

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Institut für Tumorbiologie

Prof. Dr. med. Pantel

## **Evaluierung der Funktion des RAI2-Proteins in der zellulären Stressantwort in Mammakarzinom- und Prostatakarzinomzellen**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Ellen Claus

geb. am 19.06.1994

Hamburg 2021

Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 16.08.2021

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität  
Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Leticia Oliveira-Ferrer

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Harriet Wikman-Kocher

## **Inhaltsverzeichnis**

|  |    |
|--|----|
| Abbildungsverzeichnis .....  | 6  |
| Tabellenverzeichnis.....   | 8  |
| Abkürzungsverzeichnis .....  | 8  |
| 1. Einleitung .....  | 12 |
| 1.1 Grundlagen der Tumorgenese und Charakteristika von Tumorzellen ..... | 12 |
| 1.2 Hormonabhängige Tumore.....  | 13 |
| 1.2.1 Das Mammakarzinom .....  | 13 |
| 1.2.2 Das Prostatakarzinom .....   | 15 |
| 1.3 Zellstress in Krebszellen.....                                       | 17 |
| 1.3.1 Antwort auf genotoxischen Zellstress .....                         | 19 |
| 1.3.2 Antwort auf ungefaltete Proteine (UPR) .....                       | 23 |
| 1.3.3 Pharmakologisch induzierte Stressantworten .....                   | 25 |
| 1.4 Das Retinoic acid-induced 2 (RAI2) Protein .....                     | 27 |
| 2. Fragestellung .....   | 31 |
| 3. Material und Methoden .....   | 32 |
| 3.1 Material .....   | 32 |
| 3.1.1 Chemikalien.....   | 32 |
| 3.1.2 Zelllinien .....   | 32 |
| 3.1.3 Pharmaka .....   | 33 |
| 3.1.4 Oligonukleotide.....   | 33 |
| 3.1.5 Antikörper .....   | 34 |
| 3.1.6 Lösungen und Zellkulturmedien .....                                | 35 |
| 3.2 Methoden.....  | 36 |
| 3.2.1 Zellkultur .....   | 36 |
| 3.2.1.1 Kultivierung .....   | 36 |
| 3.2.1.2 Passagieren der Zellkultur .....                                 | 36 |
| 3.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl.....                                     | 37 |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 3.2.1.4 | Behandlung mit Pharmaka.....   | 37 |
| 3.2.1.5 | MTT-Assay.....   | 39 |
| 3.2.2   | Molekularbiologische Methoden.....   | 40 |
| 3.2.2.1 | RNA-Isolation.....   | 40 |
| 3.2.2.2 | cDNA Synthese.....   | 40 |
| 3.2.2.3 | Etablierung der Primer.....  | 40 |
| 3.2.2.4 | Quantitative Echtzeit-PCR.....   | 41 |
| 3.2.2.5 | Relative mRNA-Quantifizierung.....   | 41 |
| 3.2.3   | Biochemische Methoden.....   | 42 |
| 3.2.3.1 | Vorbereitung der Proben.....   | 42 |
| 3.2.3.2 | BCA Assay.....   | 42 |
| 3.2.3.3 | SDS-Polyacrylamid-Gel Elektrophorese (SDS-PAGE).....   | 42 |
| 3.2.3.4 | Western Blot.....  | 43 |
| 3.2.3.5 | Immunfluoreszenz.....  | 44 |
| 3.2.4   | Statistische Methoden.....   | 45 |
| 4.      | Ergebnisse.....  | 46 |
| 4.1     | Proliferation von KPL-1- und LNCaP-Zellen nach Behandlung mit Zellstress-induzierenden Pharmaka.....                     | 46 |
| 4.2     | Expression des RAI2-Gens in KPL-1- und LNCaP-Zellen nach Behandlung mit Zellstress-induzierenden Pharmaka.....           | 51 |
| 4.3     | Analyse der RAI2-Proteinexpression in KPL-1- und LNCaP-Zellen nach Behandlung mit Zellstress-induzierenden Pharmaka..... | 57 |
| 4.3.1   | Analyse der Marker für DNA-Schäden und Zellzyklusarrest.....   | 58 |
| 4.3.2   | Analyse von Paraspeckle-Proteinen.....   | 62 |
| 4.3.3   | Analyse von UPR-Markern.....   | 64 |
| 4.4     | Bildung von lokalisierten RAI2- und CtBP1-positiven Speckles nach Behandlung mit Etoposid und Olaparib.....              | 66 |
| 5.      | Diskussion.....  | 69 |

|   |     |
|---|-----|
| 5.1 RAI2-Gen- und RAI2-Proteinexpression im Zusammenhang mit der<br>Aktivierung von zellulären Stresssignalwegen..... | 71  |
| 5.2 Relevanz von genotoxischem Zellstress für die Colokalisation von RAI2-<br>und CtBP-positiven Speckles .....       | 77  |
| 5.3 Diskussion der Methoden .....   | 78  |
| 5.4 Schlussfolgerungen und Ausblick .....   | 80  |
| 6. Zusammenfassung .....  | 82  |
| Literaturverzeichnis.....   | 84  |
| Anhang.....   | 98  |
| Danksagung.....   | 102 |
| Lebenslauf .....  | 103 |
| Eidesstattliche Erklärung .....   | 105 |

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016. .... | 15 |
| Abbildung 2: Auslöser von Zellstress und die zelluläre Stressantwort.....   | 19 |
| Abbildung 3: Reparaturwege bei DNA-Schädigung mit Doppelstrangbruch (DSB) oder Einzelstrangbruch (ESB). ....                | 20 |
| Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der UPR-Signalwege. ....  | 24 |
| Abbildung 5: Die Rolle von RAI2 in der Differenzierung von Mammakarzinomzellen.....   | 29 |
| Abbildung 6: Proliferation von KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden Behandlung mit Etoposid.....                         | 47 |
| Abbildung 7: Proliferation von KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden Behandlung mit Camptothecin. ....                    | 48 |
| Abbildung 8: Proliferation von KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden Behandlung mit Flavopiridol. ....                    | 48 |
| Abbildung 9: Proliferation von KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden Behandlung mit Tunicamycin.....                      | 49 |
| Abbildung 10: Proliferation von KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden Behandlung mit Cycloheximid. ....                   | 50 |
| Abbildung 11: Proliferation von KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden Behandlung mit Olaparib. ....                       | 50 |
| Abbildung 12: Proliferation von KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden Behandlung mit Gentamicin. ....                     | 51 |
| Abbildung 13: RAI2 Induktion in KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden Behandlung mit Etoposid.....                        | 52 |
| Abbildung 14: RAI2 Induktion in KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden Behandlung mit Camptothecin. ....                   | 53 |
| Abbildung 15: RAI2 Induktion in KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden Behandlung mit Flavopiridol. ....                   | 54 |
| Abbildung 16: RAI2 Induktion in KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden Behandlung mit Tunicamycin.....                     | 54 |

|   |     |
|---|-----|
| Abbildung 17: RAI2 Induktion in KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden<br>Behandlung mit Cycloheximid. ....  | 55  |
| Abbildung 18: RAI2 Induktion in KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden<br>Behandlung mit Gentamicin. ....  | 56  |
| Abbildung 19: RAI2 Induktion in KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden<br>Behandlung mit Olaparib. ....  | 56  |
| Abbildung 20: Expression von RAI2 (A) und der DNA-Schadensmarker p21 (B),<br>p53 (C) und $\gamma$ H2AX (D) in KPL-1 nach 72 Stunden Behandlung mit<br>Pharmaka. ....            | 60  |
| Abbildung 21: Expression von RAI2 (A) und der DNA-Schadensmarker p21 (B),<br>p53 (C) und $\gamma$ H2AX (D) in LNCaP nach 72 Stunden Behandlung<br>mit Pharmaka. ....            | 61  |
| Abbildung 22: Expression von RAI2 (A) und der Paraspeckle-Marker PSPC1 (B)<br>und NONO (C) in KPL-1 nach 72 Stunden Behandlung mit<br>Pharmaka. ....                            | 63  |
| Abbildung 23: Expression von RAI2 (A) und der Paraspeckle-Marker PSPC1 (B)<br>und NONO (C) in LNCaP nach 72 Stunden Behandlung mit<br>Pharmaka. ....                            | 64  |
| Abbildung 24: Expression von RAI2 (A) und des UPR-Markers p $\ell$ F2 $\alpha$ (B) in<br>KPL-1 nach 72 Stunden Behandlung mit Pharmaka. ....                                    | 65  |
| Abbildung 25: Expression von RAI2 (A) und des UPR-Markers p $\ell$ F2 $\alpha$ (B) in<br>LNCaP nach 72 Stunden Behandlung mit Pharmaka. ....                                    | 66  |
| Abbildung 26: Immunfluoreszenzaufnahmen von KPL-1 RAI2-OE (A) und KPL-1<br>RAI2-4A (B) nach Behandlung mit Etoposid, Olaparib und<br>Etoposid in Kombination mit Olaparib. .... | 68  |
| Abbildung A1: Funktionsgleichungen zur Beschreibung der Proliferation von<br>KPL-1- und LNCaP-Zellen bei Behandlung mit Pharmaka sowie<br>daraus berechnete IC50. ....          | 100 |
| Abbildung A2: Standardkurven der Primer RAI2(1) (A) und RAI2(2) (B) bei<br>60,1°C. ....   | 101 |

## **Tabellenverzeichnis**

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 1: Verwendete Zelllinien .....  | 32 |
| Tabelle 2: Verwendete Pharmaka .....  | 33 |
| Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide .....                                       | 34 |
| Tabelle 4: Charakteristika der primären Antikörper .....                          | 34 |
| Tabelle 5: Charakteristika der sekundären Antikörper .....                        | 35 |
| Tabelle 6: Charakteristika der sekundären AlexaFluor Fluoreszenz Antikörper ..... | 35 |
| Tabelle 7: Lösungen und Zellkulturmedien .....                                    | 35 |
| Tabelle 8: Konzentrationen der Pharmaka .....                                     | 38 |
| Tabelle 9: Behandlungsschema der Kammerobjektträger .....                         | 39 |
| Tabelle 10: Verwendetes qPCR-Programm .....                                       | 41 |
| Tabelle 11: Zusammensetzung der Trenngele .....                                   | 43 |
| Tabelle 12: Zusammensetzung der Sammelgele bei 2 ml Volumen .....                 | 43 |

## **Abkürzungsverzeichnis**

|        |                                     |
|--------|-------------------------------------|
| %      | Prozent                             |
| °C     | Grad Celsius                        |
| mM     | Millimolar                          |
| nM     | Nanomolar                           |
| µl     | Mikroliter                          |
| µM     | Mikromolar                          |
| AKT    | Proteinkinase B                     |
| APAF-1 | Protease-Aktivierungsfaktor 1       |
| AR     | Androgenrezeptor                    |
| ATF2   | Aktivierungs-Transkriptionsfaktor 2 |
| ATF4   | Aktivierungs-Transkriptionsfaktor 4 |
| ATF6   | Aktivierungs-Transkriptionsfaktor 6 |
| Bax    | Bcl-2-assoziiertes X Protein        |
| BER    | Basenexzisionsreparatur             |
| BiP    | Bindendes Immunglobulin-Protein     |

|                 |   |
|-----------------|---|
| B2M             | $\beta_2$ -Mikroglobulin                                |
| BRCA1           | Breast-Cancer 1   |
| BRCA2           | Breast-Cancer 2   |
| BSA             | Bovines Serumalbumin                                    |
| CDK1            | Cyklin-abhängige Kinase 1                               |
| CDK2            | Cyklin-abhängige Kinase 2                               |
| CDK9            | Cyklin-abhängige Kinase 9                               |
| cDNA            | Komplementäre Desoxyribonukleinsäure                    |
| CO <sub>2</sub> | Kohlenstoffdioxid                                       |
| COPII           | Coat Protein II (Hüllprotein II)                        |
| CT              | Cycle Threshold (Zyklus-Schwellenwert)                  |
| CtBP            | Carboxyl-terminales bindendes Protein                   |
| CTC             | Zirkulierende Tumorzelle                                |
| DTC             | Disseminierte Tumorzelle                                |
| DAPI            | 4',6-Diamidino-2-Phenylindol                            |
| DMEM            | Dulbecco's modified eagle's medium                      |
| DMSO            | Dimethylsulfoxid  |
| DNA             | Desoxyribonukleinsäure                                  |
| DSB             | Doppelstrangbruch                                       |
| eIF2 $\alpha$   | Eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 2 $\alpha$ |
| EMT             | Epithelial-Mesenchymale Transformation                  |
| ER              | Estrogen Rezeptor                                       |
| ER-Stress       | Stress im Endoplasmatischen Retikulum                   |
| ERAD            | ER-assoziiertes Proteinabbau                            |
| ESB             | Einzelstrangbruch                                       |
| FC              | Fold Change   |
| FCS             | Fetales Kälberserum                                     |
| FOXA1           | Forkhead Box A1   |
| GATA3           | GATA bindendes Protein 3                                |
| GRHL2           | Grainyhead-ähnlicher Transkriptionsfaktor 2             |
| HER2            | Humaner Epidermaler Wachstumsrezeptor 2                 |

|                  |  |
|------------------|--|
| H <sub>2</sub> O | Wasser   |
| HR               | Hormonrezeptor   |
| HRR              | Homologe Rekombinationsreparatur   |
| HSC70            | Heat shock cognate 70 kDa protein<br>(Hitzeschockprotein)                |
| IC <sub>50</sub> | Mittlere inhibitorische Konzentration                                    |
| IRE1             | Inositol-requiring Protein 1   |
| ITB              | Institut für Tumorbilogie  |
| MRN-Komplex      | MRE11, RAD50 und XRCC1 Komplex   |
| mRNA             | messenger Ribonukleinsäure   |
| MRT              | Magnetresonanztomographie  |
| MTT              | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid              |
| NEAT1            | Nuclear-enriched abundant transcript 1                                   |
| NER              | Nukleotid-Exzisionsreparatur   |
| NHEJ             | Non-homologous End-joining (Nicht-homologe Endverknüpfung)               |
| NMD              | Nonsense mediated mRNA decay (Nonsens vermittelter mRNA Abbau)           |
| NONO             | Non-POU domain-containing octamer-binding Protein                        |
| PALB2            | Partner und Lokalisierer von BRCA2                                       |
| PARP             | Poly-ADP-Ribose-Polymerase   |
| PCR              | Polymerasekettenreaktion   |
| peIF2 $\alpha$   | Phosphorylierter eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 2 $\alpha$ |
| PERK             | Proteinkinase RNA-like ER Kinase   |
| PR               | Progesteronrezeptor  |
| PSA              | Prostata spezifisches Antigen  |
| PSPC1            | Paraspeckle Protein1   |
| PTC              | Premature termination codon (vorzeitiges Stopp-Codon)                    |

|          |   |
|----------|---|
| RAD51    | Radiation sensitive protein 51                                  |
| RAI2     | Retinoic acid-induced 2   |
| RCF      | Relative Zentrifugalbeschleunigung                              |
| RNA      | Rinonukleinsäure  |
| SDS PAGE | SDS-polyacrylamide-Gel Elektrophorese                           |
| TEMED    | Tetramethylethylenediamin                                       |
| TNM      | Tumorstadium  |
| TRUS     | Transrektale Sonografie   |
| TSG      | Tumorsuppressor-Gen   |
| UKE      | Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf                          |
| UPR      | Unfolded Protein Response (Antwort auf<br>ungefaltete Proteine) |
| XBP1     | Xbox-bindendes Protein 1  |

## **1. Einleitung**

### **1.1 Grundlagen der Tumorgenese und Charakteristika von Tumorzellen**

Bei malignen Neoplasien handelt es sich um komplexe Erkrankungen, deren Charakteristika sich in den *Hallmarks of Cancer* von Hanahan und Weinberg zusammenfassen lassen (Hanahan und Weinberg 2000). Als wesentliche Eigenschaften maligner Zellen bzw. der Tumorgenese werden folgende Merkmale identifiziert: eine von Wachstumssignalen unabhängige Proliferation, die Unabhängigkeit von wachstumshemmenden Signalen, Invasion und Metastasierung, ein unbegrenztes replikatives Potential, die Induktion der Angiogenese sowie eine Resistenz gegenüber pro-apoptotischen Signalen und somit eine Resistenz gegenüber dem natürlichen Zelltod (Hanahan und Weinberg 2000). Diese Eigenschaften von Krebszellen wurden um die Deregulation zellulärer Energieprozesse sowie die Vermeidung immunologischer Prozesse erweitert (Hanahan und Weinberg 2011). Zudem wurden die genomische Instabilität und Mutationen sowie inflammatorische Prozesse als wesentliche Eigenschaften identifiziert, die das Überleben, die Proliferation und die Disseminierung von Tumorzellen ermöglichen (Hanahan und Weinberg 2011). Im Zusammenhang mit Mutationen und der genomischen Instabilität spielt Zellstress eine wichtige Rolle, da zellulärer Stress potentiell zu DNA-Schäden führt und somit die genomische Stabilität gefährdet (Negrini et al. 2010, Tubbs und Nussenzweig 2017). Der Erhalt der genomischen Stabilität beruht wesentlich auf der Detektion von DNA-Schäden sowie deren Reparatur. Die entsprechenden Reparaturmechanismen sind in malignen Zellen häufig defekt, was vermehrt zu Mutationen führt (Negrini et al. 2010). Vor dem Hintergrund des Mehrstufenmodells der Karzinogenese ermöglicht dies den Erwerb karzinogener Eigenschaften, was die genomische Instabilität als Charakteristikum von Tumorzellen begründet (Hanahan und Weinberg 2011). Die erwähnten karzinogenen Eigenschaften ergeben sich insbesondere durch die Aktivierung von Proto-Onkogenen zu Onkogenen, die Ausschaltung von Tumorsuppressorgenen sowie Funktionsstörungen von Reparaturgenen und Apoptose-regulierenden Genen. Es handelt sich um sogenannte Schlüssel-Gene der Karzinogenese (Kopin 2000, Lee und Muller 2010).

## **1.2 Hormonabhängige Tumore**

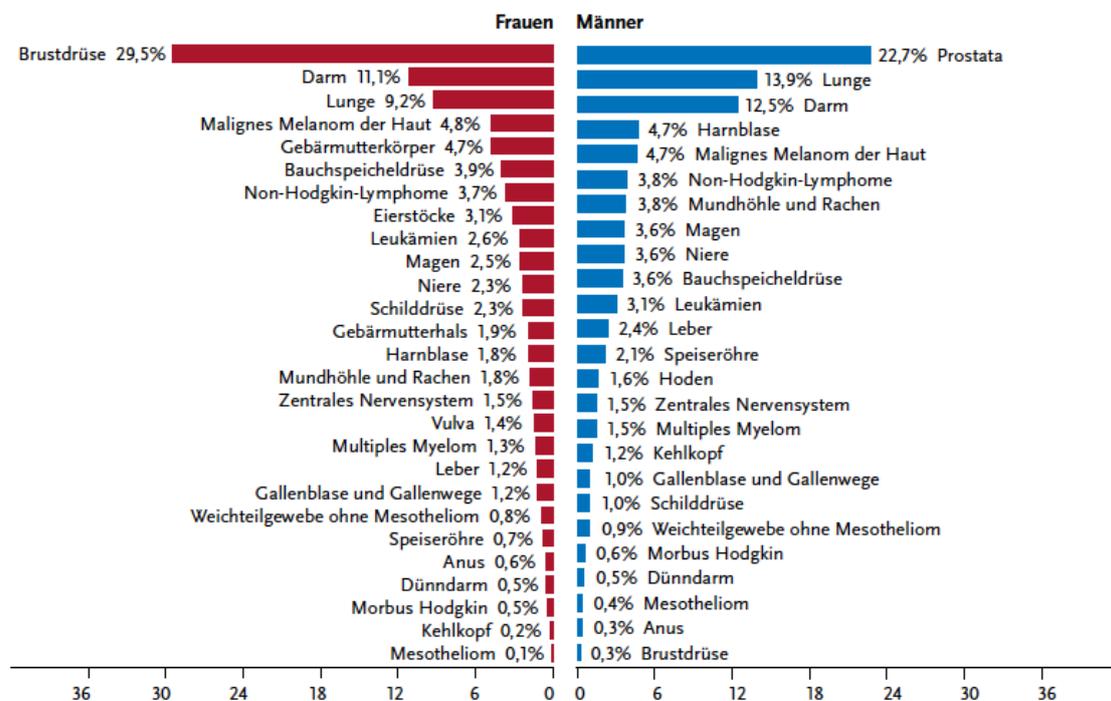
Eine Eigenschaft von malignen Tumoren ist ihr von Wachstumssignalen entkoppeltes, autonomes Wachstum. Zu den zugrunde liegenden Mechanismen gehören beispielsweise das Abschalten wachstumshemmender oder Apoptose-induzierender Signale sowie die konstitutionelle Aktivierung von Signalkaskaden des Wachstums (Hanahan und Weinberg 2011). Einige Tumore wachsen in Abhängigkeit körpereigener Hormone. Dazu gehören unter anderem das Mamma- und das Prostatakarzinom. Die Hormonabhängigkeit eines Tumors bietet einen therapeutischen Ansatzpunkt, indem durch einen Hormonentzug in Form einer anti-hormonellen Therapie gezielt der Wachstumsreiz des Tumors ausgeschaltet wird (Ulm et al. 2019). Dieser Zusammenhang zwischen Onkologie und Endokrinologie konnte bereits 1899 anhand der Wirksamkeit der Kastration beim Mammakarzinom gezeigt werden (Beatson 1899). Voraussetzung für die Rezeption eines Hormons als Wachstumssignal sowie für eine antihormonelle Therapie ist folglich die Expression von Hormonrezeptoren des Tumors. Diese anti-hormonelle Therapiestrategie versagt demnach z. B. beim Triple-negativen Mammakarzinom, welches keine Hormonrezeptoren exprimiert (Szostakowska et al. 2019). Im Allgemeinen werden anti-hormonelle Therapien ergänzend zu operativen Verfahren bzw. zu Strahlen- und Chemotherapien eingesetzt. In früheren Studien konnte die Arbeitsgruppe des Instituts für Tumorbologie am UKE zeigen, dass sich unter Hormonentzug in Brustkrebszellen auch eine verstärkte Expression von Retinoic-acid induced 2 (RAI2) zeigt (Werner et al. 2015). Dies zeigte erstmals eine Assoziation von RAI2 mit der Östrogenantwort in hormonabhängigen Brustkrebszellen.

### **1.2.1 Das Mammakarzinom**

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau (Abbildung 1) und besitzt eine Lebenszeitprävalenz von 12 %. Statistisch erkrankt demnach jede 8. Frau in Deutschland im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2019). Die 5-Jahres-Überlebensrate (Gesamtüberleben) stieg in den letzten Jahren auf 87 %, dennoch ist das Mammakarzinom die häufigste Krebstodesursache der Frau (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister

in Deutschland e.V. 2019). Zu den wichtigsten Risikofaktoren gehören eine genetische Prädisposition sowie endokrine Risikofaktoren, die unter anderem einen langen hormonell aktiven Zeitraum, Nulligravidität und eine postmenopausale Hormonersatztherapie umfassen. Weitere Risikofaktoren bestehen in einem fortgeschrittenen Lebensalter, einer positiven Anamnese für Risikoläsionen, Noxen sowie weiteren Faktoren (Wörmann 2014). Bei den hereditären Risikofaktoren sind vor allem Mutationen der Tumorsuppressorgene Breast-Cancer 1 und 2 (BRCA1, BRCA2) sowie Mutationen von Partner-and-localizer-of-BRCA2 (PALB2) hervorzuheben, da diese mit einem signifikant erhöhten Erkrankungsrisiko einhergehen (Antoniou et al. 2014, Kast et al. 2016). Die Früherkennung (Sekundärprävention) des Mammakarzinoms ist wichtig, um Karzinome in frühen, auf die Brustdrüse beschränkten Stadien zu entdecken und so die Anzahl der in höheren Stadien entdeckten Karzinome zu verringern und somit die Brustkrebssterblichkeit effektiv zu senken (Broeders et al. 2012, Leitlinienprogramm Onkologie 2020a). Standard in der Früherkennung ist derzeit die zweijährliche Mammographie zwischen dem 50. und 69. Lebensjahr, bei hohem Risiko ist das Mamma-MRT zusätzlicher Bestandteil der Früherkennung. Die Diagnosesicherung erfolgt in der Regel stanz- oder vakuumbioptisch. Therapeutisch steht die operative Entfernung des Tumors im Vordergrund. Dabei wird in der Regel brusterhaltend operiert und eine adjuvante Strahlentherapie durchgeführt. Zudem gibt es verschiedene Optionen einer systemischen (neo)adjuvanten Chemo-/Antihormontherapie (Leitlinienprogramm Onkologie 2020a). Das Mammakarzinom weist eine frühe lymphogene und hämatogene Metastasierung auf. Die lymphogene Metastasierung erfolgt vor allem in die regionalen axillären Lymphknoten, in die parasternalen Lymphknoten entlang der Arteria thoracica interna sowie im Verlauf auch in nicht-regionale Lymphknoten (Rahbar et al. 2012). Hämatogene Metastasen treten meist als osteolytische Metastasen in Wirbelsäule, Becken oder langen Röhrenknochen auf, in abnehmender Häufigkeit gefolgt von Metastasen in Lunge, Gehirn und Leber (Berman et al. 2013). Die Prognose des Mammakarzinoms ist unter anderem abhängig vom Tumorstadium (TNM) bei der Erstdiagnose sowie dem molekularen Subtyp, welcher anhand der Expression von Hormonrezeptoren (HR) bestimmt wird (Leitlinienprogramm Onkologie 2020a). Der molekulare Subtyp sowie der Proliferationsmarker Ki-67

können anhand der Stanzbiopsie bestimmt werden. Immunhistochemisch unterscheidet man Luminal A (HR-positiv, HER2-negativ, Ki-67 niedrig), Luminal B (HR-positiv, HER2-negativ, Ki-67 hoch), Triple-negativ (HER2-negativ, HR-negativ) und HER2-Subtyp (HER2-positiv) (Leitlinienprogramm Onkologie 2020a). Aus dem Hormonrezeptorprofil ergeben sich verschiedene anti-hormonelle-Therapiestrategien: die AWMF-Leitlinie empfiehlt für Luminal A eine endokrine Therapie, während bei den übrigen Subtypen in der Mehrzahl der Fälle eine Chemotherapie empfohlen wird, bei HER2-Positivität zusätzlich eine Anti-HER2-Therapie (Leitlinienprogramm Onkologie 2020a). Triple-negative und HER2-positive Karzinome weisen eine höhere Rezidivrate und somit eine schlechtere Prognose auf (Langlands et al. 2013).



**Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016.**

Abbildung aus (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2019)

### 1.2.2 Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom ist der häufigste maligne Tumor des Mannes (Abbildung 1) und nach dem Lungenkarzinom die zweithäufigste Krebstodesursache des Mannes (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2019). Die Lebenszeitprävalenz für ein

klinisch auffälliges Prostatakarzinom beträgt 11 %, wobei die Prävalenz klinisch unauffälliger Prostatakarzinome in Autopsiestudien deutlich höher angegeben wird (Bell et al. 2015, Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2019). Den wichtigsten Risikofaktor stellt das Lebensalter dar, ein weiterer wichtiger Risikofaktor besteht in der familiären Disposition (Johns und Houlston 2003, Zeegers et al. 2003, Leitlinienprogramm Onkologie 2019a). Das Prostatakarzinom bleibt klinisch lange asymptomatisch, weswegen der Früherkennung eine besondere Bedeutung zukommt. Dazu werden die digital-rektale Untersuchung sowie die Bestimmung des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) und ergänzend die transrektale Sonographie (TRUS) gezählt, wobei das Screening mittels PSA aufgrund der potentiellen Überdiagnostik von klinisch inapparenten Prostatakarzinomen umstritten ist (Leitlinienprogramm Onkologie 2019a). Zur Diagnosesicherung erfolgt eine sonographisch gesteuerte, transrektale Stanzbiopsie. Zusätzlich empfiehlt die S3-Leitlinie, palpatorisch auffällige sowie in bildgebenden Verfahren suspekte Läsionen zu biopsieren. Zu additiv eingesetzten Verfahren zählt die Magnetresonanztomographie (MRT)-Fusionsbiopsie, bei der MRT und Sonographie kombiniert werden, um gezielt Biopsien aus verdächtigen Läsionen zu entnehmen (Wegelin et al. 2017, Leitlinienprogramm Onkologie 2019a). Die histopathologische Untersuchung der Stanzbiopsie erlaubt mithilfe des Gleason-Scores ein histopathologisches Grading, welches für die Therapieentscheidung herangezogen wird und zudem prognostischen Wert besitzt (Gleason 1966, Epstein et al. 2016, Leitlinienprogramm Onkologie 2019a). Therapeutisch stehen je nach Stadium operative Verfahren (offen, laparoskopisch, robotisch), eine Radiatio, antiandrogene Pharmaka sowie adjuvante Chemotherapien zur Auswahl (Leitlinienprogramm Onkologie 2019a). Zu den Komplikationen des Prostatakarzinoms gehören einerseits therapieassoziierte Komplikationen, andererseits die Metastasierung in die pelvinen Lymphknoten sowie ossäre Metastasen (Bubendorf et al. 2000). Bei der Progression des Prostatakarzinoms unterscheidet man zwischen hormonsensitivem, nicht-hormonsensitivem (kastrationsresistentem) und metastasiertem Prostatakarzinom (Katsogiannou et al. 2015). Über 90 % der Prostatakarzinome exprimieren Androgenrezeptoren (AR), weswegen der AR und Androgen-

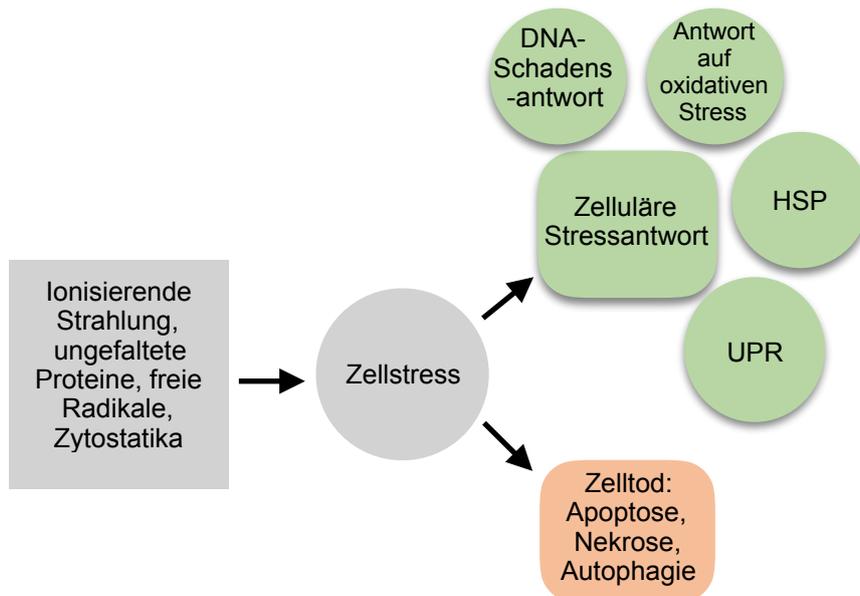
bildende Enzyme geeignete Zielstrukturen antiandrogener Therapien sind (Ulm et al. 2019). Die Prognose des Prostatakarzinoms ist abhängig von Gleason-Score, TNM-Stadium und dem Zustand der Resektionsränder in der Operation (Humphrey 2004, Epstein et al. 2016, Leitlinienprogramm Onkologie 2019a).

Prostata- und Mammakarzinome sind die häufigsten malignen Tumorerkrankungen in Deutschland. Bei beiden Entitäten handelt es sich um hormonabhängige Tumore und es finden sich auf molekularer sowie zellulärer Ebene möglicherweise ähnliche Mechanismen. Ein solcher Mechanismus könnte die Antwort auf Zellstress darstellen. In Brustkrebszellen konnte bereits ein Zusammenhang zwischen zellulärem Stress - in Form von Hormonentzug und Hypoxie - und einer veränderten RAI2-Expression nachgewiesen werden (Werner et al., unpubliziert).

### **1.3 Zellstress in Krebszellen**

Zellen sind permanent verschiedenen Stressfaktoren ausgesetzt, welche die genomische Stabilität der Zelle gefährden und somit zur Entstehung und Progression von Krebserkrankungen beitragen (Negrini et al. 2010). Die genomische Instabilität spielt bei der Charakterisierung von malignen Tumoren eine wichtige Rolle, da sie zur genetischen Heterogenität des Tumors beiträgt, die wiederum Resistenzen gegenüber Tumorthérapien begünstigt (Renovanz und Kim 2014). Die genomische Instabilität sowie Mutationen von beispielsweise Tumorsuppressorgenen, die mit einem selektiven Überlebensvorteil der Zelle einhergehen, werden zur neuen Generation der *Hallmarks of Cancer* gezählt (Hanahan und Weinberg 2011). Um adäquat auf unterschiedliche Formen von Zellstress zu reagieren und so die genomische Stabilität zu erhalten, besitzen Zellen evolutionär hoch konservierte Reparaturmechanismen. Dazu gehören die Bildung von Hitzeschockproteinen, die DNA-Schadensantwort, die Antwort auf ungefaltete Proteine (UPR) und die Antwort auf oxidativen Zellstress (Fulda et al. 2010) (Abbildung 2). Krebszellen verfügen demgegenüber häufig über defekte Reparaturmechanismen, was eine Schwachstelle der Krebszelle darstellt und in diesem Zusammenhang potentielle Ansatzpunkte für spezifische Tumorthérapien bietet (O'Connor 2015, Nestic et al. 2017, Nickoloff et al. 2017). Ein detailliertes Verständnis von

Zellstresswegen ist daher für die Identifikation von Komponenten der Signalwege als Targets für neue Tumorthérapien unabdingbar (Chircop und Speidel 2014). Dies zeigt beispielsweise der Einsatz von Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP)-Inhibitoren, die in Zellen mit defekter homologer Rekombinationsreparatur (HRR) durch die Inhibition der Basenexzisionsreparatur (BER) den Zelltod induzieren (Lord und Ashworth 2017). In Zellen mit einer BRCA1- oder BRCA2-Mutation ist der HRR DNA-Reparaturmechanismus defekt, sodass das Überleben der Zelle vermehrt von anderen DNA-Reparaturmechanismen wie der BER abhängig ist, deren Schlüsselenzym PARP ist (Lord und Ashworth 2017). Indem PARP-Inhibitoren dieses Schlüsselenzym des alternativen Reparaturwegs blockieren, kommt es zu einem kombinierten Reparaturdefekt und somit zum Zelltod. Dieser Wirkmechanismus wird als synthetische Letaliät bezeichnet (Farmer et al. 2005, Nijman 2011, del Rivero und Kohn 2017). Auch andere Komponenten der DNA-Schadensantwort stellen potentielle Zielstrukturen von Krebstherapien dar. Dazu gehören unter anderem Proteine, die DNA-Schäden detektieren sowie Proteine der aktivierten Signalwege, z. B. die Serin-Proteinkinase ATM (Brown et al. 2017). Ein ebenfalls potentiell an der zellulären Stressantwort beteiligtes Protein, ist das RAI2-Protein, dessen Expression unter Hypoxie und Hormonentzug induziert wird. Dies legt eine Beteiligung an zellulären Stressprozessen nahe (Werner et al., unpubliziert). RAI2 konnte darüber hinaus bereits als transkriptioneller Regulator für die Expression wichtiger epithelialer Differenzierungsmerkmale beim Mammakarzinom identifiziert werden, wobei eine geringe Genexpression von RAI2 als Indikator für eine frühe hämatogene Disseminierung von ER-positiven Mammakarzinomen herangezogen werden kann (Werner et al. 2015).

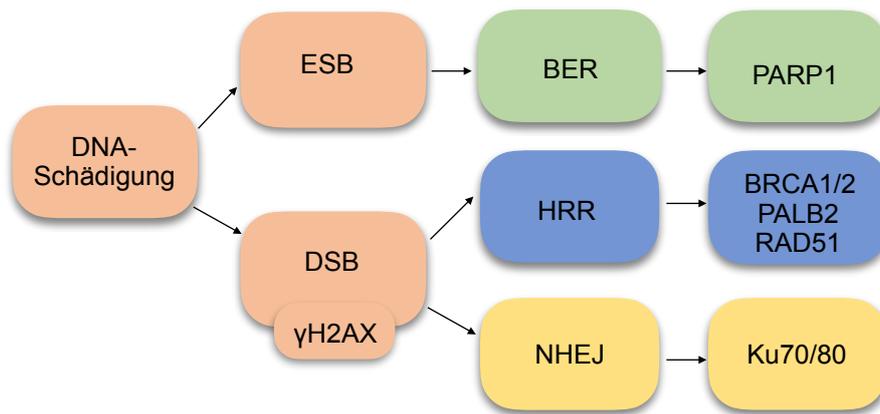


**Abbildung 2: Auslöser von Zellstress und die zelluläre Stressantwort.**

Ionisierende Strahlung, fehl- und ungefaltete Proteine, freie Radikale und DNA-schädigende Substanzen führen zu Zellstress und induzieren verschiedene Mechanismen der zellulären Stressantwort. Dazu gehören beispielsweise die DNA-Schadensantwort, die Antwort auf oxidativen Zellstress sowie die Bildung von Hitzeschockproteinen (HSP) sowie die Antwort auf ungefaltete Proteine (UPR) (Fulda et al. 2010). Alternativ kann der Zelltod eingeleitet werden, wozu die Apoptose als programmierter Zelltod sowie die Nekrose und die Autophagie gehören.

### 1.3.1 Antwort auf genotoxischen Zellstress

Genotoxischer Zellstress bezeichnet Schädigungen der DNA, beispielsweise durch UV-Licht, ionisierende Strahlung oder Chemikalien. DNA-Schäden erfordern effiziente DNA-Reparaturmechanismen, welche unter dem Begriff der DNA-Schadensantwort zusammengefasst werden. Diese umfasst die Basenexzisionsreparatur (BER), die Homologe Rekombinationsreparatur (HRR) und die Nicht-Homologe-Endverknüpfung (NHEJ) sowie die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER), die DNA-Fehlpaarungsreparatur (Mismatch repair) und die direkte Basen-Reparatur (Lord und Ashworth 2012) (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Reparaturwege bei DNA-Schädigung mit Doppelstrangbruch (DSB) oder Einzelstrangbruch (ESB).**

Kommt es in Folge einer DNA-Schädigung zu einem Einzelstrangbruch (ESB) wird die Basenexzisionsreparatur (BER) aktiviert, deren Schlüsselenzym PARP ist. Ein Doppelstrangbruch (DSB) wird durch das phosphorylierte Histon H2AX ( $\gamma$ H2AX) detektiert, woraufhin DNA-Reparaturproteine rekrutiert werden (Sharma et al. 2012). Die Homologe Rekombinationsreparatur (HRR) wird aktiviert. Beteiligte Komponenten sind Breast-Cancer 1 und - 2 (BRCA1, BRCA2), Partner-and-localizer of BRCA2 (PALB2) und das Radiation sensitive Protein 51 (RAD51). Einen alternativen Reparaturweg zur HRR stellt die Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) dar. Wichtige Komponenten sind die Proteine Ku70 und Ku80. Abbildung angelehnt an (Lord und Ashworth 2012).

Einzelstrangbrüche führen zu einer Aktivierung der BER, Doppelstrangbrüche zu einer Aktivierung der HRR bzw. der NHEJ (Takata et al. 1998, Lieber 2010, Krokan und Bjoras 2013). Die HRR findet hauptsächlich in der S- und G2-Phase des Zellzyklus statt und verwendet eine homologe DNA-Sequenz zur Wiederherstellung der geschädigten Sequenz, es handelt sich demnach um einen konservativen Reparaturmechanismus (Takata et al. 1998, Zhao et al. 2017). Da bereits ein einziger DSB zum Zelltod führen kann, ist dieser Reparaturmechanismus für die Zelle überlebenswichtig (Rich et al. 2000). Im Falle eines HRR-Defekts ist das Überleben der Zelle vermehrt von der NHEJ abhängig. Dabei handelt es sich um einen nicht-konservativen Mechanismus, der keine homologe DNA-Sequenz verwendet und folglich als fehleranfälliger gilt. Dies begünstigt fehlerhafte Reparaturen und somit Mutationen, die potentiell zur Tumorgenese und Tumorprogression beitragen (Lord und Ashworth 2012). Die BER entfernt bei ESB geschädigte Basen aus der Doppelhelix und ersetzt nach der Exzision der geschädigten Stelle diese durch neu synthetisierte DNA (David et al. 2007, Krokan und Bjoras 2013). Größere

ESB werden durch die NER repariert, indem mehrere Nukleotide ausgeschnitten werden. Das Mismatch-Reparatursystem behebt während der Replikation Fehler, die nicht durch die Korrekturfunktion der Polymerase bei der Replikation der DNA behoben wurden (Jiricny 2006). Eine weitere Möglichkeit besteht in der direkten Reparatur einer geschädigten Base, anstatt diese auszutauschen (Lord und Ashworth 2012).

Bei DNA-Schäden wird der Tumorsuppressor p53 induziert, welcher auch als Wächter des Genoms beschrieben wird (Lane 1992). Das p53-Protein verhindert, dass Zellen mit geschädigter DNA in die S-Phase des Zellzyklus eintreten: ein Zielgen von p53 ist p21, wobei es sich um einen Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase 1 (CDK1) und 2 (CDK2) handelt (Abbas und Dutta 2009, Karimian et al. 2016). Dadurch kommt es zu einem Zellzyklusarrest am G1- oder G2-Checkpoint. Weitere Zielproteine von p53 sind pro-apoptische Proteine der Bcl-2-Familie, z. B. das Bcl-2-assoziierte X Protein (Bax) (Pflaum et al. 2014).

Gelingt die Reparatur der Zelle nicht, wird die Apoptose eingeleitet, bei der man den extrinsischen und den intrinsischen Weg unterscheidet. Über den intrinsischen Weg werden bei DNA-Schäden intrazelluläre, proapoptische Proteine hochreguliert, welche die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran erhöhen. Dies führt zum Austritt von Cytochrom c ins Zytosol, wo Cytochrom c an den apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor 1 (APAF-1) bindet. Dieser Komplex bildet mit Pro-Caspase 9 die aktive Initiator-Caspase 9. Die resultierende Aktivierung der Effektor-Caspasen führt zur Kondensation des Chromatins und somit zur Schrumpfung des Zellkerns sowie zur Zellkern-Fragmentierung und letztendlich zum Zerfall der Zelle (Elmore 2007).

Defekte in den beschriebenen DNA-Reparaturmechanismen begünstigen die genomische Instabilität einer Zelle und tragen so zur Akkumulation von Mutationen bei, die letztendlich zur malignen Transformation und zur Krebsprogression führen (Negrini et al. 2010, Hanahan und Weinberg 2011). Intensiv untersuchte Beispiele für Mutationen, die zur genomischen Instabilität

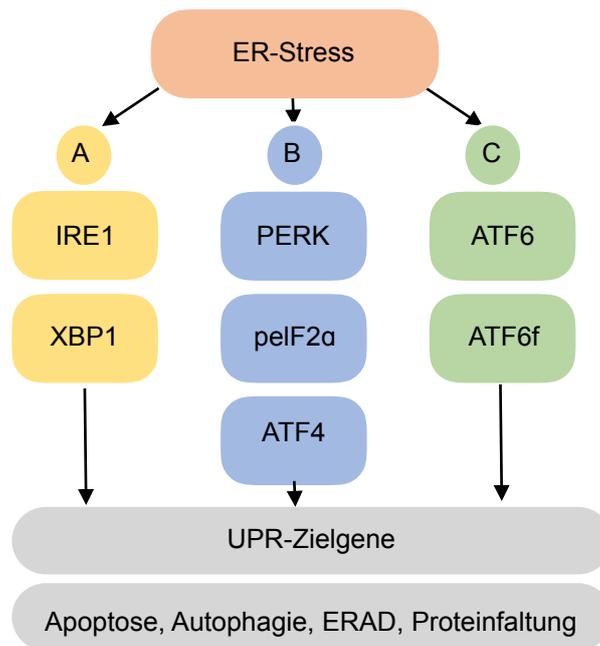
und zur Karzinogenese beitragen, sind beispielsweise BRCA1, BRCA2 und p53 (Lane 1992, Miki et al. 1994, Wooster et al. 1995, Zilfou und Lowe 2009, Roy et al. 2011, Kandoth et al. 2013). BRCA1 ist physiologisch im Rahmen der HRR an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB) beteiligt: nach der Exzision der geschädigten DNA durch den MRN-Komplex (MRE11, RAD50 und XRCC1) bindet zunächst das Replikationsprotein A an den Einzelstrang bevor dieses durch das Radiation sensitive Protein 51 (RAD51) abgelöst wird und die Synthese eines neuen homologen Stranges stattfindet. BRCA1 ist an der Endresektion und Rekrutierung von Reparaturproteinen beteiligt und interagiert ebenso wie BRCA2 mit RAD51 (Roy et al. 2011). Mutationen von BRCA1 und BRCA2 erhöhen signifikant das Erkrankungsrisiko für Mamma- und Ovarialkarzinome sowie für weitere Tumore wie Pankreas- und Prostatakarzinome (King et al. 2003, Bancroft et al. 2014, Luo et al. 2015).

Im Zusammenhang mit genotoxischem Zellstress spielen neben den beschriebenen Signalwegen wahrscheinlich auch Paraspeckles eine Rolle. Paraspeckles sind subnukleäre Strukturen, die 2002 erstmals identifiziert wurden (Fox et al. 2002). Sie bestehen aus langer nicht-kodierender RNA (nuclear-enriched abundant transcript 1; NEAT1) (Nakagawa et al. 2018). Weitere identifizierte Strukturen in Paraspeckles sind die Paraspeckle Proteine 1 und 2 (PSPC) sowie das Non-POU domain-containing octamer-binding Protein (NONO), deren Interaktion mit NEAT1 für die Paraspeckle-Bildung entscheidend ist (Fox et al. 2005, Bond und Fox 2009). Paraspeckles sind an der Kontrolle der Genexpression beteiligt, indem sie Adenosin-zu-Inosin editierte RNA im Kern zurückhalten können. Durch diesen Mechanismus tragen sie wahrscheinlich zur Zelldifferenzierung bei (Bond und Fox 2009, Fox und Lamond 2010). Außerdem spielen Paraspeckles im Rahmen von zellulärem Stress eine Rolle: p53 sowie virale Infektionen führen zur Hochregulation der NEAT1-Expression und induzieren so die Bildung von Paraspeckles (Adriaens et al. 2016, Mello et al. 2017). Bei Replikationsstress fördert NEAT1 den ATM/ATR Signalweg und ist somit an einer negativen Feedback-Schleife beteiligt, welche die Aktivierung von p53 abschwächt (Adriaens et al. 2016). Zudem moduliert mitochondrialer Stress die Paraspeckle-Bildung und es besteht eine wechselseitige Mitochondrien-Paraspeckle-Regulation: Paraspeckles

detektieren mitochondrialen Stress durch eine Activating transcription factor 2 (ATF2)-vermittelte NEAT1 Transkriptionsregulation, die wiederum zu einer Modifikation der Paraspeckle-Bildung führt sowie zu einer Veränderung mitochondrialer Prozesse. Diese Kommunikation zwischen Mitochondrien und Paraspeckles führt zur Modifikation von in Paraspeckles zurückgehaltener, mitochondrialer messenger RNA (mRNA), was zu Veränderungen in der Genexpression führt (Wang et al. 2018b). Adriaens et al. zeigen zudem, dass NEAT1 ein potentielles Target in der Therapie maligner Tumore darstellt, da sich in Zellen mit NEAT1-Verlust eine synthetische Letalität nach der Behandlung mit genotoxisch wirkenden PARP-Inhibitoren zeigt. Dies verdeutlicht den Zusammenhang zwischen genotoxischem Zellstress, der Regulation von NEAT1 und der Bildung von Paraspeckles (Adriaens et al. 2016).

### **1.3.2 Antwort auf ungefaltete Proteine (UPR)**

Fehlerhaft gefaltete und ungefaltete Proteine erzeugen Stress im endoplasmatischen Retikulum. Dies aktiviert den Signalweg der Antwort auf ungefaltete Proteine (UPR), bei der es sich um einen evolutionär konservierten Mechanismus zur Qualitätskontrolle von Proteinen handelt (Shen et al. 2004, Hetz 2012). Die UPR dient der Wiederherstellung der normalen Zellfunktion und somit dem Vitalitätserhalt der Zelle. Dies funktioniert einerseits durch den Abbau der inkorrekt gefalteten bzw. ungefalteten Proteine sowie andererseits durch eine Inhibition der Translation und die Induktion von Chaperonen. Bei chronischem oder irreversiblen Stress im Endoplasmatischen Retikulum (ER-Stress) wird die Apoptose der Zelle eingeleitet (Hetz und Papa 2018). Die UPR kann über verschiedene Stresssignale aktiviert werden: Inositol-requiring Protein 1 (IRE1), Proteinkinase RNA-like ER Kinase (PERK) und Activating Transcription Factor 6 (ATF6) (Ron und Walter 2007) (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der UPR-Signalwege.**

(A) Die Dimerisierung und Autophosphorylierung von Inositol-requiring Protein 1 (IRE1 $\alpha$ ) induziert das Spleißen von X box-binding protein 1 (XBP1u). Dadurch entsteht der der aktive Transkriptionsfaktor spliced XBP1 (XBP1s) (Yoshida et al. 2001). Der aktivierte Transkriptionsfaktor XBP1s führt zur Transkription von Genen, deren Proteine unter anderem an der Faltung von Proteinen beteiligt sind (Acosta-Alvear et al. 2007, Hetz 2012). Außerdem rekrutiert XBP1u die eigene mRNA an die Membran, was zu einer Verstärkung des Spleißens führt und so im Sinne einer positiven Rückkopplung eine stärkere Antwort auf ER-Stress ermöglicht (Yanagitani et al. 2009). (B) Die Proteinkinase RNA-like ER Kinase (PERK) phosphoryliert den eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ), was die Translation von Activating Transcription Factor 4 (ATF4)-mRNA ermöglicht. ATF4 reguliert Zielgene, die unter anderem an der Apoptose beteiligt sind (Hetz 2012, McQuiston und Diehl 2017). (C) Bei Zellstress wird Activating Transcription Factor 6 (ATF6) im Golgi-Apparat gespalten und ein Fragment (ATF6f) fungiert anschließend als Transkriptionsfaktor. Zudem reguliert dieser Signalweg XBP1 und stellt damit eine Verbindung zwischen den Signalwegen dar (Chen et al. 2002, Lee et al. 2002). Abbildung angelehnt an (Hetz 2012).

