Meinem Freund Maurizio danke ich für seine scheinbar grenzenlose Geduld mit mir.

VIELEN DANK!

## **9. Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Apoptoseinduktion  
in p53 mutierten kolorektalen Tumorzellen  
nach Kombinationsbehandlung  
mit 5-Fluorouracil und Thymoquinon**

im Institut für Pathologie der Universitätsklinik Magdeburg

mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. A. Roessner und Prof. Dr. rer. nat. R. Schneider-Stock

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Berlin, September 2012

Sylvia Morgenthal

## 10. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Sylvia Morgenthal  
Borsigstraße 16, 10115 Berlin  
geb. am 17.04.1982 in Reichenbach

### Schulbildung:

1998- 2001 Anna-Seghers-Oberschule, Berlin  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Berufsausbildung:

10/2001- 03/2002 Ausbildung zur med. Sektions- und Präparationsassistentin  
Klinikum Neukölln, Berlin  
Abschluss: Staatsexamen

04/2002- 09/2002 Anerkennungspraktikum  
Gerichtsmedizin, Salzburg/ Österreich

### Hochschulbildung:

10/2002- 05/2009 Humanmedizin  
Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg  
Abschluss: Staatsexamen

### Praktisches Jahr:

1. Tertial Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Magdeburg
2. Tertial Innere Medizin, Kantonsspital St. Gallen/ Schweiz
3. Tertial Chirurgie, King Edward Hospital Durban/ Südafrika

### Ärztliche Weiterbildung:

11/2009- 03/2011 Forensische Psychiatrie  
Krankenhaus des Maßregelvollzugs, Berlin

03/2011- 09/2012 Institut für Pathologie  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel

ab 10/2012 Institut für Rechtsmedizin  
Universitätsklinikum Leipzig

Sylvia Morgenthal  
Berlin, September 2012

# 11. Anlagen

## 11.1. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Krebsentwicklung in Deutschland, Stand November 2010.....	6
Abb. 1: Adenom-Karzinom-Sequenz, adaptiert von Fearon und Vogelstein 1990.....	7
Abb. 2: Strukturformel 5-Fluorouracil .....	12
Abb. 3: Metabolismus von 5-Fluorouracil, Longley et al. 2003.....	13
Abb. 4: Pflanze und Samen des Schwarzkümmels (black seed) .....	14
Abb. 5: Strukturformel TQ, C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> , Molekulargewicht: 164.2 .....	14
Abb. 6: Todesrezeptor-(extrinsischer) Signalweg, modifiziert nach Ashkenazi 2002.....	18
Abb. 7: Mitochondrialer- (intrinsischer) Signalweg, modifiziert nach Ashkenazi 2002.....	19
Abb. 8: HT29 Zellen in Kultur .....	21
Abb. 9: Mutationsstatus HT29 .....	21
Abb. 10: Prinzip des MTT-Assay .....	22
Abb. 11: Versuchsaufbau Colony Formation Assay .....	23
Abb. 12: Zeitverlauf Colony Formation Assay .....	24
Abb. 13: Beispielabbildung Annexin-V-Fluos .....	24
Abb. 14: Zellzyklusanalyse mit der Flow Cytometrie .....	25
Abb. 15: Zellzyklusphasen .....	26
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Antikörper (AK) .....	28
Abb. 16: HCT116 wt, mitochondriale Aktivität, Einzelbehandlung .....	30
Abb. 17: HCT116 wt, mitochondriale Aktivität, Kombinationsbehandlungen .....	30
Abb. 18: HCT116 null, mitochondriale Aktivität, Einzelbehandlungen .....	31
Abb. 19: HCT116 null, mitochondriale Aktivität, Kombinationsbehandlungen .....	31
Abb. 20: HT29, mitochondriale Aktivität, Einzelbehandlungen.....	32
Abb. 21: HT29, mitochondriale Aktivität, Kombinationsbehandlungen.....	33
Abb. 22: HT29, mitochondriale Aktivität .....	33
Abb. 23: HT29, mitochondriale Aktivität .....	34
Abb. 24: Koloniebildung nach abgeschlossener Inkubationszeit .....	35
Abb. 25 : Vergleich Kombination mit 10µM 5-FU Einzelbehandlung.....	36
Abb. 26: Zeitverlauf der TQ- Behandlung.....	37
Abb. 28: Kombinationsbehandlung I .....	38
Abb. 29: Kombinationsbehandlung II .....	39
Abb. 31: Kombinationsbehandlung I .....	41
Abb. 32: Kombinationsbehandlung II .....	42
Abb. 33: Western Blot p53 und p21 .....	43
Abb. 34: Western Blot Chk1 .....	43
Abb. 35: Western Blot H2AX .....	43
Abb. 36: Western Blot Caspase-8 und Caspase-3.....	44
Abb. 37: Western Blot BID .....	44
Abb. 38: Western Blot Bax und Bcl-2 .....	45
Abb. 39: Western Blot Cytochrom c .....	45
Abb. 40: Western Blot Caspase-9 .....	45