In malignen Zellen herrschen durch relativen Nährstoffmangel, Hypoxie und oxidativen Stress Bedingungen, die ER-Stress provozieren (Cubillos-Ruiz et al. 2017). ER-Stress konnte in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden, beispielsweise in Mamma-, Prostata- und Pankreaskarzinomen (Wang und Kaufman 2014). Maligne Zellen können geringen ER-Stress tolerieren, anhaltende Stresssignale führen jedoch zur Einleitung des Zelltodes. Dies stellt einen Ansatzpunkt für pharmakologische Therapien dar, die ER-Stress erzeugen und dadurch den Zelltod induzieren (Wang et al. 2018a). Allerdings

nimmt die UPR in malignen Zellen eine bisher nicht gänzlich verstandene, duale Rolle ein, da sie einerseits Reparaturprozesse einleiten kann und somit Tumorsupportiv wirkt, andererseits die Apoptose einleiten kann und so Tumorsuppressiv wirkt (Vandewynckel et al. 2013, Clarke et al. 2014, Wang und Kaufman 2016, Cubillos-Ruiz et al. 2017). Für das Mammakarzinom konnte beispielsweise die chronische Aktivierung der UPR als Mechanismus der Tumorprogression belegt werden (Sisinni et al. 2019). Auch für das Prostatakarzinom spielen ER-Stress und die UPR eine Rolle, wie sich beispielsweise in der Androgen-regulierten UPR-Aktivierung zeigt (Storm et al. 2016). Aus diesen Erkenntnissen lassen sich potentielle Therapieansätze ableiten. Mögliche Strategien, welche die Mechanismen der UPR für anti-neoplastische Effekte nutzen, bestehen in der Inhibition von Komponenten der UPR sowie in der konstanten Applikation von ER-Stress (Ojha und Amaravadi 2017). Bei den Pharmaka mit nachgewiesener antineoplastischer Wirksamkeit lassen sich unterscheiden: Bindendes Immunglobulinprotein (BiP)-Inhibitoren, Inhibitoren des Spleißens von XBP1, PERK-Inhibitoren, eIF2 $\alpha$ -Inhibitoren, ATF6-Inhibitoren sowie Inhibitoren des ER-assoziierten Proteinabbaus (ERAD) (Wang et al. 2018a). Einige der genannten Pharmaka (z. B. BiP-Inhibitoren) wirken über die Aktivierung bzw. Hochregulation der UPR, während andere (PERK-Inhibitoren) die UPR-Inhibieren (Wang et al. 2018a).

### **1.3.3 Pharmakologisch induzierte Stressantworten**

Die beschriebenen zellulären Stressantworten lassen sich experimentell mithilfe verschiedener Pharmaka induzieren. Die Zytostatika Etoposid und Camptothecin sowie der PARP-Inhibitor Olaparib erzeugen genotoxischen Zellstress: Etoposid und Camptothecin führen durch Inhibition der Topoisomerase I bzw. II zu DSB (Montecucco et al. 2015, PubChem 2020c), Olaparib inhibiert PARP und somit die BER und ist unter anderem für die Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms mit BRCA-Mutation zugelassen (FDA 2018). In dieser Arbeit werden die genannten Pharmaka verwendet, um die Rolle von RAI2 im Rahmen der Zellstresswege bei genotoxischem Zellstress zu untersuchen. Als Markerproteine werden die Proteine p21 und p53 sowie außerdem  $\gamma$ H2AX verwendet. Histon  $\gamma$ H2AX ist an der Rekrutierung verschiedener DNA-Reparaturproteine beteiligt und stellt

einen sensitiven Marker für DSB dar (Yuan et al. 2010). Als Paraspeckle-Marker werden PSPC1 und NONO verwendet.

Darüber hinaus wird Gentamicin als weiteres Pharmakon zur Induktion von Zellstress verwendet. Es handelt sich um ein Aminoglykosid-Antibiotikum, das den Stopcodon-vermittelten Abbau der mRNA (Nonsense-mediated mRNA Decay, NMD) inhibiert (PubChem 2020a). Dabei handelt es sich um einen Kontrollmechanismus, der vorzeitige Stopcodons in der mRNA erkennt, deren Expression blockiert und so die Bildung verkürzter, nicht funktionaler Proteine verhindert. Indem Gentamicin diesen Mechanismus inhibiert, kommt es konsekutiv zur Expression von Transkripten mit vorzeitigen Stop-Codons (Premature terminating codon, PTC), was einen therapeutischen Ansatz bei NMD-assoziierten Erkrankungen darstellt (Holbrook et al. 2004, Maquat 2004). Gentamicin führt zudem zu oxidativem Stress in der Zelle, was zur Ototoxizität und mutmaßlich auch zur Nephrotoxizität von Gentamicin beiträgt (Jiang et al. 2016). Oxidativer Stress und die resultierenden oxidativen Schäden tragen maßgeblich zur Entstehung und Progression von Krebserkrankungen bei (Klaunig 2018). Anti-oxidative Mechanismen, welche die Homöostase der Zelle erhalten, umfassen anti-oxidative Enzyme wie Superoxid-Dismutasen, Katalasen und Glutathion (Sabharwal und Schumacker 2014). Gentamicin wird in dieser Arbeit daher zur Inhibition der NMD eingesetzt sowie zur Erzeugung von oxidativem Zellstress.

Eine weitere Komponente der zellulären Stressantwort ist die UPR, welche durch fehlgefaltete und ungefaltete Proteine im Endoplasmatischen Retikulum aktiviert wird. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass das Nukleosid-Antibiotikum Tunicamycin geeignet ist, in Experimenten die UPR zu induzieren (Wang et al. 2015). Daher wird in dieser Arbeit Tunicamycin zur Untersuchung der Rolle von RAI2 im Rahmen der UPR als Teil der zellulären Stressantwort eingesetzt. Als Marker für die UPR wird die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  verwendet.

Die Einleitung der Apoptose lässt sich experimentell mithilfe von Cycloheximid induzieren (Clemens et al. 1998). Cycloheximid blockiert bei der Translation die

Elongation am Ribosom und somit die Proteinbiosynthese. Es handelt sich um einen klassischen Translationshemmer (Cammack et al. 2006). Die Apoptose kann ebenfalls durch den CDK-Inhibitor Flavopiridol eingeleitet werden. Flavopiridol bindet kompetitiv an die ATP-Bindungsdomäne der CDKs, führt zu einer Reduktion der Aktivität und zu einem Zellzyklusarrest (Sedlacek 2001). Durch die Inhibition von CDK9 kommt es zudem zu einer verminderten Phosphorylierung von Ribonukleinsäure (RNA) Polymerase II, welche für die Transkription essentiell ist. Flavopiridol inhibiert somit die Transkription (Chao et al. 2000, Sedlacek 2001). Flavopiridol zeigt *in vitro* sowie *in vivo* eine Anti-Tumor-Aktivität gegenüber dem humanen, cholangiozellulären Karzinom, was weitere Untersuchungen von Flavopiridol als potentiell Chemotherapeutikum für diesen Tumor nahelegt (Saisomboon et al. 2019).

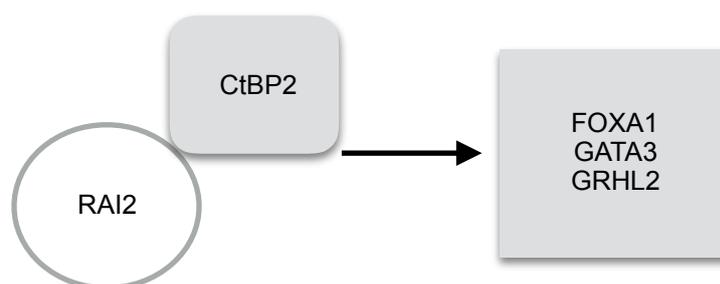
#### **1.4 Das Retinoic acid-induced 2 (RAI2) Protein**

Das RAI2 Protein wurde 2015 als neues Tumorsuppressor-Protein identifiziert, welches in Brustkrebszellen an der Zelldifferenzierung beteiligt ist und dessen Verlust mit einer signifikanten Verschlechterung der Prognose einhergeht (Werner et al. 2015). Wie bereits beschrieben, gehören Metastasen zu den Komplikationen des Mammakarzinoms. Ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Auftreten von Fernmetastasen beim Mammakarzinom ist das Auftreten von zirkulierenden Tumorzellen (DTCs) im Knochenmark (Bidard et al. 2008). Ruhende DTCs zeigen keine Proliferation und sind daher resistent gegenüber Chemotherapien (Kang und Pantel 2013). Eine geringe Genexpression von Retinoic acid-induced 2 (RAI2) korreliert bei Patientinnen mit ER-positiven Mammakarzinomen mit einer erhöhten Anzahl von DTCs im Knochenmark sowie mit einer signifikanten Reduktion der Überlebenschancen (Werner et al. 2015). Der Verlust von RAI2 in luminalen Brustkrebszelllinien führt in Form einer Herunterregulation von ER $\alpha$ , Forkhead Box A1 (FOXA1) und GATA Binding Protein 3 (GATA3) zu einer Entdifferenzierung der Karzinomzellen (Werner et al. 2015). FOXA1 und GATA3 sind wichtige Faktoren in der Aufrechterhaltung der epithelialen Differenzierung. Ein Verlust von FOXA1 und GATA3 entspricht einer Entdifferenzierung und ist als Hinweis auf eine zunehmende Invasivität und Aggressivität der Tumorzellen zu werten (Kouros-Mehr et al. 2006, Bernardo et al. 2010). Diese

Entdifferenzierung kann auch in Bezug auf den Verlust der Hormonabhängigkeit in Mammakarzinomzellen mit RAI2-Expressionsverlust beobachtet werden (Werner et al. 2015). Die Assoziation zwischen RAI2 und hormonabhängigem Tumorstadium zeigt sich sowohl in Mamma- als auch in Prostatakarzinomzellen: eine Ausschaltung von RAI2 führt zu einer verminderten Expression des AR in Prostatakarzinomzellen und ebenso zu einer verminderten Expression des ER in Mammakarzinomzellen (Besler 2018). Zudem zeigt sich eine vermehrte Resistenz der beiden Karzinomzelllinien mit RAI2-Verlust gegenüber einer chemischen Kastration durch eine antiöstrogene bzw. antiandrogene Behandlung (Besler 2018). Darüber hinaus zeigt sich in Mammakarzinomzellen mit RAI2-Verlust eine verstärkte Phosphorylierung und damit Aktivierung von Proteinkinase B (AKT) sowie eine Resistenz gegenüber dem mTOR-Inhibitor Everolimus (Werner et al. 2015). Der AKT-Signalweg gehört zu den wichtigen Proliferations-Signalwegen. Mutationen in diesem Signalweg oder in dessen Regulationsmechanismen tragen zur malignen Transformation von Zellen bei (Kumar et al. 2013). RAI2 agiert in Brustkrebszellen demnach als möglicher transkriptioneller Regulator für die Expression wichtiger epithelialer Differenzierungsfaktoren. Außerdem stellt eine erniedrigte Genexpression von RAI2 einen Indikator für eine frühe hämatogene Disseminierung von ER-positiven Mammakarzinomen dar (Werner et al. 2015). RAI2 wurde inzwischen außerdem als Tumorsuppressor beim kolorektalen Karzinom identifiziert (Yan et al. 2018). RAI2 inhibiert in dieser Tumorentität den AKT-Signalweg, induziert die Apoptose und unterdrückt die Migration und Invasion des Kolonkarzinoms. Die Expression von RAI2 wird wiederum durch eine Promotor-Methylierung reguliert (Yan et al. 2018). Die Promotor-Hypermethylierung führt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer Suppression von RAI2 in kolorektalen Karzinomzellen und stellt einen negativen prognostischen Marker hinsichtlich der 5-Jahres-Überlebensrate beim kolorektalen Karzinom dar (Yan et al. 2018).

Eine Analyse der Bindungspartner des RAI2-Proteins zeigt eine Interaktion mit dem C-terminal binding protein (CtBP), wobei die Bindung von den ALDLS-Bindungsstellen des RAI2-Proteins abhängig ist (Werner et al. 2015). Außerdem zeigte sich in Brustkrebszellen eine Colokalisation von RAI2 und

CtBP in Speckles im Zellkern (Werner et al. 2015). CtBP1 und CtBP2 sind transkriptionelle Co-Repressoren, deren Überexpression zur Tumorentstehung und -progression beiträgt. Dazu gehört eine Veränderung der Regulation von Genen, die mit dem Erwerb von Eigenschaften maligner Zellen assoziiert sind und die Proliferation, Migration und Invasion sowie die Epithelial-Mesenchymale-Transformation betreffen (Chinnadurai 2009, Di et al. 2013, Blevins et al. 2017). Aufgrund dieser Tumor-begünstigenden Eigenschaften, wird der Co-Repressor CtBP1 als vielversprechendes Target in der Tumorthherapie betrachtet (Blevins et al. 2017). In aggressiven Mammakarzinomen sind multiple CtBP-Zielstrukturen herunterreguliert, was mit einer verkürzten Überlebenszeit der Patientinnen einhergeht (Di et al. 2013). In Mammakarzinomzellen ist CtBP außerdem an der Bildung eines Komplexes beteiligt, der den BRCA1-Promotor inhibiert (Di et al. 2010). Dies stellt einen Bezug zur DNA-Schadensantwort dar, da BRCA1 als Komponente der HRR an der Reparatur von DSB beteiligt ist (Helleday et al. 2007, Di et al. 2010). Demgegenüber führt ein Verlust von CtBP zu einer erhöhten DNA-Reparaturkapazität (Di et al. 2013). Ein Verlust der RAI2-Expression führt wiederum zu einer Reduktion der Expression von CtBP2-abhängigen Zell-Differenzierungsmarkern wie Grainyhead-like Transkriptionsfaktor 2 (GRHL2), FOXA1 und GATA3, was eine Beteiligung von RAI2 an der Transkriptionskontrolle dieser Gene nahelegt (Werner et al. 2015).



**Abbildung 5: Die Rolle von RAI2 in der Differenzierung von Mammakarzinomzellen.**

Die Interaktion von RAI2 und CtBP2 in differenzierten Mammakarzinomzellen verhindert die CtBP2-vermittelte Suppression der Expression von Differenzierungsfaktoren wie GATA3, FOXA1 und GRHL2.

Die molekulare Interaktion mit CtBP und die sich überschneidenden Funktionen in der Expressionsregulation von Schlüsselgenen in der Tumorgenese des Mammakarzinoms legen nahe, dass RAI2 ein Metastasierungs-assoziiertes

Protein ist, das die Differenzierung von luminalen Mammakarzinomzellen aufrecht erhält (Werner et al. 2015). Aufgrund der jeweils partiell bekannten Funktionen von RAI2 und CtBP bzw. von Speckles im Zusammenhang mit Zellstress stellt sich die Frage, ob die Proteine eine gemeinsame Rolle in der zellulären Stressantwort besitzen.

Bisherige Studien der Arbeitsgruppe am Institut für Tumorbologie am UKE zeigen außerdem einen Zusammenhang zwischen Hormonentzug bzw. Hypoxie und einer Hochregulation der RAI2-Proteinexpression in hormonabhängigen Mamma- und Prostatakarzinomzellen (Werner et al., unpubliziert). Da beide Bedingungen Zellstress auslösen, lässt die verstärkte Expression von RAI2 vermuten, dass das RAI2-Protein eine Rolle in der zellulären Stressantwort spielt. Diese potentielle Funktion soll in dieser Arbeit untersucht werden. Mithilfe verschiedener Pharmaka können gezielt bestimmte Stress-Signalwege induziert werden. Diese Aktivierung kann mittels etablierter Marker für verschiedene Formen von Zellstress erfasst werden. Die Marker, welche bei Aktivierung eines Zellstress-Signalweges mit der Expression von RAI2 korrelieren, könnten somit Aufschluss über die Funktion von RAI2 in der zellulären Stressantwort geben.

## 2. Fragestellung

Bisherige Studien zeigen, dass eine geringe RAI2-Expression in Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen mit einer frühzeitigen Metastasierung korreliert. Zudem besteht eine molekulare Interaktion des RAI2-Proteins mit CtBP-Faktoren, welche als transkriptionelle Regulatoren die Zelldifferenzierung von Tumorzellen steuern können. Außerdem weisen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe auf eine Assoziation der RAI2-Expression mit der zellulären Stressantwort hin. Aus diesen Beobachtungen leiten wir die Hypothese ab, dass das RAI2-Protein möglicherweise eine Funktion in der zellulären Stressantwort besitzt und dass der Verlust dieser Funktion einen Einfluss auf das Überleben von Krebszellen haben könnte. Diese potentielle Funktion des RAI2-Proteins in der zellulären Stressantwort soll in dieser Arbeit in Mamma- und Prostatakarzinomzellen untersucht werden.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung werden die Zelllinien KPL-1 (Mammakarzinom) und LNCaP (Prostatakarzinom) mit Pharmaka behandelt, die verschiedene Arten von Zellstress erzeugen. Es werden genotoxischer Zellstress in Form von DNA-Strangbrüchen, Translationsstress und ER-Stress erzeugt, wodurch jeweils spezifische Reparaturmechanismen induziert werden. Anschließend werden mögliche Veränderungen in der RAI2-mRNA-Expression in einer quantitativen PCR-Analyse bestimmt und mit der RAI2-Expression unter Standardzellkulturbedingungen verglichen. Außerdem wird eine Zellproliferationsanalyse durchgeführt, um die Toxizität der Pharmaka zu bewerten. Darüber hinaus soll in Western Blot Analysen untersucht werden, welche Marker der zellulären Stressantwort mit der RAI2-Proteinexpression korrelieren. Ziel ist ein Vergleich der RAI2-Proteinexpression mit der Expression von DNA-Stress- und Zellzyklusmarkern (p21, p53,  $\gamma$ H2AX), Paraspeckle-Markern (NONO, PSPC1) und einem Markerprotein der UPR (pelf2 $\alpha$ ). Die grundlegende Annahme für die Bewertung der Analysen ist, dass eine Induktion der RAI2-Genexpression und RAI2-Proteinexpression eine Funktion in der jeweiligen Stressantwort anzeigt. Ein weiteres Ziel ist die Untersuchung der subzellulären Colokalisation von RAI2 und CtBP1 in pharmazeutisch gestressten Zellen. Zu diesem Zweck erfolgt eine Immunfluoreszenzfärbung. Möglicherweise lässt dies Rückschlüsse auf die Funktion von RAI2 in der zellulären Stressantwort zu.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien stammen von folgenden Herstellern, wenn nicht anders angegeben: Eppendorf AG, Sarstedt, Life Technologies, Gibco, Nunc und VWR.

##### 3.1.2 Zelllinien

Die Zelllinien sind Derivate hormonsensitiver Karzinome. Bei der parentalen Zelllinie LNCaP handelt es sich um Zellen aus einer supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines Androgen-sensitiven Prostatakarzinoms (Horoszewicz et al. 1980). Die parentale Zelllinie KPL-1 ist ein Derivat der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 und wird als ER-positiv/ Progesteron-Rezeptor (PR)-negativ beschrieben (Kurebayashi et al. 1995). Für die Immunfluoreszenz wurden parentale KPL-1 Zellen sowie modifizierte KPL-1 Zellen mit RAI2-Überexpression (KPL-1 RAI2-OE) und KPL-1 Zellen mit RAI2-Überexpression einer CtBP-Bindungsmutation (KPL-1 RAI2-4A) verwendet.

**Tabelle 1: Verwendete Zelllinien**

| Zelllinie     | Zelltyp   | Gewebe  | Herkunft                   |
|---------------|---|---|----------------------------|
| LNCaP         | Prostatakarzinom:<br>Adenokarzinom                                  | Supraklavikuläre<br>Lymphknoten-<br>Metastase | ITB, UKE                   |
| KPL-1         | Mammakarzinom:<br>Adenokarzinom                                     | Pleurapunktat                                 | ITB, UKE                   |
| KPL-1 RAI2-OE | Modifizierte Zelllinie:<br>Mammakarzinom, RAI2-<br>Überexpression   | Pleurapunktat                                 | Stefan Werner,<br>ITB, UKE |
| KPL-1 RAI2-4A | Modifizierte Zelllinie:<br>Mammakarzinom, CtBP-<br>Bindungsmutation | Pleurapunktat                                 | Stefan Werner,<br>ITB, UKE |

ITB = Institut für Tumorbiologie

UKE = Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

### 3.1.3 Pharmaka

Die verwendeten Pharmaka stammen von Sigma-Aldrich.

**Tabelle 2: Verwendete Pharmaka**

| <b>Name</b>  | <b>Klasse</b>              | <b>Mechanismus</b>  |
|--------------|----------------------------|---|
| Camptothecin | Zytostatikum               | Inhibition der Topoisomerase I verhindert Ligation der DNA und führt zu ESB und DSB                           |
| Cycloheximid | Antibiotikum               | Inhibition der Peptidyl-transferase an der ribosomalen 60S-Untereinheit unterbricht die Translation           |
| Etoposid     | Zytostatikum               | Inhibition der Topoisomerase II führt zu DSB  |
| Flavopiridol | Zytostatikum               | CDK-Inhibition führt zu Zellzyklusarrest und Transkriptionseinhibition  |
| Gentamicin   | Aminoglykosid-Antibiotikum | Bindung an 30S-Untereinheit und Inhibition der Translation, Inhibition der Nonsense mediated mRNA Decay (NMD) |
| Olaparib     | PARP-Inhibitor             | PARP-Inhibition, bei BRCA-Mutation Induktion einer synthetischen Letalität                                    |
| Tunicamycin  | Nukleosid-Antibiotikum     | Inhibition der N-Glykosylierung im Endoplasmatischen Retikulum induziert UPR                                  |

### 3.1.4 Oligonukleotide

Die verwendeten synthetischen Oligonukleotide für die Analyse der Genexpression stammen von Eurofins Genomics.

**Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide**

| Oligo-nukleotid | Ziel-<br>struktur | Sequenz (5' – 3')         | Anlagerungs-<br>Temperatur |
|-----------------|-------------------|---------------------------|----------------------------|
| B2M-F           | B2M               | TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT | 59,7 °C                    |
| B2M-R           | B2M               | TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT    | 59 °C                      |
| RAI2-F          | RAI2              | GGCGAAGTCAAGGCTGAAAA      | 62,1 °C                    |
| RAI2-R          | RAI2              | TCCCCTTGGCTGTTGATGTC      | 60 °C                      |

F = Forward

R = Reverse

### 3.1.5 Antikörper

Die für Western Blots und Immunfluoreszenzfärbungen verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

**Tabelle 4: Charakteristika der primären Antikörper**

| Zielantigen | Wirt      | Spezifität | Hersteller        | Cat. #        | Verdünnung |
|-------------|-----------|------------|-------------------|---------------|------------|
| CtBP1       | Maus      | monoklonal | BD<br>Bioscience  | 612042        | 1:500      |
| HSC70       | Maus      | monoklonal | Santa Cruz        | sc-7298       | 1:2000     |
| γH2AX       | Kaninchen | monoklonal | Cell<br>Signaling | 9718          | 1:2000     |
| NONO        | Maus      | monoklonal | BD<br>Bioscience  | 611279        | 1:2000     |
| P53         | Maus      | monoklonal | Agilent<br>Dako   | M7001         | 1:2000     |
| P21         | Kaninchen | monoklonal | Cell<br>Signaling | 2947          | 1:2000     |
| pelf2α      | Kaninchen | monoklonal | Cell<br>Signaling | 3398          | 1:2000     |
| PSPC1       | Maus      | monoklonal | Santa Cruz        | sc-<br>374181 | 1:2000     |

|      |           |            |                |       |                       |
|------|-----------|------------|----------------|-------|-----------------------|
| RAI2 | Kaninchen | monoklonal | Cell Signaling | 97857 | 1:2000 WB<br>1:500 IF |
|------|-----------|------------|----------------|-------|-----------------------|

WB = Western Blot

IF = Immunfluoreszenz

**Tabelle 5: Charakteristika der sekundären Antikörper**

| Name        | Zielantigen    | Wirt  | Spezifität | Hersteller | Cat. #    | Verdünnung |
|-------------|----------------|-------|------------|------------|-----------|------------|
| IRDye 680RD | Anti-Kaninchen | Ziege | polyklonal | Li-Cor     | 925-68071 | 1:7500     |
| IRDye 800CW | Anti-Maus      | Ziege | polyklonal | Li-Cor     | 925-32210 | 1:7500     |

**Tabelle 6: Charakteristika der sekundären AlexaFluor Fluoreszenz Antikörper**

| Name            | Zielantigen    | Wirt  | Spezifität | Hersteller               | Cat. #  | Verdünnung |
|-----------------|----------------|-------|------------|--------------------------|---------|------------|
| Alexa Fluor 546 | Anti-Kaninchen | Ziege | polyklonal | Thermo Fisher Scientific | A-11035 | 1:1000     |
| Alexa Fluor 488 | Anti-Maus      | Ziege | polyklonal | Thermo Fisher Scientific | A-11001 | 1:1000     |

### 3.1.6 Lösungen und Zellkulturmedien

**Tabelle 7: Lösungen und Zellkulturmedien**

| Bezeichnung        | Zusammensetzung   |
|--------------------|---|
| Blockierungslösung | 5 % Milchpulver in TBST   |
| 1x Laemmli Puffer  | 25 mM Trizma Base<br>192 mM Glycin<br>0,1 % (w/v) SDS<br>ad. H <sub>2</sub> O |

|                  |   |
|------------------|---|
| SDS Puffer       | 2 % (w/v) SDS<br>62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8)<br>10 % (v/v) Glycerol<br>ad. H <sub>2</sub> O             |
| TBST (pH 7,6)    | 50 mM Trizma Base<br>150 mM NaCl<br>0,05 % Tween 20<br>Korrektur des pH-Werts auf 7,6 mit HCl         |
| Transfer Puffer  | 48 mM Trizma Base<br>39 mM Glycin<br>0,037 % (v/v) SDS<br>20 % (v/v) Methanol<br>ad. H <sub>2</sub> O |
| Zellkulturmedium | 500 ml DMEM<br>10 % Fetales Kälberserum (FCS)<br>2 mM L-Glutamin<br>1 % Penicillin/Streptomycin       |

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

#### 3.2.1.1 Kultivierung

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt. KPL-1- und LNCaP-Zellen wurden einschichtig bei 37 °C und in einer Atmosphäre von 10 % CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 97 % in Zellkulturflaschen (T25, T75) und 6-Well-Platten kultiviert. Das verwendete Medium DMEM (Pan Biotech) wurde durch 10 % FCS (Gibco von Life Technologies) sowie 2 mM L-Glutamin (Gibco von Life Technologies) ergänzt.

#### 3.2.1.2 Passagieren der Zellkultur

Das Splitten der KPL-1- und LNCaP-Zellen erfolgte in Intervallen von 72 bis 96 Stunden. Um das im Medium enthaltene FCS zu entfernen, wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37 °C mit

0,25 % Trypsin-EDTA (Gibco von Life Technologies) bis zur vollständigen Ablösung der Zellen. Die Trypsinisierung wurde durch Zugabe von DMEM beendet bevor die Zellsuspension mittels Zentrifugation pelletiert und resuspendiert wurde. Anschließend wurden die Zellen erneut in Zellkulturflaschen ausgesät.

### **3.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in Intervallen von 72 bis 96 Stunden mithilfe einer Neubauer-Zählkammer. Die Berechnung der Zellkonzentration in der Zellsuspension erfolgte auf Grundlage der Formel:

$$\text{Zellkonzentration [Zellen/ml]} = \text{Mittelwert} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

### **3.2.1.4 Behandlung mit Pharmaka**

Für die RAI2-RNA-Expressionsanalyse wurden KPL-1- und LNCaP-Zellen in 6-Well-Platten in je 2 ml DMEM mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Inkubation diente der Gewährleistung einer ausreichenden Adhärenz der Zellen. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen (10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM) eines spezifischen Inhibitors. Es folgte eine erneute Inkubation für 72 Stunden. Bei den für die Behandlung verwendeten Pharmaka handelt es sich um Inhibitoren, die verschiedene Arten von Zellstress erzeugen. Für die Behandlung wurden in separaten Zellkulturen Etoposid, Camptothecin, Tunicamycin, Gentamicin, Flavopiridol, Cycloheximid und Olaparib verwendet (Tabelle 8).

Für die Protein-Expressionsanalyse (Western Blot) wurden KPL-1- und LNCaP-Zellen in 15 ml DMEM in T75 Zellkulturflaschen mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine 72-stündige Behandlung mit einer der jeweiligen IC50 (Anhang A1) angepassten Konzentration der verwendeten Inhibitoren.

**Tabelle 8: Konzentrationen der Pharmaka**

|              | <b>Konzentration<br/>qPCR</b> | <b>Konzentration<br/>Western Blots</b> | <b>Konzentration<br/>Immun-<br/>fluoreszenz</b> |
|--------------|-------------------------------|--|---|
| Camptothecin | 10 nM, 100 nM,<br>1 µM, 10 µM | KPL-1: 100 nM<br>LNCaP: 10 nM          |   |
| Cycloheximid | 10 nM, 100 nM,<br>1 µM, 10 µM | KPL-1: 4 µM<br>LNCaP: 4 µM             |   |
| Etoposid     | 10 nM, 100 nM,<br>1 µM, 10 µM | KPL-1: 10 µM<br>LNCaP: 1 µM            | 10 µM   |
| Flavopiridol | 10 nM, 100 nM,<br>1 µM, 10 µM | KPL-1: 100 nM<br>LNCaP: 100 nM         |   |
| Gentamicin   | 10 µM, 100 µM,<br>1 mM, 10 mM | KPL-1: 5 mM<br>LNCaP: 5 mM             |   |
| Olaparib     | 10 nM, 100 nM,<br>1 µM, 10 µM | KPL-1: 14 µM<br>LNCaP: 14 µM           | 5 µM  |
| Tunicamycin  | 10 nM, 100 nM,<br>1 µM, 10 µM | KPL-1: 1 µM<br>LNCaP: 50 nM            |   |

Für die Immunfluoreszenz wurden parentale KPL-1-Zellen, KPL-1-Zellen mit RAI2-Überexpression (KPL-1 RAI2-OE) sowie KPL-1-Zellen mit Überexpression einer RAI2-Variante, die nicht in der Lage ist CtBP-Faktoren zu binden (KPL-1 RAI2-4A), in Kammerobjektträgern ausgesät und mit 10 µM Etoposid oder 5 µM Olaparib oder einer Kombination aus 10 µM Etoposid und 5 µM Olaparib behandelt. Je Zelllinie diente eine unbehandelte Kontrolle als Referenz.

**Tabelle 9: Behandlungsschema der Kammerobjektträger**

|                  |             |                     |                    |  |
|------------------|-------------|---------------------|--------------------|--|
| KPL-1            | unbehandelt | 10 $\mu$ M Etoposid | 5 $\mu$ M Olaparib | 10 $\mu$ M Etoposid<br>&<br>5 $\mu$ M Olaparib |
| KPL-1<br>RAI2-OE | unbehandelt | 10 $\mu$ M Etoposid | 5 $\mu$ M Olaparib | 10 $\mu$ M Etoposid<br>&<br>5 $\mu$ M Olaparib |
| KPL-1<br>RAI2-4A | unbehandelt | 10 $\mu$ M Etoposid | 5 $\mu$ M Olaparib | 10 $\mu$ M Etoposid<br>&<br>5 $\mu$ M Olaparib |

### 3.2.1.5 MTT-Assay

Um die Zellproliferation sowie indirekt die Toxizität der verwendeten Pharmaka zu analysieren, wurden KPL-1- und LNCaP-Zellen mit einer Zelldichte von 3000 Zellen/Well in 96-Well-Platten ausgesät und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit je einem spezifischen Inhibitor in einer Verdünnungsreihe von 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 100 nM und 10 nM. Jede Konzentration wurde vierfach auf der Platte aufgetragen. Nach 72 Stunden erfolgte je Well die Zugabe von 20  $\mu$ l 5mg/ml MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid) in PBS sowie eine dreistündige Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Anschließend wurde das Medium abpipettiert und 100  $\mu$ l DMSO hinzugegeben, gefolgt von 15 min Schütteln bei Raumtemperatur. Für die Quantifizierung des reduzierten MTTs wurde die Absorption bei 540 nm mit einem Referenzfilter bei 650 nm gemessen. Verwendet wurde das 200Pro Spectrophotometer sowie die Tecan i-control Software (Tecan). Es wurden drei biologische und drei technische Replikate verwendet.

Die Ergebnisse der MTT-Assays wurden zur Berechnung der IC<sub>50</sub> der verwendeten Inhibitoren herangezogen und die jeweils ermittelte IC<sub>50</sub> dann näherungsweise für die Zellkulturen, die den Western Blots zugrunde liegen, eingesetzt. Zur Berechnung der IC<sub>50</sub> wurde die mittlere relative Absorption gegenüber der jeweils eingesetzten Konzentration aufgetragen und eine Regressionsanalyse durchgeführt. Die Funktionsgleichungen der

Regressionsanalysen sind im Anhang dargestellt (Abbildung A1). Der Korrelationskoeffizient  $R^2$  wurde als Gütemaß für die Korrelation bestimmt.

### **3.2.2 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.2.2.1 RNA-Isolation**

Für die Isolation von Gesamt-RNA wurde das innuPREP RNA Mini Kit (Analytik Jena) entsprechend des Hersteller-Protokolls für die RNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen verwendet. Zusätzlich wurde ein DNA-Verdau mit dem innuPREP DNase I Digest Kit (Analytik Jena AG) durchgeführt, um den Anteil der genomischen DNA zu reduzieren und den der isolierten RNA zu erhöhen. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mithilfe des NanoDrop ND-1000 Spectrophotometers (Thermo Fisher Scientific). Als Qualitätsparameter für die RNA-Präparationen wurde der A260/A280-Quotient bestimmt.

#### **3.2.2.2 cDNA Synthese**

Als Template für die Reverse Transkription wurden 50 ng RNA verwendet. Die cDNA Synthese erfolgte nach dem Protokoll des First Strand cDNA Synthesis Kits (Thermo Fisher Scientific). Als Primer wurden Random Hexamer Primer eingesetzt. Nach abgeschlossener cDNA-Synthese wurde die cDNA 1:10 in Nuklease-freiem Wasser verdünnt.

#### **3.2.2.3 Etablierung der Primer**

Die Auswahl der Primer-Sequenzen erfolgte nach der Sequenzspezifität für RAI2 sowie nach der Erfassung aller Isoformen von RAI2. Die Effizienzbestimmung erfolgte mittels qPCR für zwei RAI2-Primerpaare bei 54,6 °C, 57 °C, 59 °C, 60,1 °C und 60,7 °C. Für die Auswahl eines effizienten Primers wurden Verdünnungsreihen eines cDNA-Templates von 1000 ng angefertigt. Abbildung A2 im Anhang zeigt die Standardkurven der Primerpaare RAI2(1) und RAI2(2) im Vergleich sowie deren Effizienz. Mithilfe einer Gelelektrophorese wurden die Produkte der qPCR hinsichtlich Primer-Dimeren und sekundären Produkten analysiert. Aufgrund von Primer-Dimeren bei der Verwendung von Primer RAI2(1) wurde für die Durchführung der Experimente der RAI2(2) Primer verwendet.

### 3.2.2.4 Quantitative Echtzeit-PCR

Als Template für die quantitative Echtzeit-PCR wurden je Reaktion 3 µl cDNA verwendet. Je Reaktion wurden 0,2 µl Forward-Primer, 0,2 µl Reverse-Primer, 5 µl SYBR Green (Luna qPCR Mix) sowie 1,6 µl Nuklease-freies Wasser eingesetzt. Es wurden biologische Triplikate verwendet. Jede Probe wurde als Triplikat (technisches Triplikat) gemessen und jeweils auf die Expression des Haushaltgens  $\beta_2$ -Mikroglobulin (B2M) normalisiert. Tabelle 10 stellt das verwendete qPCR-Programm des BioRad C1000 Touch Thermal Cycler dar, bestehend aus 40 Zyklen und einer Schmelzkurvenanalyse. Die Auswertung erfolgte mithilfe des BioRad CFX Manager Programms.

**Tabelle 10: Verwendetes qPCR-Programm**

| Temperatur [°C] | Zeit [s] |              |
|-----------------|----------|--------------|
| 95              | 600      |              |
| 95              | 15       |              |
| 60              | 30       |              |
| 72              | 30       |              |
| 65 - 95         | 1200     | Schmelzkurve |

### 3.2.2.5 Relative mRNA-Quantifizierung

Die relative Quantifizierung gibt Aufschluss über die Genexpression des Zielgens in Relation zur Expression eines Haushaltgens mit stabiler Expression. Dies ermöglicht einen Vergleich der mRNA-Expression verschiedener Proben. Die relative mRNA-Expression wurde mithilfe der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode bestimmt. Im ersten Schritt wurde die Differenz des Zyklus-Schwellenwertes (Cycle Threshold, CT) des Zielgens und des Referenzgens gebildet. Für einen Vergleich der behandelten und unbehandelten Proben wurde der  $\Delta\Delta CT$ -Wert herangezogen und anschließend die relative Änderung (Fold Change) des Gens der jeweiligen behandelten Probe in Relation zur mRNA-Expression der unbehandelten Probe bestimmt.

$\Delta CT = CT \text{ Zielgen} - CT \text{ Referenzgen}$

$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ der behandelten Probe} - \Delta CT \text{ der unbehandelten Probe}$

Fold Change =  $2^{(-\Delta\Delta CT)}$

### **3.2.3 Biochemische Methoden**

#### **3.2.3.1 Vorbereitung der Proben**

Als Proben wurden die mit der jeweilig empirisch bestimmten IC50-Dosis der Inhibitoren behandelten Zellkulturen KPL-1 und LNCaP verwendet. Nach dem Waschen mit PBS und der Zugabe von 1 ml PBS erfolgte die Mobilisation der Zellen mithilfe eines Zellschabers sowie die Zentrifugation bei 750 rcf bei 4°C für 3 min. Das Pellet wurde anschließend in 200 µl 1x SDS-Puffer (2 % SDS, 62,5 mM Tris/HCL pH 6,8, 10 % Glycerol, PhosSTOP-Phosphatase-Inhibitor, Complete Mini Proteinase-Inhibitor) je T25-Zellkulturflasche lysiert. Mithilfe des Bioruptors (Diagenode UCD 2000) erfolgte zur Degradierung der chromosomalen DNA die Sonifikation der Probe. Anschließend wurden die Proben auf dem Vortex gemischt und bei -20 °C gelagert.

#### **3.2.3.2 BCA Assay**

Für die Analyse der Proteinkonzentrationen wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Die erstellte Standardreihe basierte auf Proben mit definierten Konzentrationen von bovinem Serum-Albumin (0 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml und 6 mg/ml), anhand derer die Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den Proben erfolgte.

#### **3.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Zu den Proteinproben wurde jeweils 1 µl Bromophenol-Blau Lösung hinzugegeben bevor die Denaturierung der Proben bei 95 °C für 5 min erfolgte. Für die Auftrennung der Proteine wurde das Mighty Small II Mini Vertical Elektrophorese System (Amersham Biosciences) verwendet.

Die Zusammensetzung des Tris/Glycin SDS-Polyacrylamid Gels richtete sich nach der Größe des untersuchten Proteins. Für Proteine mit einer Größe über 50 kDa wurde ein 8%iges Gel verwendet, für Proteine mit einer Größe zwischen 15 und 50 kDa ein 15%iges. Für die Elektrophorese wurde 1x Laemmli-Puffer (2,5 mM Tris, 19,2 mM Glycin, 0,01 % SDS) verwendet sowie je Gel 25 mA bei Raumtemperatur. Als Marker wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) aufgetragen. Die folgenden Tabellen zeigen die Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamid-Gele.

**Tabelle 11: Zusammensetzung der Trenngele**

| <b>Acrylamid Anteil</b> | <b>8 %</b> | <b>15 %</b> |
|-------------------------|------------|-------------|
| H <sub>2</sub> O        | 2,1 ml     | 1,4 ml      |
| 40 % Acrylamid          | 0,8 ml     | 1,5 ml      |
| 1,5 M Tris (pH 8,8)     | 1,0 ml     | 1,0 ml      |
| 10 % SDS                | 0,04 ml    | 0,04 ml     |
| 10 % APS                | 0,04 ml    | 0,04 ml     |
| TEMED                   | 0,004 ml   | 0,004 ml    |

**Tabelle 12: Zusammensetzung der Sammelgele bei 2 ml Volumen**

| <b>Sammelgel</b>    | <b>2 ml</b> |
|---------------------|-------------|
| H <sub>2</sub> O    | 1,4 ml      |
| 40 % Acrylamid      | 0,3 ml      |
| 1,0 M Tris (pH 6,8) | 0,3 ml      |
| 10 % SDS            | 0,02 ml     |
| 10 % APS            | 0,02 ml     |
| TEMED               | 0,002 ml    |

### 3.2.3.4 Western Blot

Für den Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (Protran BA 85, GE Healthcare, Porengröße 0,45 µm) wurden das Trans-Blot SD halbtrockene Elektrophorese-Transfer-System (Bio-Rad Laboratories) sowie 1x Transfer Puffer (48 mM Trizma Base, 39 mM Glycin,

0,037 % SDS, 20 % Methanol) bei 40 mA und bei Raumtemperatur für 2 Stunden verwendet. Im Anschluss wurde die Membran 5 min in TBST (50 mM Trizma Base, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,6) gewaschen und danach mit 5 % Milchpulver in TBST für 30 min bei Raumtemperatur blockiert und dreimal je 5 min mit TBST gewaschen. Die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht. Die primären Antikörper wurden entweder in 5 % BSA (Biowest) oder in 5 % Milch in TBST verdünnt. Vor der Zugabe des sekundären Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpers wurde die Membran dreimal für jeweils 5 min in 1x TBST gewaschen. Die sekundären Antikörper wurden in 5 % BSA (Biowest) im Verhältnis 1:7500 verdünnt. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper fand bei Raumtemperatur für eine Stunde statt. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal für jeweils 5 min in 1x TBST gewaschen. Für die Detektion wurde der Odyssey CLx verwendet und für die Auswertung das Programm Image Studio Lite Version 5.2.

### **3.2.3.5 Immunfluoreszenz**

Parentale KPL-1-Zellen, KPL-1-Zellen mit RAI2-Überexpression und KPL-1-Zellen mit RAI2-Überexpression und CtBP-Bindungsmutation wurden auf Kammerobjektträgern (Thermo Fisher Scientific) ausgesät und für 24 Stunden inkubiert, um eine ausreichende Adhärenz der Zellen zu erreichen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Fixierung der Zellen mit 4 % (w/v) PFA für 15 min, anschließend weiteres zweimaliges Waschen mit PBS. Für die Permeabilisierung wurde 0,02 % Triton X100 in PBS für 10 min bei Raumtemperatur verwendet. Anschließend erfolgte das dreimalige Waschen mit PBS sowie die Blockierung mit 1 % BSA/PBS für 30 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss erfolgte die Zugabe der primären Antikörper in einer Verdünnung von jeweils 1:500 sowie die Inkubation für 90 min bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Zugabe der sekundären Antikörper (Verdünnung 1:1000) sowie die Inkubation für 90 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Färbung mit DAPI für 5 min sowie anschließend weiteres dreimaliges Waschen mit PBS und die vorsichtige Entfernung der Kammern. Auf jedes Feld des Objektträgers wurden 25 µl Mowiol aufgetragen und die Proben mit einem Deckglas eingedeckt. Die Versiegelung erfolgte mit Nagellack. Die Aufnahme der Immunfluoreszenzbilder

erfolgte mithilfe des AxioPlan2 Fluoreszenzmikroskops bei 40x Vergrößerung sowie der AxioCam MRm Kamera, die Bildverarbeitung mit AxioVision.

### **3.2.4 Statistische Methoden**

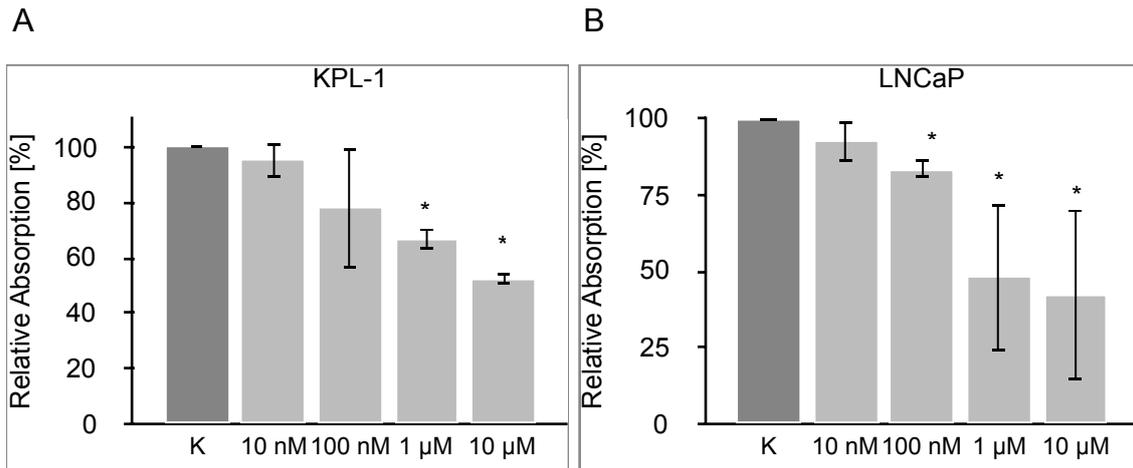
Die statistische Auswertung der quantitativen Echtzeit-PCR sowie der MTT-Assays und der Western Blots erfolgte mittels Students T-Test. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse mit  $p < 0,05$  bezeichnet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Proliferation von KPL-1- und LNCaP-Zellen nach Behandlung mit Zellstress-induzierenden Pharmaka

Um die Zellproliferation als indirektes Maß für die Toxizität der verwendeten Inhibitoren zu erfassen, wurden MTT-Assays durchgeführt. Dazu wurden KPL-1- und LNCaP-Zellen mit den genannten Inhibitoren in den Konzentrationen 10 nM, 100 nM, 1 µM und 10 µM behandelt, bzw. 10 µM, 100 µM, 1 mM und 10 mM bei Gentamicin. Als Maß für die Zellproliferation wurde die relative Absorption bestimmt und jeweils ins Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle gesetzt. Eine signifikante Reduktion der Absorption wurde statistisch als  $p < 0,05$  im Students t-Test definiert. Aus den Messwerten ließen sich über Regressionsanalysen Funktionsgleichungen bestimmen, mithilfe derer wiederum die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) berechnet wurde. Diese wurde als Grundlage für die Behandlung der Zellkulturen für die Proteinexpressionsanalyse verwendet.

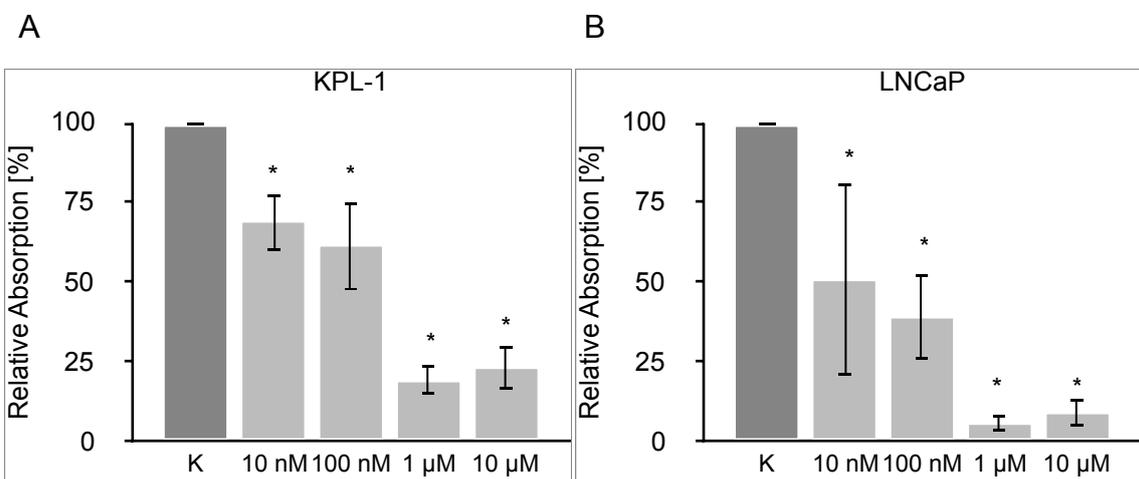
Die Proliferationsanalyse zeigte bei Behandlung von KPL-1-Zellen mit Etoposid eine annähernd proportionale Abnahme der Absorption bei steigender Konzentration von Etoposid. Eine signifikante Reduktion der Absorption im Verhältnis zur unbehandelten Probe ( $p < 0,05$ ) zeigte sich bei 1 µM und 10 µM. Anhand einer linearen Funktion ließ sich die IC<sub>50</sub> mit 14 µM berechnen. Bei der Behandlung von LNCaP-Zellen zeigte sich ebenfalls ein antiproportionaler Zusammenhang zwischen der Inhibitor-Konzentration und der relativen Absorption. Ab 100 nM zeigte sich eine signifikante Reduktion der relativen Absorption. Die lineare Funktion ergab eine berechnete IC<sub>50</sub> von 1 µM. Etoposid wirkt demnach in beiden Zelllinien konzentrationsabhängig proliferationshemmend.



**Abbildung 6: Proliferation von KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden Behandlung mit Etoposid.**

Die relative Absorption wurde mittels MTT-Assay in jeweils drei technischen und drei biologisch unabhängigen Replikaten bestimmt und bezieht sich auf die unbehandelte Kontrolle (K). Bestimmung des p-Wertes mit Students t-Test (\*  $p < 0,05$ ). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

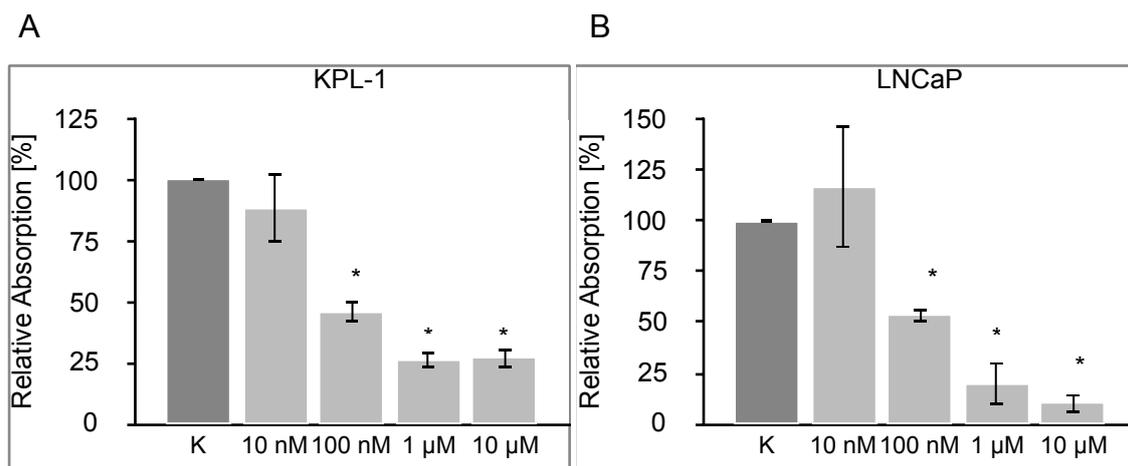
Die Behandlung von KPL-1-Zellen mit Camptothecin zeigte bereits ab 10 nM eine signifikante Abnahme der Absorption. Die relative Absorption nahm mit steigender Konzentration weiter ab. Die IC50 ließ sich mithilfe einer logarithmischen Funktion näherungsweise mit 130 nM bestimmen. Eine vergleichbare Toxizität ließ sich in LNCaP-Zellen beobachten. Eine signifikante Reduktion der relativen Absorption zeigte sich bereits ab 10 nM, die IC50 ließ sich nach einer logarithmischen Funktion mit  $< 10$  nM bestimmen. Camptothecin zeigt in Anbetracht der geringeren IC50 bei ähnlichem Wirkmechanismus wie Etoposid sowohl auf KPL-1- als auch auf LNCaP-Zellen eine vergleichsweise stärkere toxische Wirkung.



**Abbildung 7: Proliferation von KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden Behandlung mit Camptothecin.**

Die relative Absorption wurde mittels MTT-Assay in jeweils drei technischen und drei biologisch unabhängigen Replikaten bestimmt und bezieht sich auf die unbehandelte Kontrolle (K). Bestimmung des p-Wertes mit Students t-Test (\*  $p < 0,05$ ). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Für KPL-1-Zellen zeigte sich unter Behandlung mit 100 nM Flavopiridol und höheren Konzentrationen eine signifikante Reduktion der relativen Absorption. Die IC50 wurde mit 200 nM bestimmt. In LNCaP-Zellen zeigte sich demgegenüber paradoxerweise zunächst eine insignifikante Zunahme der relativen Absorption bei 10 nM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Behandlung mit 100 nM, 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M zeigte jeweils eine signifikante Abnahme der relativen Absorption. Die IC50 wurde hier logarithmisch mit 80 nM bestimmt.

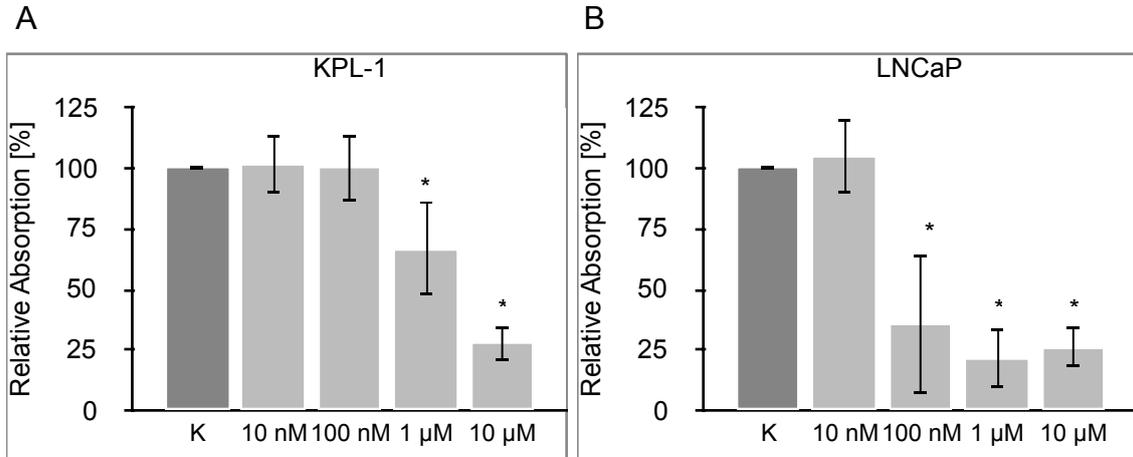


**Abbildung 8: Proliferation von KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden Behandlung mit Flavopiridol.**

Die relative Absorption wurde mittels MTT-Assay in jeweils drei technischen und drei biologisch unabhängigen Replikaten bestimmt und bezieht sich auf die unbehandelte Kontrolle (K). Bestimmung des p-Wertes mit Students t-Test (\*  $p < 0,05$ ). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Die Behandlung von KPL-1-Zellen mit Tunicamycin zeigte bei 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M eine signifikante Abnahme der Absorption. Die mithilfe einer linearen Funktion bestimmte IC50 betrug ungefähr 3  $\mu$ M. Demgegenüber zeigte sich bei der Behandlung von LNCaP-Zellen mit Tunicamycin bereits bei 100 nM eine signifikante Abnahme der relativen Absorption und somit der Zellzahl. Die mit einer logarithmischen Funktion berechnete IC50 betrug 50 nM. Daraus kann auf

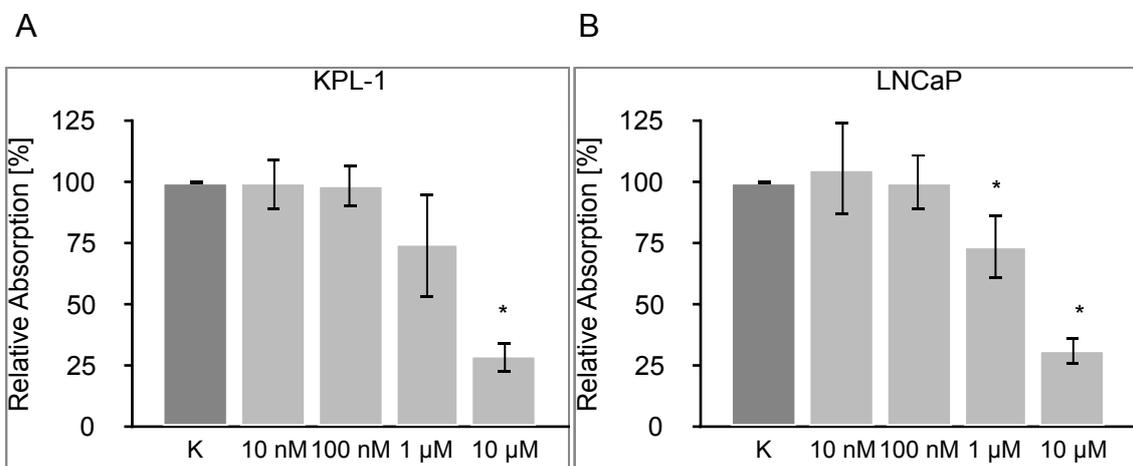
eine höhere Sensitivität von LNCaP-Zellen auf Tunicamycin als in KPL-1-Zellen geschlossen werden.



**Abbildung 9: Proliferation von KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden Behandlung mit Tunicamycin.**

Die relative Absorption wurde mittels MTT-Assay in jeweils drei technischen und drei biologisch unabhängigen Replikaten bestimmt und bezieht sich auf die unbehandelte Kontrolle (K). Bestimmung des p-Wertes mit Students t-Test (\* p < 0,05). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

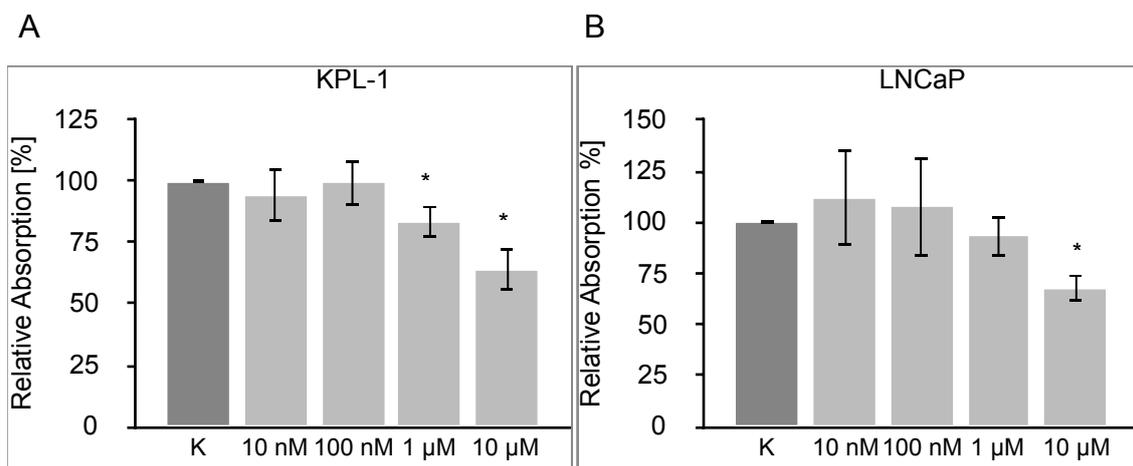
Die Behandlung von KPL-1-Zellen mit Cycloheximid zeigte erst bei einer vergleichsweise hohen Konzentration von 10 µM eine signifikante Reduktion der relativen Absorption. Die IC50 konnte logarithmisch mit ungefähr 4 µM berechnet werden. In LNCaP-Zellen ließ sich ein ähnlicher Effekt beobachten, da auch hier erst höhere Konzentrationen ab 1 µM eine signifikante Abnahme der relativen Absorption und somit der Zellzahl herbeiführten. Die IC50 betrug ebenfalls 4 µM. Es ist somit von einer ähnlichen Toxizität von Cycloheximid in KPL-1- und LNCaP-Zellen auszugehen.



**Abbildung 10: Proliferation von KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden Behandlung mit Cycloheximid.**

Die relative Absorption wurde mittels MTT-Assay in jeweils drei technischen und drei biologisch unabhängigen Replikaten bestimmt und bezieht sich auf die unbehandelte Kontrolle (K). Bestimmung des p-Wertes mit Students t-Test (\*  $p < 0,05$ ). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

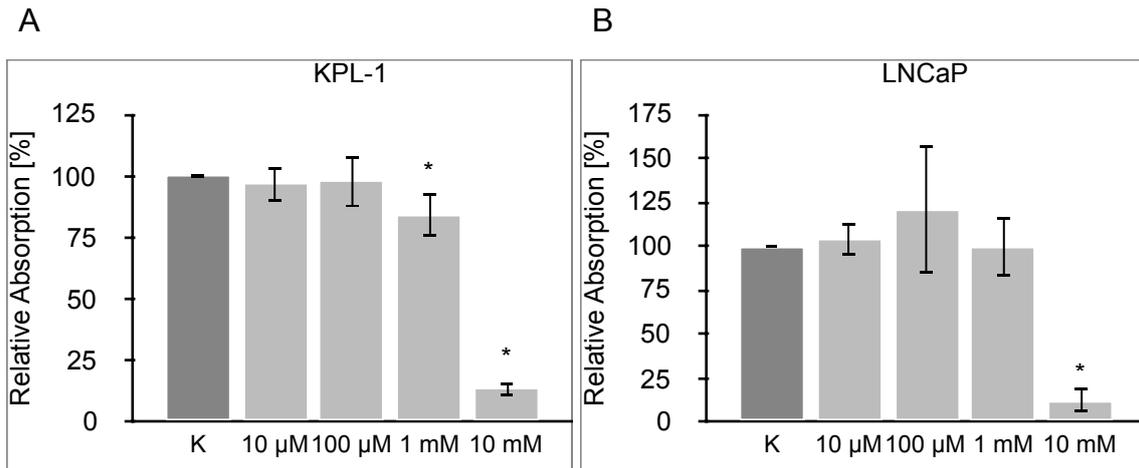
Bei der Behandlung von KPL-1-Zellen mit Olaparib zeigte sich bei 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  eine signifikante Reduktion der relativen Absorption. Die  $\text{IC}_{50}$  konnte mit ungefähr 14  $\mu\text{M}$  bestimmt werden. Für LNCaP-Zellen ergab die Analyse eine signifikante Abnahme der Zellzahl unter Olaparib-Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$ . Die  $\text{IC}_{50}$  konnte näherungsweise mit 14  $\mu\text{M}$  bestimmt werden. Der Vergleich mit anderen Inhibitoren legt nahe, dass der PARP-Inhibitor Olaparib eine geringere Toxizität gegenüber KPL-1- und LNCaP-Zellen besitzt.



**Abbildung 11: Proliferation von KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden Behandlung mit Olaparib.**

Die relative Absorption wurde mittels MTT-Assay in jeweils drei technischen und drei biologisch unabhängigen Replikaten bestimmt und bezieht sich auf die unbehandelte Kontrolle (K). Bestimmung des p-Wertes mit Students t-Test (\*  $p < 0,05$ ). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Gentamicin zeigte in KPL-1-Zellen eine signifikante Reduktion der relativen Absorption bei Behandlung mit 1 mM und 10 mM. Der Zusammenhang stellte sich antiproportional dar. Die berechnete  $\text{IC}_{50}$  betrug 6 mM. In LNCaP-Zellen zeigte sich eine signifikante Abnahme der relativen Absorption und somit der Zellzahl bei 10 mM. Die  $\text{IC}_{50}$  betrug auch in dieser Zelllinie 6 mM. Gentamicin zeigte somit insgesamt den geringsten toxischen Effekt auf KPL-1- und LNCaP-Zellen.



**Abbildung 12: Proliferation von KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden Behandlung mit Gentamicin.**

Die relative Absorption wurde mittels MTT-Assay in jeweils drei technischen und drei biologisch unabhängigen Replikaten bestimmt und bezieht sich auf die unbehandelte Kontrolle (K). Bestimmung des p-Wertes mit Students t-Test (\*  $p < 0,05$ ). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

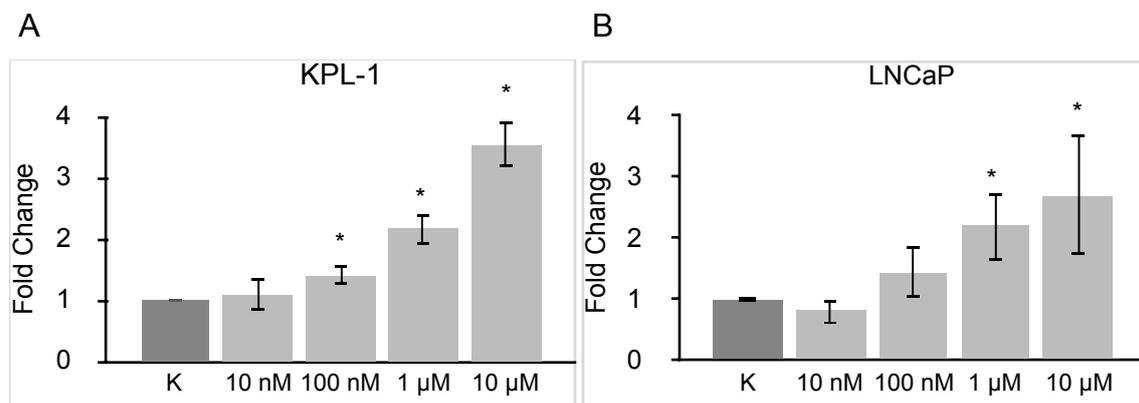
Die Ergebnisse zeigen, dass alle Pharmaka dosisabhängig zu einer Reduktion der relativen Absorption als Maß für die Zellzahl führen. Dabei zeigen sich Unterschiede hinsichtlich der Toxizität, welche durch die  $IC_{50}$  erfasst wird. Die Unterschiede lassen sich einerseits durch die verschiedenen Wirkmechanismen der Inhibitoren erklären sowie andererseits durch eine unterschiedliche Resilienz bzw. Sensitivität der Zelllinien. Die MTT-Assays dienen als Vorarbeit für die Proteinexpressionsanalysen, welche eine ausreichende Substratmenge (Zellzahl) erfordern. Für die Analyse der Proteinexpression von RAI2 wurden die Zellkulturen mit annähernd der jeweiligen  $IC_{50}$  des Inhibitors behandelt, um eine ausreichende Zellzahl und somit eine suffiziente Substratmenge zu gewährleisten.

#### **4.2 Expression des *RAI2*-Gens in KPL-1- und LNCaP-Zellen nach Behandlung mit Zellstress-induzierenden Pharmaka**

Für die Untersuchung der Expression des *RAI2*-Gens bei Zellstress wurden die parentalen Zelllinien KPL-1 und LNCaP mit Zellstress-induzierenden Pharmaka behandelt. Mithilfe der unterschiedlichen Wirkmechanismen der Pharmaka wurden so gezielt unterschiedliche Arten von Zellstress erzeugt, die verschiedene Signalwege induzieren. Eine erhöhte Expression von RAI2-

Transkripten unter der Behandlung mit einem spezifischen Inhibitor lässt somit möglicherweise Rückschlüsse auf die Funktion von RAI2 im Rahmen der zellulären Stressantwort zu.

Bei Etoposid handelt es sich um ein Zytostatikum, das im Rahmen des PEB-Schemas (Cisplatin, Etoposid, Bleomycin) in der Hodentumorthherapie sowie in der Therapie des Bronchialkarzinoms, des Ovarialkarzinoms und bei Lymphomen eingesetzt wird (Leitlinienprogramm Onkologie 2018a, Leitlinienprogramm Onkologie 2018b, Leitlinienprogramm Onkologie 2019, Leitlinienprogramm Onkologie 2020b, Maucher 2020). Durch die Inhibition der Topoisomerase II kommt es zu DNA-Doppelstrangbrüchen und somit zu einem Verlust der DNA-Replikation (Montecucco et al. 2015). In KPL-1-Zellen zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine signifikante Zunahme der relativen RAI2-Expression bei 100 nM, 1 µM und 10 µM, jedoch nicht bei einer Konzentration von 10 nM. Bei LNCaP-Zellen zeigte sich eine signifikante Zunahme der RAI2-Expression bei 1 µM und 10 µM, jedoch nicht bei 10 nM und 100 nM. Bei der Behandlung von KPL-1- und LNCaP-Zellen mit Etoposid zeigte sich somit eine konzentrationsabhängige, signifikante Zunahme der relativen RAI2-Genexpression.

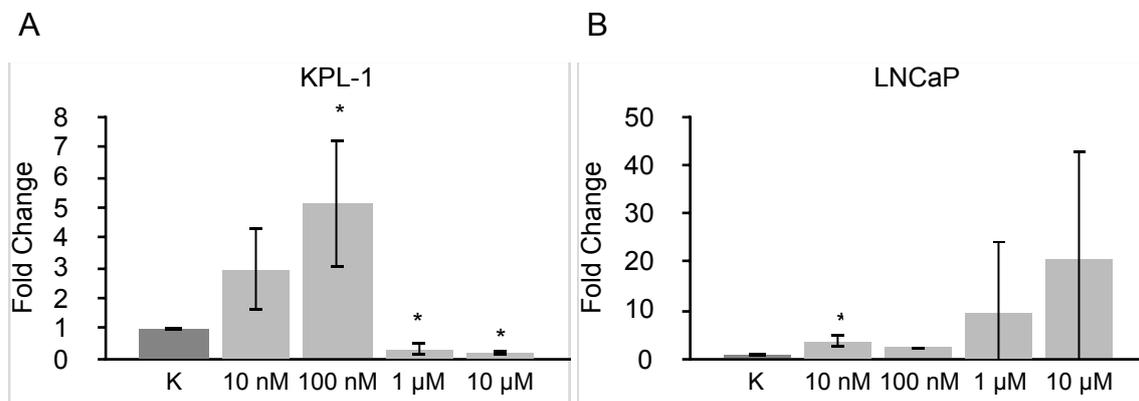


**Abbildung 13: RAI2 Induktion in KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden Behandlung mit Etoposid.**

Relative Expressionsunterschiede (Fold Change) wurden mittels qPCR in jeweils drei technischen sowie drei biologisch unabhängigen Replikaten bestimmt (n=3) und jeweils auf das Haushaltsgen B2M sowie eine unbehandelte Kontrolle (K) normalisiert. Bestimmung des p-Wertes mit Students t-Test (\* p < 0,05). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Bei Camptothecin handelt es sich ebenfalls um ein Zytostatikum, das in die DNA-Replikation eingreift, indem es die Topoisomerase I inhibiert und dadurch

zu Einzelstrang- sowie konsekutiv zu Doppelstrangbrüchen führt (PubChem 2020c). Klinisch findet Camptothecin heutzutage keine Anwendung. Ein klinisch eingesetzter Vertreter der Topoisomerase I Inhibitoren ist Irinotecan, welches in der Therapie des kolorektalen Karzinoms verwendet wird (Leitlinienprogramm Onkologie 2019b). Bei der Behandlung von KPL-1- und LNCaP-Zellen mit Camptothecin zeigte sich in KPL-1-Zellen eine konzentrationsabhängige Induktion von *RAI2* bis zu einer Konzentration von 100 nM. Bei höheren Konzentrationen war keine Induktion, sondern eine signifikante Reduktion der Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu beobachten. In LNCaP-Zellen zeigte sich bei 10 nM eine signifikant erhöhte *RAI2*-Genexpression. Die Behandlung mit höheren Konzentrationen zeigte keine signifikante Steigerung der Induktion.

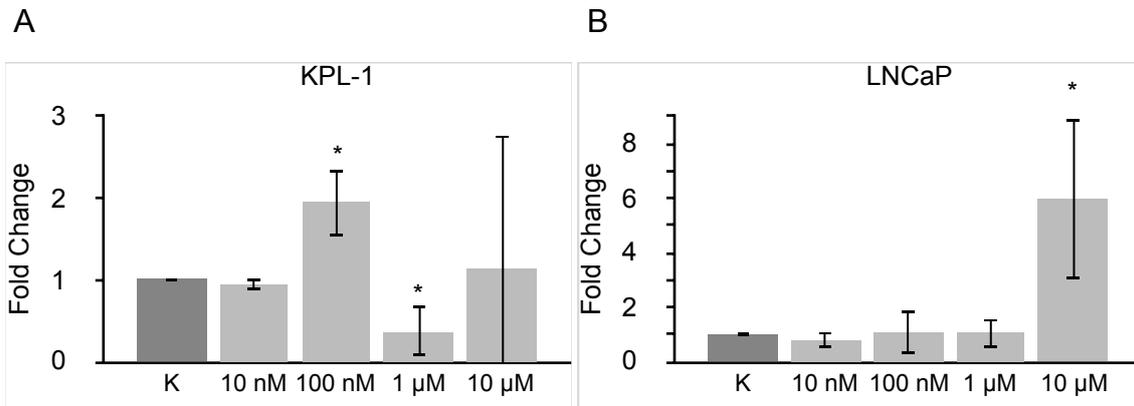


**Abbildung 14: *RAI2* Induktion in KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden Behandlung mit Camptothecin.**

Relative Expressionsunterschiede (Fold Change) wurden mittels qPCR in jeweils drei technischen sowie drei biologisch unabhängigen Replikaten bestimmt ( $n=3$ ) und jeweils auf das Haushaltsgen *B2M* sowie eine unbehandelte Kontrolle (K) normalisiert. Bestimmung des p-Wertes mit Students t-Test (\*  $p < 0,05$ ). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Bei Flavopiridol handelt es sich um einen CDK-Inhibitor, der einen Zellzyklusarrest bewirkt (Sedlacek 2001). Unter der Behandlung von KPL-1- und LNCaP-Zellen mit Flavopiridol zeigte sich in KPL-1-Zellen lediglich bei einer Konzentration von 100 nM eine signifikante Zunahme der *RAI2*-Genexpression. Eine Behandlung mit der nächst höheren Konzentrationsstufe von 1 µM Flavopiridol zeigte demgegenüber eine signifikante Reduktion der Fold Change. In LNCaP-Zellen zeigte sich bei einer Konzentration von 10 µM eine signifikante

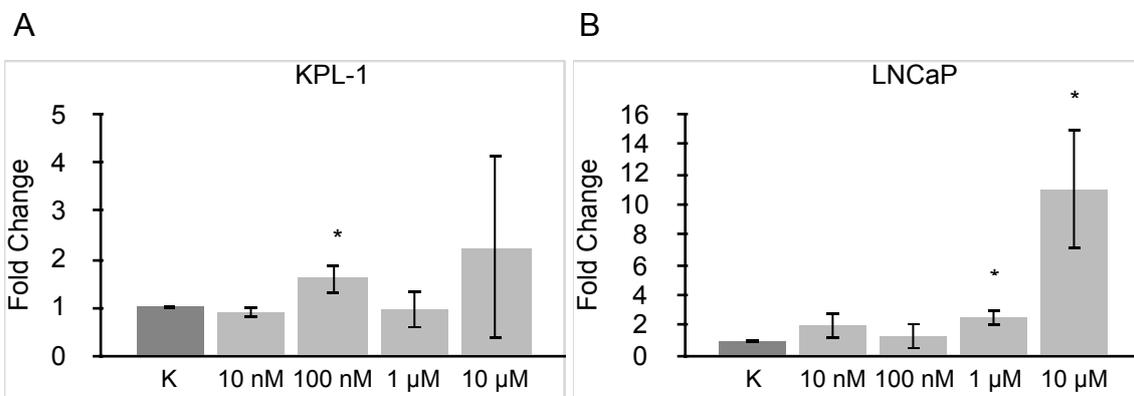
RAI2-Induktion. Bei geringeren Konzentrationen konnte kein signifikanter Anstieg der relativen RAI2-Induktion gemessen werden.



**Abbildung 15: RAI2 Induktion in KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden Behandlung mit Flavopiridol.**

Relative Expressionsunterschiede (Fold Change) wurden mittels qPCR in jeweils drei technischen sowie drei biologisch unabhängigen Replikaten bestimmt (n=3) und jeweils auf das Haushaltsgen B2M sowie eine unbehandelte Kontrolle (K) normalisiert. Bestimmung des p-Wertes mit Students t-Test (\* p < 0,05). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Tunicamycin gehört zu den Nukleosid-Antibiotika. Es handelt sich um ein Struktur analogon von UDP-N-Acetylglucosamin, welches als nicht-kompetitiver Inhibitor der GlcNAc-1-Phosphat-Transferase wirkt (PubChem 2020d). Diese Inhibition führt zu einem Verlust der Glykosylierung von Proteinen und dadurch zur Initiierung der Unfolded Protein Response im Endoplasmatischen Retikulum (Wang et al. 2015). Bei der Behandlung von KPL-1- und LNCaP-Zellen mit Tunicamycin zeigte sich bei KPL-1-Zellen eine signifikante RAI2-Induktion bei einer Behandlung mit 100 nM, bei LNCaP für 1 µM und 10 µM.

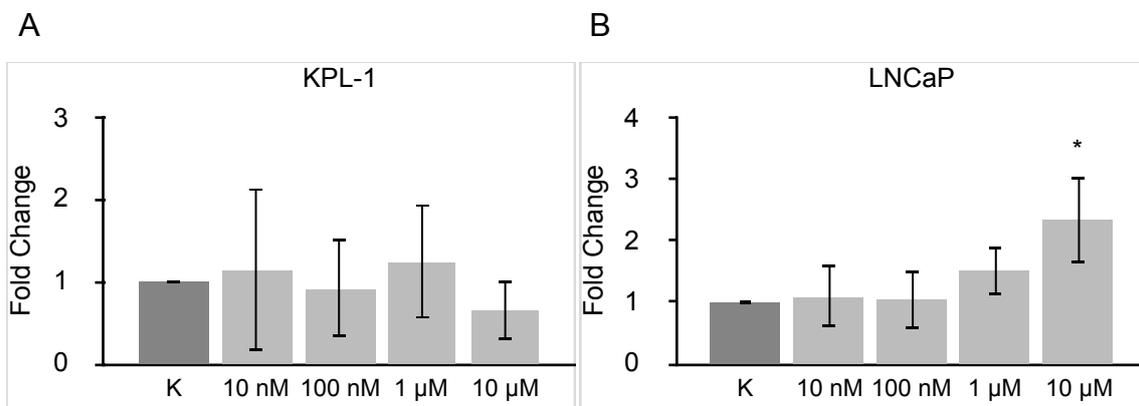


**Abbildung 16: RAI2 Induktion in KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden Behandlung mit Tunicamycin.**

Relative Expressionsunterschiede (Fold Change) wurden mittels qPCR in jeweils drei technischen sowie drei biologisch unabhängigen Replikaten bestimmt (n=3) und jeweils auf das

Haushaltsgen B2M sowie eine unbehandelte Kontrolle (K) normalisiert. Bestimmung des p-Wertes mit Students t-Test (\*  $p < 0,05$ ). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

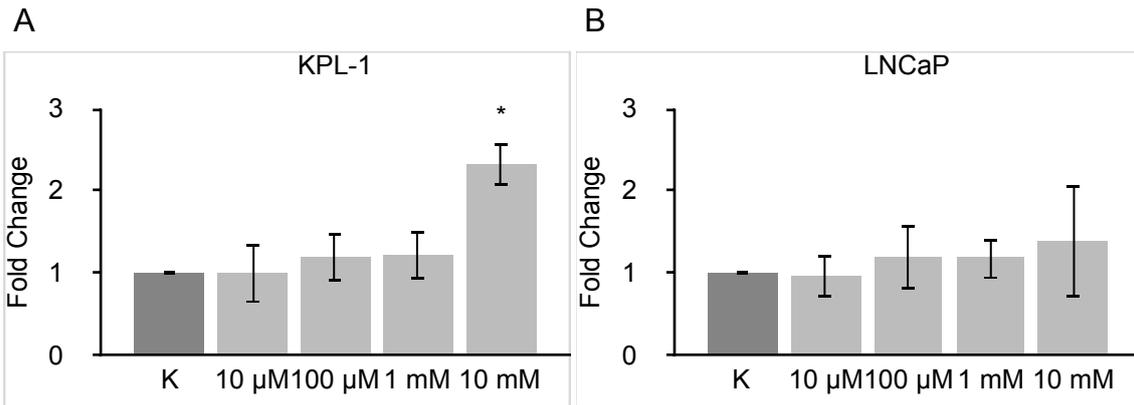
Bei Cycloheximid handelt es sich um ein Antibiotikum, welches bei Eukaryonten durch Inhibition der Peptidyltransferase an der 60S-Untereinheit der Ribosomen eine translationshemmende Wirkung entfaltet (Schneider-Poetsch et al. 2010, PubChem 2020b). Nach einer 72 stündigen Behandlung von KPL-1-Zellen mit Cycloheximid zeigte sich keine signifikante Induktion von RAI2. In LNCaP ergab sich eine signifikante Zunahme der *RAI2*-Genexpression bei Behandlung mit einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ .



**Abbildung 17: RAI2 Induktion in KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden Behandlung mit Cycloheximid.**

Relative Expressionsunterschiede (Fold Change) wurden mittels qPCR in jeweils drei technischen sowie drei biologisch unabhängigen Replikaten bestimmt ( $n=3$ ) und jeweils auf das Haushaltsgen B2M sowie eine unbehandelte Kontrolle (K) normalisiert. Bestimmung des p-Wertes mit Students t-Test (\*  $p < 0,05$ ). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

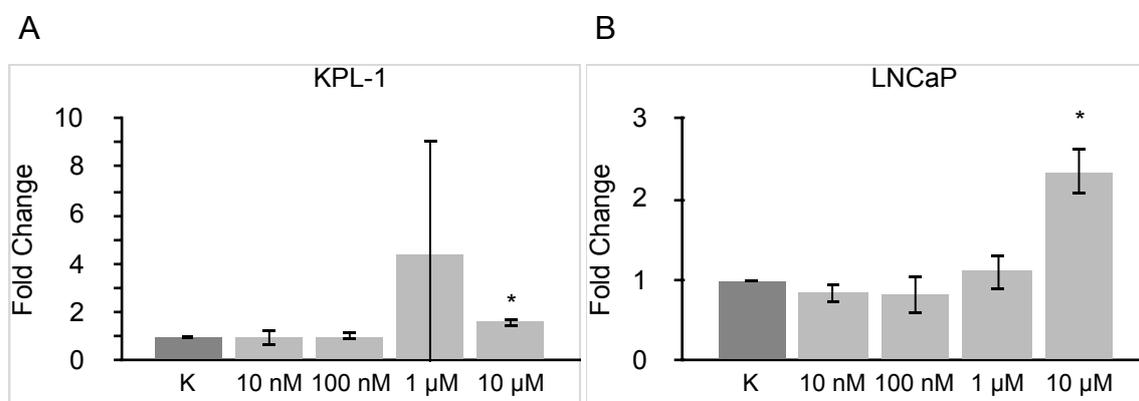
Gentamicin ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum, welches durch Bindung an die bakterielle 30S-Untereinheit am Ribosom zu einer Translationshemmung und somit zu einer Inhibition der Proteinbiosynthese führt. Durch diesen Mechanismus wirkt Gentamicin bakterizid. In hohen Dosen wirkt Gentamicin auch auf humane Zellen zytotoxisch (PubChem 2020a). Da in dieser Arbeit Derivate humaner Zelllinien verwendet wurden, wurden die eingesetzten Konzentrationen von Gentamicin (10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 1 mM, 10 mM) höher gewählt als bei den anderen Pharmaka. Nach der Behandlung von KPL-1-Zellen mit Gentamicin zeigte sich bei 10 mM eine signifikante RAI2-Induktion gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Niedrigere Konzentrationen zeigten keine signifikante RAI2-Induktion. Demgegenüber ließ sich in LNCaP-Zellen in keiner der behandelten Proben eine signifikante RAI2-Induktion zeigen.



**Abbildung 18: RAI2 Induktion in KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden Behandlung mit Gentamicin.**

Relative Expressionsunterschiede (Fold Change) wurden mittels qPCR in jeweils drei technischen sowie drei biologisch unabhängigen Replikaten bestimmt (n=3) und jeweils auf das Haushaltsgen B2M sowie eine unbehandelte Kontrolle (K) normalisiert. Bestimmung des p-Wertes mit Students t-Test (\* p < 0,05). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Olaparib ist ein PARP-Inhibitor und wird klinisch zur Erhaltungstherapie bei Platin-sensitivem Rezidiv eines BRCA-mutierten high-grade serösen Ovarialkarzinoms sowie in der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms mit BRCA-Mutation eingesetzt (FDA 2017, FDA 2018). Die Behandlung von KPL-1-Zellen mit Olaparib 10 µM zeigte eine signifikante Zunahme der RAI2-Expression. Bei Behandlung mit weniger als 10 µM Olaparib ließ sich keine signifikante Zunahme feststellen. In LNCaP-Zellen zeigte sich für 10 µM Olaparib eine signifikante RAI2-Induktion. Bei einer Behandlung mit geringeren Konzentrationen als 10 µM Olaparib ließ sich hier ebenfalls keine signifikante Zunahme feststellen.



**Abbildung 19: RAI2 Induktion in KPL-1 (A) und LNCaP (B) nach 72 Stunden Behandlung mit Olaparib.**

Relative Expressionsunterschiede (Fold Change) wurden mittels qPCR in jeweils drei technischen sowie drei biologisch unabhängigen Replikaten bestimmt (n=3) und jeweils auf das

Haushaltsgen B2M sowie eine unbehandelte Kontrolle (K) normalisiert. Bestimmung des p-Wertes mit Students t-Test (\*  $p < 0,05$ ). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es in Gegenwart von genotoxischem Zellstress durch Etoposid dosisabhängig zu einer signifikanten Induktion der RAI2-Expression kommt. Auch bei einer Behandlung mit Olaparib zeigte sich in hoher Konzentration in beiden Zelllinien eine signifikante RAI2 Induktion. Daraus lässt sich eine potentielle Beteiligung von RAI2 im Rahmen von Zellstresswegen bei DNA-Brüchen ableiten. Bei der Behandlung mit Camptothecin zeigte sich im Bereich der jeweiligen IC50 eine signifikante Induktion der RAI2-Induktion. Bei höheren Konzentrationen zeigte sich in KPL-1-Zellen eine signifikante Reduktion bzw. in LNCaP-Zellen nicht signifikante Veränderungen mit hohen Standardabweichungen. Diese Ergebnisse können als Ausdruck der Zytotoxizität von Camptothecin interpretiert werden. Die Exposition gegenüber anderen Formen von Zellstress zeigte inkonklusive bzw. nicht-signifikante Ergebnisse. Unter Tunicamycin zeigte sich beispielsweise zwar in LNCaP-Zellen eine konzentrationsabhängige Induktion von RAI2, diese Beobachtung lässt sich jedoch nicht auf KPL-1-Zellen übertragen.

#### **4.3 Analyse der RAI2-Proteinexpression in KPL-1- und LNCaP-Zellen nach Behandlung mit Zellstress-induzierenden Pharmaka**

Für die Charakterisierung der Rolle des RAI2-Proteins in der zellulären Stressantwort wurde die Korrelation der Expression von Markern der zellulären Stressantwort mit der RAI2-Proteinexpression in KPL-1- und LNCaP-Zellen untersucht. Die untersuchten Marker lassen sich jeweils einem zellulären Signalweg zuordnen und ermöglichen somit möglicherweise einen Rückschluss auf die Funktion des RAI2-Proteins. Um spezifische Signalwege zu aktivieren, wurden verschiedene Zellstress-induzierende Pharmaka eingesetzt. Die Zelllinien KPL-1 und LNCaP wurden für 72 Stunden mit diesen Pharmaka behandelt bevor Ganzzellextrakte hergestellt wurden. Die verwendete Konzentration der Pharmaka orientierte sich dabei an der ermittelten IC50-Dosis (Abbildung A1 im Anhang). Anschließend wurden diese Extrakte in Western-Blot-Analysen mit verschiedenen Antikörpern im Hinblick auf die Proteinexpression untersucht. Als DNA-Schadensmarker bzw. Zellzyklusmarker

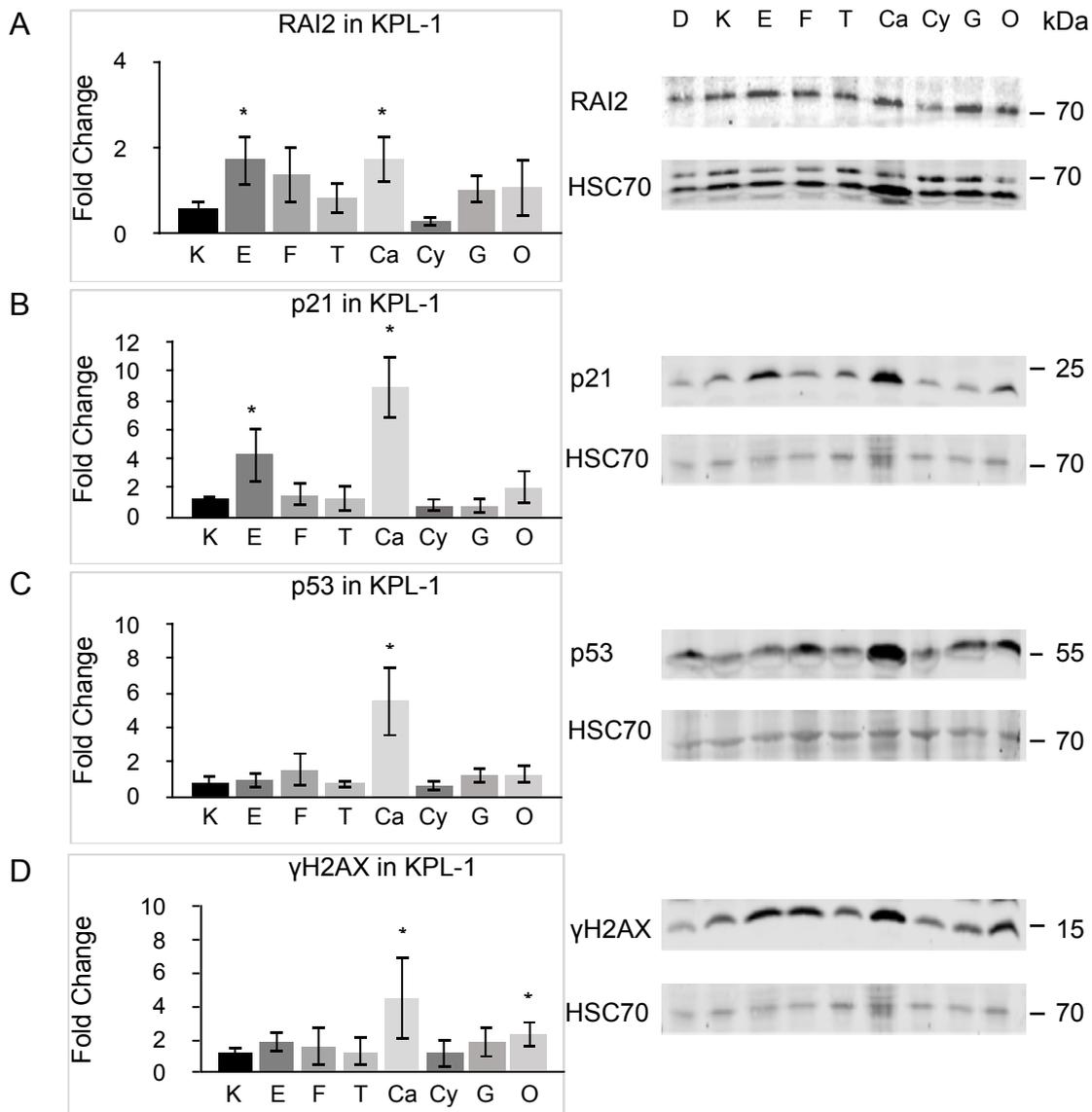
wurden p21, p53 und  $\gamma$ H2AX verwendet, als Paraspeckle-Marker NONO und PSPC1, als Marker für die Antwort auf ungefaltete Proteine pelf2 $\alpha$ . Als Referenzprotein wurde für die Normalisierung der jeweiligen relativen Proteinexpression das Heat shock cognate 71 kDa Protein (HSC70) verwendet. Bei HSC70 handelt es sich um ein Haushaltsprotein, das konstitutiv und gleichbleibend exprimiert wird, sodass es sich als Referenzprotein eignet (Daugaard et al. 2007, National Center for Biotechnology Information 2020).

#### **4.3.1 Analyse der Marker für DNA-Schäden und Zellzyklusarrest**

Im Falle von DNA-Schädigungen werden je nach Art der Schädigung zelluläre Reparaturprozesse induziert, welche bestenfalls den DNA-Schaden beheben und somit die genomische Stabilität aufrecht erhalten. Eine wichtige Rolle in der Kontrolle der DNA-Stabilität stellt der Transkriptionsfaktor p53 dar, welcher bei DNA-Schäden induziert wird und zur Expression von Tumorsuppressorgenen führt (Vogelstein et al. 2000, Pflaum et al. 2014). Ein Zielgen von p53 ist p21, wobei es sich um einen CDK-Inhibitor handelt, der durch einen Zellzyklusarrest am G1- oder G2-Checkpoint indirekt zur DNA-Reparatur beiträgt, indem die DNA-Reparaturmechanismen den Zellzyklusarrest für die Reparatur nutzen können (Abbas und Dutta 2009). Das phosphorylierte Histon  $\gamma$ H2AX ist an der Rekrutierung verschiedener DNA-Reparaturproteine beteiligt und stellt einen sensitiven Marker für DSB dar (Sharma et al. 2012). Von den verwendeten Pharmaka spielen an dieser Stelle vor allem Etoposid und Camptothecin eine Rolle, da sie zu DNA-Strangbrüchen führen und demnach eine Hochregulation von DNA-Schadensmarkern zu erwarten ist (Montecucco et al. 2015, PubChem 2020c).

Bei der Behandlung von KPL-1-Zellen zeigte sich gegenüber der unbehandelten Kontrolle eine signifikante Induktion des RAI2-Proteins bei Etoposid und Camptothecin. Für Tunicamycin, Flavopiridol, Gentamicin, Cycloheximid und Olaparib ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von RAI2 feststellen. Die relative Induktion des Proteins p21 zeigte bei der Behandlung von KPL-1-Zellen mit Etoposid und Camptothecin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine signifikante Zunahme. Bei den anderen Behandlungen konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich

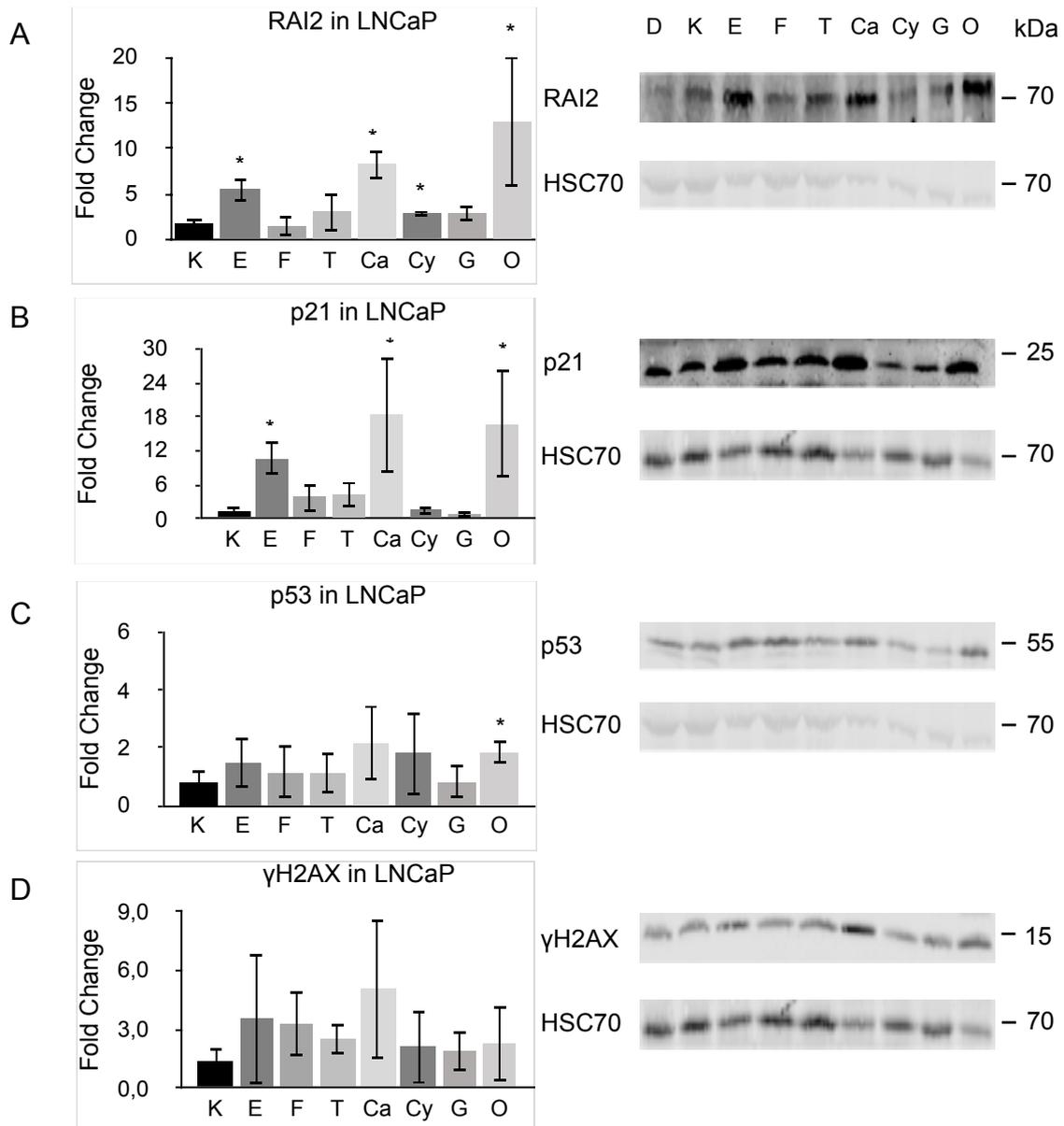
der p21-Expression festgestellt werden. Die Analyse der p53-Proteinexpression zeigte ausschließlich bei der Behandlung mit Camptothecin eine signifikante Erhöhung der Proteinexpression. Die Expression des DNA-Schadensmarkers  $\gamma$ H2AX zeigte sich in KPL-1-Zellen nach Behandlung mit Camptothecin und Olaparib signifikant erhöht. Es lässt sich zusammenfassen, dass sich die RAI2-Proteinexpression am stärksten durch eine Behandlung mit Camptothecin und Etoposid induzieren lässt. Bei der Behandlung mit diesen beiden Pharmaka kommt es parallel zu einer signifikant verstärkten Expression von p21. Zusätzlich kommt es nach der Behandlung mit Camptothecin zu einer signifikant erhöhten p53- und  $\gamma$ H2AX-Expression und nach einer Behandlung mit Olaparib zur einer erhöhten  $\gamma$ H2AX-Expression.



**Abbildung 20: Expression von RAI2 (A) und der DNA-Schadensmarker p21 (B), p53 (C) und  $\gamma$ H2AX (D) in KPL-1 nach 72 Stunden Behandlung mit Pharmaka.**

Die relative Proteinexpression (Fold Change) wurde mittels Western Blots in drei biologisch unabhängigen Replikaten bestimmt und auf HSC70 sowie jeweils auf eine unbehandelte Kontrolle (K) normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Expressionsänderung (Fold Change) sowie die Standardabweichungen. Bestimmung des p-Wertes mit Students t-Test (\* $p < 0,05$ ). Unbehandelte Referenz mit DMEM (D). Verwendete Pharmaka: Etoposid 10  $\mu$ M (E), Flavopiridol 100 nM (F), Tunicamicin 1  $\mu$ M (T), Camptothecin 100 nM (Ca), Cycloheximid 4  $\mu$ M (Cy), Gentamicin 5 mM (G), Olaparib 20  $\mu$ M (O). Die Doppelbande in (A) wird durch die Verwendung verschiedener Antikörper auf einer Membran hervorgerufen.

Bei der Behandlung von LNCaP-Zellen mit der jeweiligen IC50-Dosis der Pharmaka zeigte sich eine signifikante Erhöhung der relativen RAI2-Proteinexpression bei Etoposid, Camptothecin, Cycloheximid und Olaparib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die anderen Behandlungen zeigten keine signifikante Zunahme der relativen RAI2-Proteinexpression. In LNCaP-Zellen zeigte sich eine signifikante Zunahme der relativen Proteinexpression von p21 bei Behandlung mit Etoposid, Camptothecin und Olaparib. Eine signifikante Induktion des p53-Proteins zeigte sich nach der Behandlung mit Olaparib. Für keine der Behandlungen zeigte sich eine signifikante Zunahme der Phosphorylierung von  $\gamma$ H2AX.



**Abbildung 21: Expression von RAI2 (A) und der DNA-Schadensmarker p21 (B), p53 (C) und γH2AX (D) in LNCaP nach 72 Stunden Behandlung mit Pharmaka.**

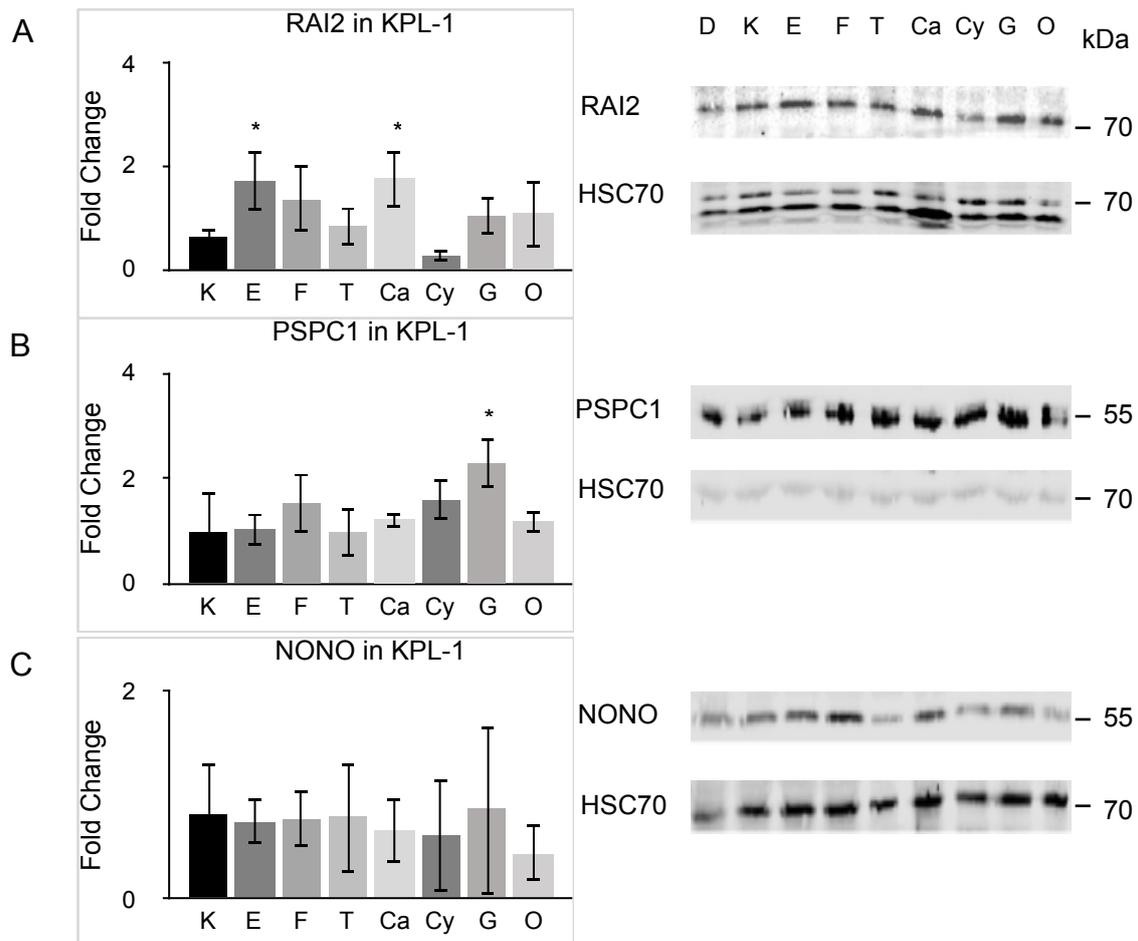
Die relative Proteinexpression (Fold Change) wurde mittels Western Blots in drei biologisch unabhängigen Replikaten bestimmt und auf HSC70 sowie jeweils auf eine unbehandelte Kontrolle (K) normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Fold Change sowie die Standardabweichungen. Bestimmung des p-Wertes mit Students t-Test (\*p < 0,05). Unbehandelte Referenz mit DMEM (D). Verwendete Pharmaka: Etoposid 1 μM (E), Flavopiridol 100 nM (F), Tunicamicin 50 nM (T), Camptothecin 10 nM (Ca), Cycloheximid 4 μM (Cy), Gentamicin 5 mM (G), Olaparib 14 μM (O).

In den analysierten LNCaP-Zellen lässt sich die RAI2-Proteinexpression effizient mit Etoposid, Camptothecin, Cycloheximid und Olaparib induzieren. Etoposid, Camptothecin und Olaparib induzieren ebenfalls signifikant die p21-Expression, Olaparib induziert zudem signifikant die p53-Proteinexpression.

### 4.3.2 Analyse von Paraspeckle-Proteinen

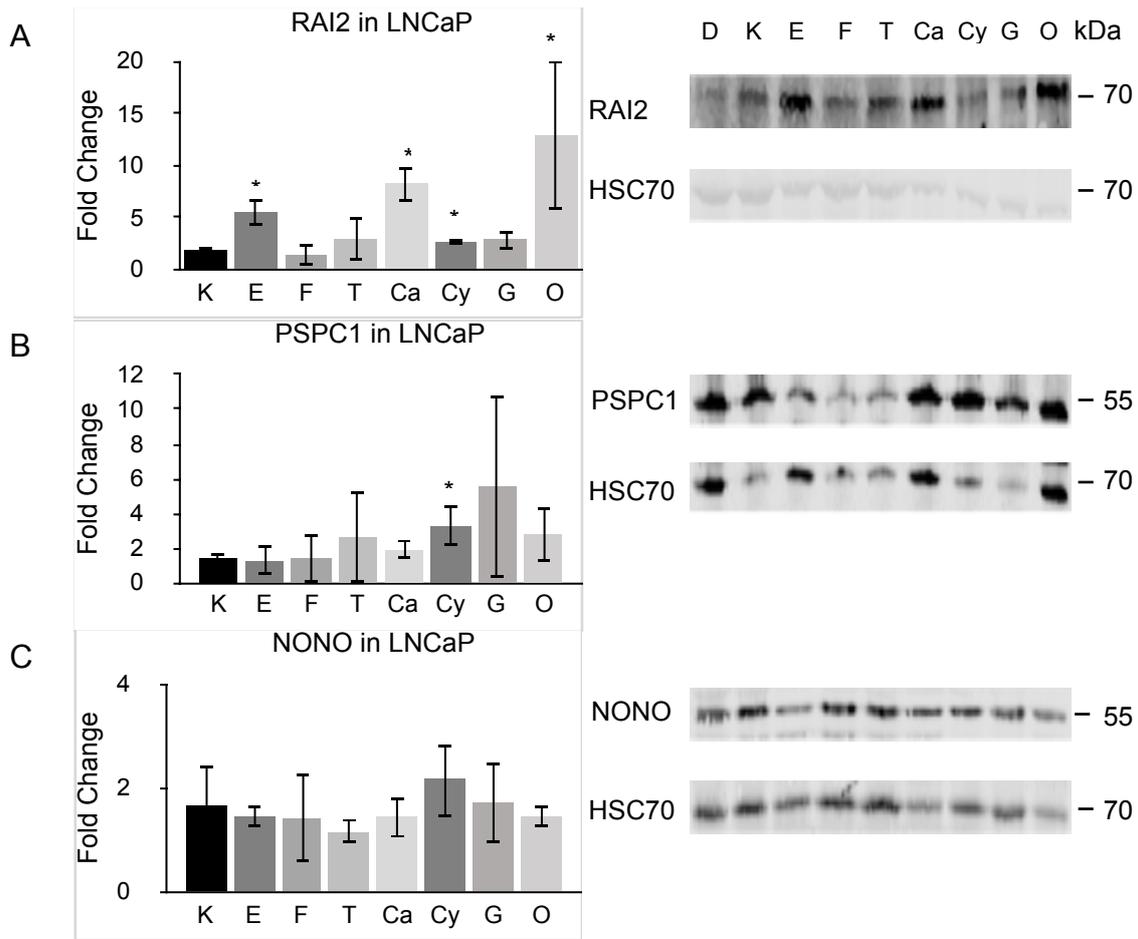
Paraspeckles werden auch als molekularer Schwamm bezeichnet, da sie in der Lage sind, Proteine und RNA temporär aufzunehmen und zu speichern (West et al. 2016). Ihnen wird unter anderem eine Rolle in zellulären Stressprozessen zugeschrieben (Nakagawa et al. 2018). Als Paraspeckle-Marker wurden in dieser Arbeit PSPC1 und NONO verwendet, als Referenz zur Normalisierung HSC70. Für den Vergleich der Proteinexpression von NONO und PSPC1 mit der Expression von RAI2 wurden die relativen Expressionsunterschiede jeder behandelten Probe auf die jeweils unbehandelte Probe (DMEM) normalisiert. Anschließend wurde geprüft, in welchen Fällen sich eine Induktion von NONO, PSPC1 und RAI2 gegenüber der unbehandelten Probe (DMSO) zeigte und für welche Inhibitoren sich vergleichbare Effekte ergaben.

Bei der Behandlung von KPL-1-Zellen mit der jeweiligen IC50 der Pharmaka zeigte sich gegenüber der unbehandelten Kontrolle eine signifikante RAI2-Protein-Induktion bei Etoposid und Camptothecin. Für Tunicamycin, Flavopiridol, Gentamicin, Cycloheximid und Olaparib ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von RAI2 feststellen (Abbildung 20, 22, 24). Nach der Behandlung von KPL-1-Zellen mit Gentamicin zeigte sich eine signifikante Induktion von PSPC1. Die Expression von NONO und PSPC1 zeigte in keiner der anderen behandelten Proben einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur jeweils unbehandelten Kontrolle. Bei der Behandlung von LNCaP-Zellen mit der jeweiligen IC50-Dosis der Pharmaka zeigte sich eine signifikante Zunahme der relativen RAI2-Proteinexpression bei Etoposid, Camptothecin, Cycloheximid und Olaparib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die anderen Behandlungen zeigten keine signifikante Zunahme der relativen RAI2-Proteinexpression (Abbildung 21, 23, 25). Es zeigte sich keine signifikante Zunahme der relativen NONO-Proteinexpression. Für PSPC1 zeigte sich eine signifikante Zunahme der Proteinexpression nach der Behandlung mit Cycloheximid. Zusammenfassend lässt sich weder in KPL-1- noch in LNCaP-Zellen eine Assoziation der RAI2-Proteinexpression und der Expression der Paraspeckle-Proteine erkennen. Folglich kann anhand dieser Analyse kein Hinweis für eine Rolle von RAI2 an der Bildung von Paraspeckles festgestellt werden.



**Abbildung 22: Expression von RAI2 (A) und der Paraspeckle-Marker PSPC1 (B) und NONO (C) in KPL-1 nach 72 Stunden Behandlung mit Pharmaka.**

Die relative Proteinexpression (Fold Change) wurde mittels Western Blots in drei biologischen unabhängigen Replikaten bestimmt und auf HSC70 sowie jeweils auf eine unbehandelte Kontrolle (K) normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Expressionsänderung (Fold Change) sowie die Standardabweichungen. Bestimmung des p-Wertes mit Students t-Test (\* $p < 0,05$ ). Unbehandelte Referenz mit DMEM (D). Verwendete Pharmaka: Etoposid 10  $\mu\text{M}$  (E), Flavopiridol 100 nM (F), Tunicamicin 1  $\mu\text{M}$  (T), Camptothecin 100 nM (Ca), Cycloheximid 4  $\mu\text{M}$  (Cy), Gentamicin 5 mM (G), Olaparib 20  $\mu\text{M}$  (O). Die Doppelbande in (A) wird durch die Verwendung verschiedener Antikörper auf einer Membran hervorgerufen.



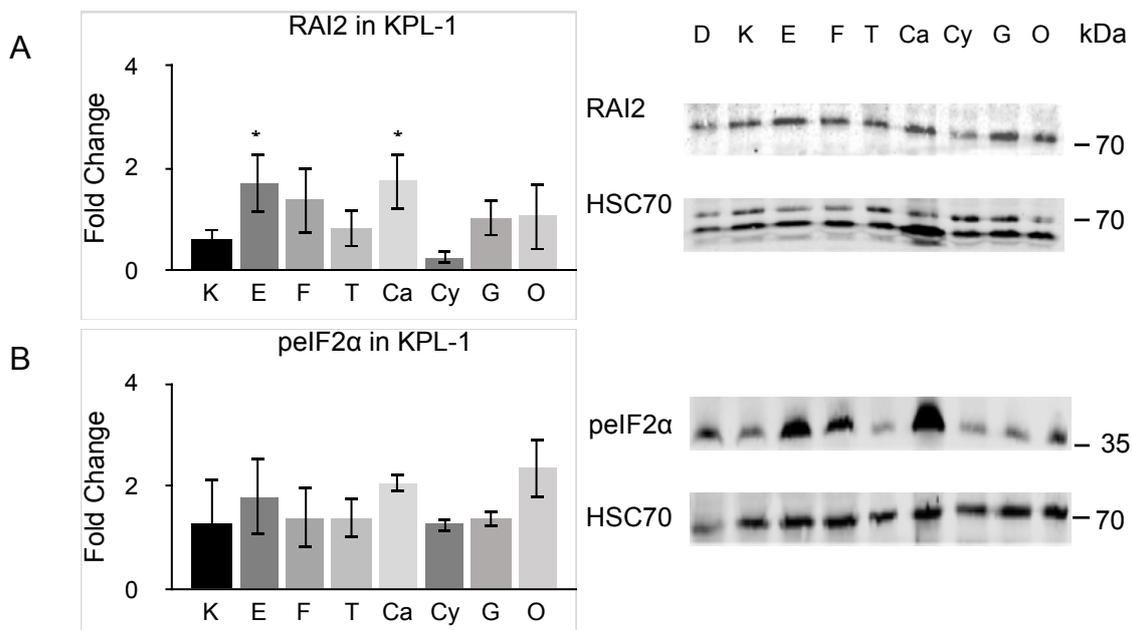
**Abbildung 23: Expression von RAI2 (A) und der Paraspeckle-Marker PSPC1 (B) und NONO (C) in LNCaP nach 72 Stunden Behandlung mit Pharmaka.**

Die relative Proteinexpression (Fold Change) wurde mittels Western Blots in drei biologisch unabhängigen Replikaten bestimmt und auf HSC70 sowie jeweils auf eine unbehandelte Kontrolle (K) normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Fold Change sowie die Standardabweichungen. Bestimmung des p-Wertes mit Students t-Test (\* $p < 0,05$ ). Unbehandelte Referenz mit DMEM (D). Verwendete Pharmaka: Etoposid 1  $\mu\text{M}$  (E), Flavopiridol 100 nM (F), Tunicamicin 50 nM (T), Camptothecin 10 nM (Ca), Cycloheximid 4  $\mu\text{M}$  (Cy), Gentamicin 5 mM (G), Olaparib 14  $\mu\text{M}$  (O).

#### 4.3.3 Analyse von UPR-Markern

Eine Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum führt zu Zellstress und resultiert in der Aktivierung der Antwort auf ungefaltete Proteine. Die Antwort auf ungefaltete Proteine wurde in dieser Arbeit durch eine Behandlung mit Tunicamycin initiiert (Wang et al. 2015). Als Marker für die UPR wurde p-eIF2 $\alpha$  verwendet. Für den Vergleich der Proteinexpression von RAI2 mit dem Phosphorylierungsstatus von eIF2 $\alpha$  wurden die relativen Unterschiede der Proteinexpression jeder behandelten Probe auf die jeweils unbehandelte Probe sowie HSC70 normalisiert. Anschließend wurde geprüft, in

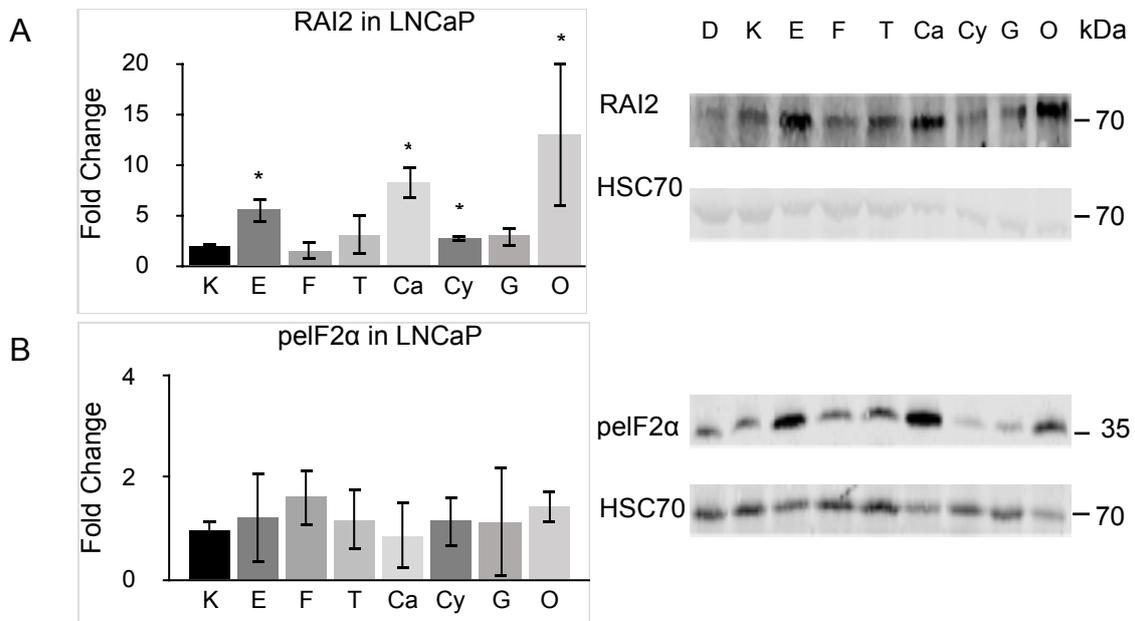
welchen Fällen sich eine Änderung der eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung und der RAI2-Expression gegenüber der unbehandelten Probe zeigte und für welche Inhibitoren sich vergleichbare Effekte zeigten. Bei der Behandlung von KPL-1-Zellen mit der jeweiligen IC50 der Pharmaka zeigte sich gegenüber der unbehandelten Kontrolle eine signifikante RAI2-Protein-Induktion bei Etoposid und Camptothecin. Für Tunicamycin, Flavopiridol, Gentamicin, Cycloheximid und Olaparib ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von RAI2 feststellen (Abbildung 20, 22, 24). Es konnte keine signifikante Veränderung der Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  festgestellt werden. Bei der Behandlung von LNCaP-Zellen mit der jeweiligen IC50-Dosis der Pharmaka zeigte sich eine signifikante Zunahme der relativen RAI2-Proteinexpression bei Etoposid, Camptothecin, Cycloheximid und Olaparib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die anderen Behandlungen zeigten keine signifikante Zunahme der relativen RAI2-Proteinexpression (Abbildung 21, 23, 25). Für keine der Behandlungen zeigte sich eine signifikante Veränderung der Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$ . Es kann somit weder für KPL-1- noch für LNCaP-Zellen eine Assoziation zwischen der Expression des RAI2-Proteins und der Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  gezeigt werden.



**Abbildung 24: Expression von RAI2 (A) und des UPR-Markers peIF2 $\alpha$  (B) in KPL-1 nach 72 Stunden Behandlung mit Pharmaka.**

Die relative Proteinexpression (Fold Change) wurde mittels Western Blots in drei biologisch unabhängigen Replikaten bestimmt und auf HSC70 sowie jeweils auf eine unbehandelte

Kontrolle (K) normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Expressionsänderung (Fold Change) sowie die Standardabweichungen. Bestimmung des p-Wertes mit Students t-Test (\*p < 0,05). Unbehandelte Referenz mit DMEM (D). Verwendete Pharmaka: Etoposid 10 µM (E), Flavopiridol 100 nM (F), Tunicamicin 1 µM (T), Camptothecin 100 nM (Ca), Cycloheximid 4 µM (Cy), Gentamicin 5 mM (G), Olaparib 20 µM (O). Die Doppelbande in (A) wird durch die Verwendung verschiedener Antikörper auf einer Membran hervorgerufen.



**Abbildung 25: Expression von RAI2 (A) und des UPR-Markers pelf2α (B) in LNCaP nach 72 Stunden Behandlung mit Pharmaka.**

Die relative Proteinexpression (Fold Change) wurde mittels Western Blots in drei biologisch unabhängigen Replikaten bestimmt und auf HSC70 sowie jeweils auf eine unbehandelte Kontrolle (K) normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Fold Change sowie die Standardabweichungen. Bestimmung des p-Wertes mit Students t-Test (\*p < 0,05). Unbehandelte Referenz mit DMEM (D). Verwendete Pharmaka: Etoposid 1 µM (E), Flavopiridol 100 nM (F), Tunicamicin 50 nM (T), Camptothecin 10 nM (Ca), Cycloheximid 4 µM (Cy), Gentamicin 5 mM (G), Olaparib 14 µM (O).

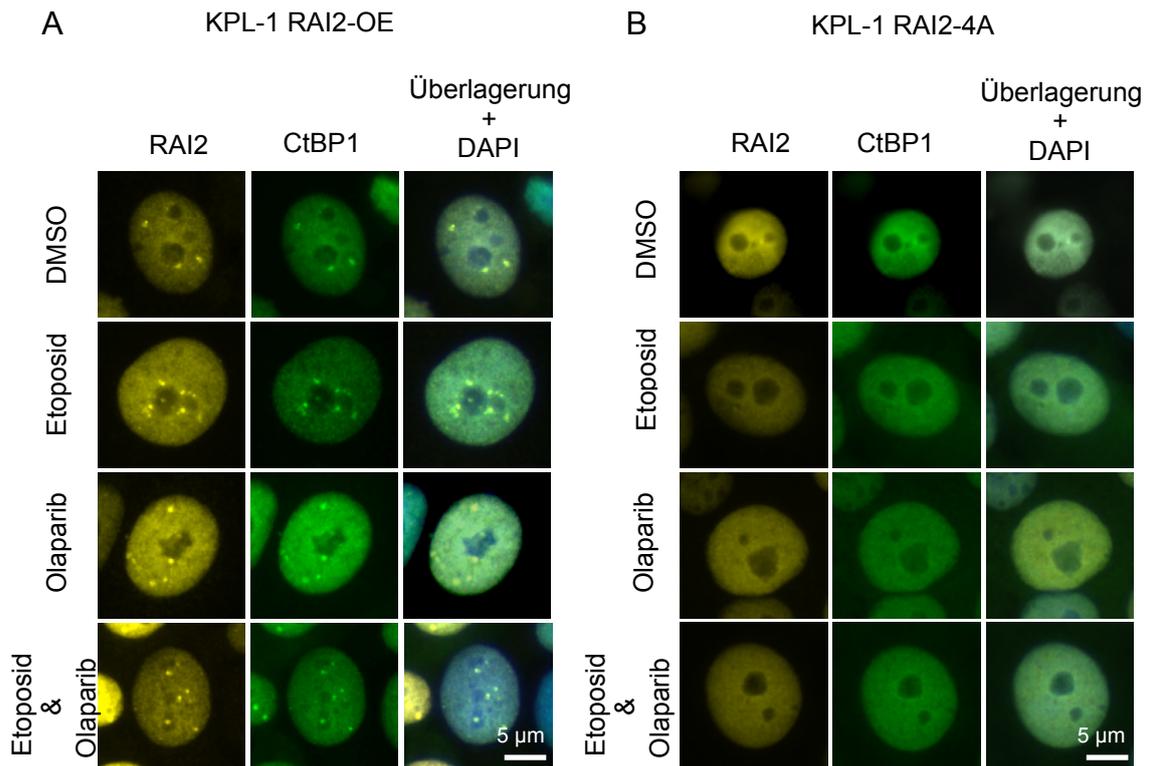
#### 4.4 Bildung von lokalisierten RAI2- und CtBP1-positiven Speckles nach Behandlung mit Etoposid und Olaparib

Vorherige Studien konnten in der Zelllinie MCF-7 bereits eine Colokalisation von RAI2 und CtBP1 in nukleären Speckles zeigen (Werner et al. 2015). Um zu untersuchen, ob sich diese Beobachtung auf KPL-1-Zellen übertragen lässt und es bei Zellstress zur Colokalisation der Proteine RAI2 und CtBP1 kommt, wurden KPL-1-Zellen mit genotoxischen Pharmaka behandelt. Anschließend wurde die subzelluläre Lokalisation von RAI2 und CtBP1 mittels Immunfluoreszenz analysiert. Dafür wurden drei Zelllinien verwendet: KPL-1,

KPL-1 mit stabiler Überexpression von RAI2 (RAI2-OE) und KPL-1 mit Überexpression einer RAI2-Proteinvariante, bei der beide CtBP-Bindungsstellen mutiert sind (RAI2-4A). Jede Zelllinie wurde auf Kammerobjektträgern mit 10  $\mu$ M Etoposid, 5  $\mu$ M Olaparib und einer Kombination aus 10  $\mu$ M Etoposid und 5  $\mu$ M Olaparib behandelt. Als Referenz diente jeweils eine unbehandelte Kontrolle.

Die Färbung von RAI2 und CtBP1 zeigte in parentalen KPL-1-Zellen weder in der unbehandelten noch in den behandelten Proben nukleäre Speckles. Demgegenüber zeigen repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von KPL-1-Zellen mit RAI2-Überexpression (KPL-1 RAI2-OE) RAI2/CtBP1-positive Speckles (Abbildung 26). Diese zeigen sich sowohl in der unbehandelten Probe als auch in den behandelten Proben. Die Färbung von RAI2 und CtBP1 in KPL-1-Zellen mit Überexpression der RAI2-4A-Variante zeigte keine nukleären Speckles in der unbehandelten Probe. Es zeigten sich vereinzelte Speckles in der mit Etoposid behandelten Probe.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass RAI2/CtBP1-positive Speckles in KPL-1-Zellen mit einer Überexpression von RAI2 sowohl in unbehandelten Proben, als auch nach der Behandlung mit genotoxischen Pharmaka auftreten. In Zellen mit gestörter CtBP1/RAI2-Bindung zeigen sich keine Speckles, sodass von einer Abhängigkeit der Speckle-Bildung von der intakten Bindung zwischen CtBP1 und RAI2 ausgegangen werden kann.



**Abbildung 26: Immunfluoreszenzaufnahmen von KPL-1 RAI2-OE (A) und KPL-1 RAI2-4A (B) nach Behandlung mit Etoposid, Olaparib und Etoposid in Kombination mit Olaparib.**

RAI2 und CtBP1 wurden mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die Analyse erfolgte bei 40x Vergrößerung und nach 72 Stunden Behandlung mit Etoposid 10  $\mu$ M, Olaparib 5  $\mu$ M sowie einer Kombination aus Etoposid 10  $\mu$ M und Olaparib 5  $\mu$ M. RAI2-OE bezeichnet die Überexpression von RAI2, KPL-1 RAI2-4A die Überexpression von RAI2 mit CtBP1-Bindungsmutation. Der Messbalken entspricht 5  $\mu$ m.

## 5. Diskussion

Bei zellulärem Stress werden je nach Art des Zellstress Signalwege zum Schutz der Zelle aktiviert. Dazu gehören unter anderem die DNA-Schadensantwort sowie die Antwort auf ungefaltete Proteine. Diese Reparaturmechanismen sind wichtig, da insbesondere genotoxischer Zellstress zur genomischen Instabilität und somit zur Entstehung und Progression von malignen Tumoren beiträgt (Hanahan und Weinberg 2011). Die zelluläre Stressantwort spielt eine Schlüsselrolle in der Entwicklung verschiedener Erkrankungen und steht außerdem im Zusammenhang mit der Ausbildung von Chemoresistenzen in malignen Tumoren (Curtin 2012, Chircop und Speidel 2014, Renovanz und Kim 2014). Ein detailliertes Verständnis zellulärer Stress-Signalwege, ihrer Regulation und beteiligter Proteine ist demnach wichtig, um Krankheitsprozesse und Mechanismen der Chemoresistenz zu verstehen und geeignete Therapieansätze zu entwickeln (Chircop und Speidel 2014). Ein potentiell an der zellulären Stressantwort beteiligtes Protein könnte RAI2 sein. RAI2 besitzt in hormonabhängigen Mammakarzinomen eine tumorsuppressive Funktion. Demgegenüber korreliert eine geringe Genexpression von RAI2 bei Patientinnen mit ER-positiven Mammakarzinomen mit einer erhöhten Anzahl von DTCs im Knochenmark und mit einer signifikanten Reduktion der Überlebenswahrscheinlichkeit (Werner et al. 2015). Die molekulare Charakterisierung von RAI2 in ER-positiven Mammakarzinomzellen legt eine Funktion von RAI2 als transkriptioneller Co-Regulator bei der Differenzierung von Mammakarzinomzellen nahe (Werner et al. 2015). Verschiedene Analysen am Institut für Tumorbilogie lassen darüber hinaus eine Rolle von RAI2 in der zellulären Stressantwort vermuten, da RAI2 in Mammakarzinomzellen durch Stressfaktoren wie Hormonentzug und Hypoxie induziert wird (Werner et al., unpubliziert). In dieser Arbeit wurde daher eine mögliche Funktion des RAI2-Proteins in der zellulären Stressantwort untersucht. Dazu wurde die Expression des *RAI2*-Gens sowie des RAI2-Proteins in Mammakarzinom- und Prostatakarzinomzellen (KPL-1, LNCaP) nach der Behandlung mit verschiedenen Zellstress-induzierenden Pharmaka untersucht. Dabei wurde mit der Grundannahme gearbeitet, dass es bei einer Induktion der *RAI2*-Gen- oder RAI2-Proteinexpression nach einer bestimmten Behandlung zu einer ursächlichen Verknüpfung mit dem jeweiligen Signalweg kommt. Für die

Untersuchung der Funktion des RAI2-Proteins in zellulären Stress-Signalwegen wurden verschiedene Markerproteine der Stress-Signalwege ausgewählt und ihre Expression mit der RAI2-Expression nach der Behandlung mit Zellstress-induzierenden Pharmaka verglichen. Als DNA-Stress- und Zellzyklusmarker wurden hierfür p21, p53 und  $\gamma$ H2AX verwendet, als Paraspeckle-Marker NONO und PSPC1 sowie als Markerprotein der UPR die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$ . Zur Induktion verschiedener Zellstress-Signalwege wurden die Topoisomerase-Inhibitoren Etoposid und Camptothecin verwendet sowie der PARP-Inhibitor Olaparib, der CDK-Inhibitor Flavopiridol, die Translationshemmer Cycloheximid und Gentamicin sowie Tunicamycin zur Hemmung der N-Glykosylierung von Proteinen und somit zur Induktion der UPR. Nach der Behandlung mit den genannten Substanzen wurde die Proliferation der beiden Zelllinien analysiert, um die Toxizität auf die Zelllinien zu untersuchen und um die jeweilige IC50-Dosis für Folgeexperimente zu bestimmen. Darüber hinaus wurde die subzelluläre Lokalisation von RAI2 und CtBP1 nach der Behandlung mit Etoposid und Olaparib untersucht.

Es zeigte sich eine signifikante, konzentrationsabhängige Induktion von RAI2 nach der Behandlung von KPL-1-Zellen und LNCaP-Zellen mit Etoposid. In der Proteinexpressionsanalyse ergab sich eine signifikante Induktion von RAI2 nach der Behandlung von KPL-1- und LNCaP-Zellen mit Etoposid bzw. Camptothecin. In LNCaP-Zellen zeigte sich zudem eine signifikante RAI2-Induktion nach der Behandlung mit Cycloheximid und Olaparib. Signifikante Expressionsunterschiede des p53-Proteins ergaben sich in KPL-1-Zellen nach der Behandlung mit Camptothecin sowie nach der Behandlung mit Olaparib in LNCaP-Zellen. Außerdem zeigten sich signifikante Expressionsunterschiede des p21-Proteins in KPL-1- sowie LNCaP-Zellen nach der Behandlung mit Etoposid und Camptothecin, in LNCaP-Zellen außerdem nach der Behandlung mit Olaparib. Eine signifikante Induktion von  $\gamma$ H2AX ließ sich in KPL-1-Zellen nach der Behandlung mit Camptothecin und Olaparib feststellen. Eine signifikante Induktion von PSPC1 zeigte sich in KPL-1-Zellen nach der Behandlung mit Gentamicin und in LNCaP-Zellen nach der Behandlung mit Cycloheximid. Für die Marker NONO und pEIF2 $\alpha$  zeigte sich nach keiner der Behandlung eine signifikante Induktion. Darüber hinaus wurde die subzelluläre

Lokalisation von RAI2 und CtBP1 nach der Behandlung mit verschiedenen Pharmaka analysiert. Hier zeigten sich in KPL-1-Zellen mit einer Überexpression von RAI2 sowohl in den unbehandelten als auch in den mit Etoposid und Olaparib behandelten Proben colokalisierte RAI2- und CtBP1-positive Speckles. In KPL-1-Zellen mit RAI2-Überexpression einer CtBP-Bindungsmutation konnten nur vereinzelt Speckles nachgewiesen werden.

### **5.1 RAI2-Gen- und RAI2-Proteinexpression im Zusammenhang mit der Aktivierung von zellulären Stresssignalwegen**

Um die Funktion von RAI2 in der zellulären Stressantwort zu untersuchen, wurden Pharmaka eingesetzt, die verschiedene Arten von Zellstress erzeugen. Das Zytostatikum Etoposid ist ein Topoisomerase-II-Inhibitor, der DSB induziert, somit genotoxischen Zellstress erzeugt und dadurch DNA-Reparaturwege wie die HRR und die NHEJ aktiviert (Montecucco et al. 2015, Maucher 2020). Die Analyse der Expression von RAI2-Transkripten in KPL-1- und LNCaP-Zellen zeigt, dass es in Gegenwart von genotoxischem Zellstress dosisabhängig zu einer signifikanten Induktion der RAI2-Expression kommt. Demgegenüber zeigte sich in den Proliferationsanalysen in beiden Zelllinien eine signifikante, dosisabhängige Proliferationsabnahme. In den Western Blots zeigte sich nach der Behandlung mit Etoposid eine signifikante Induktion des RAI2-Proteins in beiden Zelllinien. Zudem zeigte sich eine signifikante Induktion des p21-Proteins. Bei p21 handelt es sich um einen CDK-Inhibitor, der bei DNA-Schäden einen Zellzyklus-Arrest bewirkt (Karimian et al. 2016). Es zeigte sich eine nicht-signifikante Induktion von  $\gamma$ H2AX in KPL-1-Zellen (Fold Change 1,86;  $p = 0,09$ ), welches an der Reparatur von DSB beteiligt ist, indem DSB durch eine Phosphorylierung von Histon H2 am Aminosäurerest Serin 139 ( $\gamma$ H2AX) markiert werden. Diese Markierung bildet als Plattform für DNA-Reparaturproteine die Grundlage für die Reparatur von DSB (Rogakou et al. 1999, Sharma et al. 2012).  $\gamma$ H2AX stellt somit einen sensitiven Marker für DSB dar (Yuan et al. 2010). Die Ergebnisse zeigen, dass DNA-Schäden im Sinne von DSB durch Etoposid sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene zu einer signifikanten Induktion von RAI2 führen. Darüber hinaus wird der Zellzyklusmarker p21 signifikant induziert. Dies könnte auf eine Funktion von

RAI2 im Rahmen der zellulären Reparaturwege bei DSB hindeuten bzw. auf eine Funktion im Zellzyklus.

Bei Camptothecin handelt es sich um einen Topoisomerase-I-Inhibitor, der ebenfalls genotoxischen Zellstress in Form von DNA-Strangbrüchen induziert (PubChem 2020c). In der Echtzeit-PCR zeigte sich für 100 nM (KPL-1) bzw. 10 nM (LNCaP) eine signifikante Induktion von RAI2, in höheren Konzentrationen zeigte sich jedoch in KPL-1-Zellen eine signifikante Abnahme der RAI2-Expression bzw. in LNCaP-Zellen nicht-signifikante Veränderungen mit hohen Standardabweichungen. Dies lässt sich möglicherweise im Zusammenhang mit der Proliferationsanalyse erklären, da Camptothecin mit einer IC50 von 100 nM in KPL-1-Zellen bzw. 10 nM in LNCaP-Zellen eine hohe Toxizität zeigte und die Zellzahl somit in höheren Konzentrationen signifikant abnahm. Die hohen Standardabweichungen sowie die Reduktion der RAI2-Expression sind somit Ausdruck einer massiv erniedrigten Zellzahl in Folge der Zytotoxizität von Camptothecin. In den Protein-Expressionsanalysen wurde nach der Behandlung mit Camptothecin sowohl in KPL-1- als auch in LNCaP-Zellen eine signifikante Induktion des RAI2-Proteins beobachtet. Darüber hinaus zeigte sich in beiden Zelllinien ein signifikanter Expressionsunterschied für das p21-Protein und in KPL-1-Zellen auch für das p53-Protein. Letzteres führt bei DNA-Schäden zu einem Zellzyklusarrest und aktiviert DNA-Reparaturmechanismen (Vogelstein et al. 2000). Camptothecin erzeugt genotoxischen Zellstress und führt somit zu einem Anstieg der genannten Zellzyklusmarker. Darüber hinaus zeigte sich in KPL-1-Zellen eine signifikante Induktion von  $\gamma$ H2AX, welches einen sensitiven Marker für DSB darstellt und unter genotoxischem Zellstress durch Camptothecin induziert wird (Furuta et al. 2003, Yuan et al. 2010). In LNCaP ließ sich dieses Ergebnis nicht replizieren, hier zeigte sich eine hohe Standardabweichung für die  $\gamma$ H2AX-Induktion nach Behandlung mit Camptothecin. Die Ergebnisse der Behandlungen mit Camptothecin stützen die Annahme, dass RAI2 bei genotoxischem Zellstress induziert wird und in diesem Zusammenhang eine Funktion besitzt.

Der PARP-Inhibitor Olaparib inhibiert PARP, das Schlüsselenzym der BER, wodurch in Zellen mit einem HRR-Defekt (z. B. BRCA1-/ BRCA2-Mutation) eine

synthetische Letalität erzeugt wird (del Rivero und Kohn 2017). Der Begriff synthetische Letalität bezeichnet den Zelltod infolge einer Kombination von Defekten bei der Expression von mindestens zwei Genen, während ein Defekt nur eines dieser Gene nicht letal wäre (Nijman 2011). In der quantitativen Echtzeit-PCR zeigte sich eine signifikante RAI2-Induktion in beiden Zelllinien, allerdings erst bei vergleichsweise hohen Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$ . Eine mögliche Erklärung liefert die Proliferationsanalyse, in der sich erst bei 1  $\mu\text{M}$  in KPL-1-Zellen bzw. 10  $\mu\text{M}$  in LNCaP-Zellen eine signifikante Abnahme der relativen Absorption und somit der Proliferation zeigte. Dies lässt auf eine vergleichsweise geringe Toxizität von Olaparib in beiden Zelllinien schließen. Diese kann möglicherweise durch den Wirkmechanismus von Olaparib als PARP-Inhibitor erklärt werden, welcher auf der Kombination eines vorbestehenden, defekten DNA-Reparaturmechanismus und der PARP-Inhibition beruht (del Rivero und Kohn 2017). Wenn Zellen diese Defekte nicht aufweisen - wie bei KPL-1- und LNCaP-Zellen vermutet werden kann - zeigt Olaparib eine geringere Toxizität. Die anderen Inhibitoren setzen für ihren Wirkmechanismus keine konstitutionellen Defekte der Zellen voraus und können somit mutmaßlich eine stärkere Toxizität entfalten. In der Proteinexpressionsanalyse wurde in beiden Zelllinien eine im Vergleich zu den anderen Substanzen hohe Konzentration von Olaparib eingesetzt (14  $\mu\text{M}$ ). Hier zeigte sich in KPL-1-Zellen eine signifikante Induktion von  $\gamma\text{H2AX}$  und in LNCaP-Zellen eine signifikante Induktion von RAI2, p21 und p53. Diese Ergebnisse lassen sich durch die genotoxische Wirkung von Olaparib erklären.

Als Translationsinhibitor wurde Cycloheximid eingesetzt: Cycloheximid hemmt die Peptidyltransferase und führt somit zu einer Inhibition der Proteinbiosynthese und resultiert in der Apoptose der Zelle (Schneider-Poetsch et al. 2010, PubChem 2020b). Für Cycloheximid zeigte sich in der quantitativen Echtzeit-PCR in KPL-1-Zellen keine signifikante RAI2-Induktion, in LNCaP-Zellen zeigte sich eine signifikante RAI2-Induktion für 10  $\mu\text{M}$ . Die Proliferationsanalyse zeigte in KPL-1-Zellen eine dosisabhängige, signifikante Abnahme der Absorption bzw. Zellzahl bei 10  $\mu\text{M}$ , in LNCaP zeigte sich eine signifikante Abnahme bereits bei 1  $\mu\text{M}$ . In den Western Blots zeigte sich nach der Behandlung mit Cycloheximid eine signifikante Zunahme der RAI2-

Expression in LNCaP-Zellen sowie eine signifikante Zunahme der Expression des Paraspeckle-Proteins PSPC1. Diese Beobachtungen lassen sich allerdings nicht auf KPL-1-Zellen übertragen. Eine Induktion von RAI2 in LNCaP-Zellen nach der Behandlung mit Cycloheximid könnte auf eine Rolle von RAI2 im Rahmen der zellulären Prozesse bei Inhibition der Proteinbiosynthese und Apoptose-Induktion hindeuten. Die Induktion von PSPC1 weist möglicherweise auf eine Paraspeckle-Induktion hin, allerdings wird das Paraspeckle-Protein NONO nicht signifikant verstärkt exprimiert und der Effekt lässt sich nicht in der anderen Zelllinie beobachten.

Zur Inhibition der Transkription sowie zur Induktion eines Zellzyklusarrestes wurde der CDK-Inhibitor Flavopiridol verwendet (Sedlacek 2001). In der quantitativen Echtzeit-PCR zeigte sich in KPL-1-Zellen eine signifikante RAI2-Induktion bei 100 nM, für höhere Konzentrationen zeigte sich hingegen eine signifikante Reduktion. Die Proliferationsanalyse legt nahe, dass diese Reduktion vermutlich Ausdruck einer massiv erniedrigten Zellzahl bei Behandlungen oberhalb der IC<sub>50</sub> ist. In LNCaP-Zellen zeigte sich lediglich bei der Verwendung von 10 µM Flavopiridol eine signifikante RAI2-Induktion. Auch hier zeigte die Proliferationsanalyse eine signifikante Abnahme der relativen Absorption als Maß für die abnehmende Zellzahl. Die signifikante Reduktion von RAI2 in KPL-1-Zellen bei einer Behandlung oberhalb der IC<sub>50</sub>-Dosis könnte sich dadurch erklären, dass RAI2 an Reparaturmechanismen beteiligt ist, die in übermäßig gestressten Zellen zugunsten von pro-apoptischen Signalwegen nicht induziert werden. In den Proteinexpressionsanalysen zeigte die Behandlung mit Flavopiridol für keinen der untersuchten Marker eine signifikante Expressionszunahme. Diese Ergebnisse sind schlüssig, da Marker für genotoxischen Zellstress bzw. Zellzyklusmarker sowie Paraspeckle-Marker und UPR-Marker untersucht wurden, welche durch den Transkriptioninhibitor Flavopiridol unbeeinflusst bleiben.

Das Aminoglykosid-Antibiotikum Gentamicin bindet an die bakterielle 30S-Untereinheit am Ribosom und führt dadurch zu einer Translationshemmung und somit zu einer Inhibition der Proteinbiosynthese (PubChem 2020a). Außerdem inhibiert Gentamicin die NMD (Linde et al. 2007, PubChem 2020a). Diese dient

der Erkennung vorzeitiger Stopcodons in der mRNA und verhindert so die Bildung dysfunktionaler Proteine (Holbrook et al. 2004). Indem Gentamicin diesen Mechanismus inhibiert, kommt es konsekutiv zur Expression von Transkripten mit vorzeitigen Stop-Codons (Linde et al. 2007). Da Gentamicin in humanen Zellen erst bei hohen Dosen zytotoxisch wirkt, wurden in dieser Arbeit Behandlungen von 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM und 10 mM verwendet (PubChem 2020a). In KPL-1-Zellen zeigte sich nach der Behandlung mit 10 mM Gentamicin eine signifikante RAI2-Induktion, in LNCaP zeigte sich keine signifikante Induktion. Die Proliferationsanalysen zeigten signifikante Reduktionen der Proliferation ab 1 mM (KPL-1) bzw. 10 mM (LNCaP). Gentamicin zeigt also wie erwartet erst in vergleichsweise hohen Konzentrationen zytoreduktive Effekte. In der Proteinexpressionsanalyse zeigte sich lediglich in KPL-1-Zellen für PSPC1 eine signifikante Steigerung der Expression. In Zusammenschau der Ergebnisse scheint Gentamicin weder eindeutig RAI2 zu induzieren, noch einen der untersuchten Signalwege zu aktivieren.

Die UPR-Aktivierung erfolgte mittels Tunicamycin (Wang et al. 2015). Bei der UPR handelt es sich um eine Antwort auf ER-Stress, welcher durch un- bzw. fehlgefaltete Proteine hervorgerufen wird. Die UPR stellt den Abbau dieser Proteine sicher, kann aber bei starkem ER-Stress auch die Apoptose der Zelle einleiten (Hetz 2012, Wang et al. 2015). In der quantitativen Echtzeit-PCR zeigte sich in KPL-1-Zellen bei 100 nM eine signifikante RAI2-Induktion. Dieser Effekt ließ sich für höhere Konzentrationen jedoch nicht reproduzieren. In LNCaP-Zellen zeigte sich für 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M eine signifikante RAI2-Induktion. Die Proliferation von KPL-1- und LNCaP-Zellen nahm unter Tunicamycin dosisabhängig ab. In den Western Blots konnte nach der Behandlung mit Tunicamycin keine signifikante Veränderung der Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  festgestellt werden. Dies entspricht nicht den Ergebnissen anderer Studien, da Tunicamycin die UPR induziert und somit eigentlich eine verstärkte Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  als Ausdruck der aktivierten UPR nachweisbar sein sollte (Wang et al. 2015). Möglicherweise erfolgt die Aktivierung der UPR bei Verwendung von Tunicamycin nicht über den PERK-Signalweg, an dem eIF2 $\alpha$  beteiligt ist, sondern über einen der anderen Signalwege (IRE1 oder ATF6).

Gleichzeitig muss berücksichtigt werden, dass die Standardabweichungen insbesondere in den LNCaP-Zellen groß sind und das Experiment somit nur bedingt aussagekräftig ist. Zusammenfassend kann weder für KPL-1- noch für LNCaP-Zellen eine Assoziation zwischen der Expression des RAI2-Proteins und der verstärkten Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  gezeigt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass das RAI2-Protein wahrscheinlich keine Rolle in der Antwort auf ungefaltete Proteine spielt.

Zusammenfassend zeigt die Analyse der Expression der RAI2-Transkripte in KPL-1- und LNCaP-Zellen, dass es in Gegenwart von genotoxischem Zellstress durch Etoposid, Camptothecin und Olaparib dosisabhängig zu einer signifikanten Induktion der RAI2-Expression kommt. Daraus lässt sich eine Beteiligung von RAI2 im Rahmen von Zellstresswegen bei DNA-Schädigungen ableiten. Dass RAI2 bei der Verwendung genotoxischer Pharmaka hochreguliert wird, aber nicht eindeutig bei CDK-Inhibitoren, deutet darauf hin, dass RAI2 eine Rolle in einem der DNA-Reparaturwege oder in deren Regulation besitzt, nicht aber im Zellzyklus. Zu den potentiellen Signalwegen gehören im Falle von DSB die HRR und die NHEJ sowie bei ESB die BER. Die Untersuchung der Expression des RAI2-Proteins in KPL-1- und LNCaP-Zellen zeigt unter Behandlung mit genotoxischen Pharmaka ähnliche Expressionsmuster für die DNA-Schadensmarker bzw. Zellzyklusmarker p21, p53 und  $\gamma$ H2AX sowie für die relative Proteinexpression von RAI2. Demzufolge kann auf eine Funktion von RAI2 im Zellzyklus geschlossen werden bzw. auf eine Funktion im Rahmen der Reparaturprozesse bei DNA-Schäden. Die Exposition gegenüber Pharmaka, die andere Formen von Zellstress induzieren, zeigte in keiner der beiden Zelllinien eine signifikante RAI2-Expression. Daraus lässt sich ableiten, dass RAI2 vermutlich weder eine Rolle in der UPR, noch im Zusammenhang mit der Bildung von Paraspeckles, der NMD oder der Apoptose besitzt. Die Ergebnisse der Western Blot Analysen sind stimmig mit den Ergebnissen der *RAI2*-Gen-Expressions-Analyse. Dass RAI2 bei verschiedenen Formen von genotoxischem Zellstress induziert wird und nicht ausschließlich bei ESB bzw. DSB, könnte auf eine regulierende, übergeordnete und koordinative Funktion von RAI2 in diesen Signalwegen hindeuten. Diese Annahme kann durch Ergebnisse anderer Studien aus dem ITB gestützt werden: ein Verlust von RAI2

führt zu einer verminderten NHEJ-Kapazität sowie vermehrt zu DSB und zu einer verlängerten Mitose und Mikronuklei-Bildung (Böttcher 2019). Diese Komponenten tragen zur chromosomalen Instabilität in luminalen Brustkrebszellen bei. Eine Überexpression von RAI2 führt demgegenüber zu einer erhöhten Reparatur-Kapazität von DSB mittels HRR, was eine chromosomale Instabilität verhindert (Böttcher 2019). Dass RAI2 sowohl im Zusammenhang mit der NHEJ als auch mit der HRR reguliert wird, legt nahe, dass RAI2 eine übergeordnete Rolle in der DNA Schadensantwort besitzt und nicht speziell einem Signalweg zugeordnet werden kann (Böttcher 2019).

## **5.2 Relevanz von genotoxischem Zellstress für die Colokalisation von RAI2- und CtBP-positiven Speckles**

Diese Arbeit zeigt, dass sowohl die *RAI2*-Genexpression als auch die RAI2-Proteinexpression unter Behandlung mit genotoxischen Pharmaka signifikant ansteigt. Im Folgenden wurde untersucht, ob sich diese Beobachtung auch in der Bildung von Stress-assoziierten Speckles im Zellkern zeigt. Werner et al. identifizierten CtBP1 und CtBP2 als Bindungspartner des RAI2-Proteins und stellten in der Zelllinie MCF-7 eine Colokalisation von RAI2 und CtBP1 in nukleären Speckles fest (Werner et al. 2015). Um zu untersuchen, ob sich die Beobachtungen der MCF-7-Zellen auf eine andere hormonabhängige Mammakarzinom-Zelllinie übertragen lassen und ob es bei Zellstress zur Bildung von colokalisierten RAI2 und CtBP1 Speckles kommt, wurden KPL-1-Zellen mit Etoposid und Olaparib behandelt und RAI2 sowie CtBP1 mittels Immunfluoreszenz dargestellt. In KPL-1-Zellen mit RAI2 Überexpression zeigen sich sowohl in den unbehandelten Zellen als auch in den mit Etoposid und Olaparib behandelten Zellen RAI2- und CtBP1-positive Speckles. In KPL-1-Zellen mit RAI2-Überexpression einer CtBP-Bindungsmutation zeigten sich hingegen keine Speckles. Dies weist auf die Abhängigkeit der intakten RAI2/CtBP-Bindung für die Speckle-Bildung hin. Bei CtBP1 und CtBP2 handelt es sich um Corepressoren der Transkription, die im Zusammenhang mit malignen Tumoren an Zelldifferenzierung, Migrationsprozessen und der Epithelial-Mesenchymalen Transformation (EMT) beteiligt sind und deren Überexpression die Tumorentstehung und -progression begünstigt (Chinnadurai 2009, Blevins et al. 2017). Zudem besteht ein Zusammenhang zwischen CtBP und der DNA-

Schadensantwort, da CtBP1 auf BRCA1 negativ regulierend wirkt und BRCA Bestandteil der HRR ist (Helleday et al. 2007, Di et al. 2010). Aufgrund der Interaktion von RAI2 und CtBP sowie der Überschneidung der regulierten Gene vermuteten Werner et al. eine Rolle von RAI2 als Co-Transkriptionsregulator in der Erhaltung der Differenzierung von Mammakarzinomzellen (Werner et al. 2015). In einer anderen Arbeit wurde eine erhöhte Zahl von Speckles unter Behandlung mit Etoposid beobachtet und vermutet, dass RAI2 CtBP bei DNA-Schäden in Speckles bindet und so deren Funktion als Co-Repressor unterbindet, was die chromosomale Stabilität aufrecht erhält (Böttcher 2019). Darüber hinaus wäre die Untersuchung der Speckles in anderen Tumorzelllinien, beispielsweise in hormonabhängigen Prostatakarzinomzellen und Kolonkarzinom-Zelllinien interessant. Für letztere konnte RAI2 als Tumorsuppressor identifiziert werden (Yan et al. 2018).

### **5.3 Diskussion der Methoden**

In dieser Arbeit wurden Proliferationsanalysen mittels MTT-Assays, quantitative Echtzeit-PCR, Western Blots und Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Die Experimente wurden nach standardisierten Protokollen und unter möglichst konstanten Bedingungen durchgeführt. Die Aussagekraft der Experimente wird allerdings teilweise durch methodische Aspekte eingeschränkt, daher werden diese im Folgenden diskutiert.

Die Proliferationsanalyse von KPL-1- und LNCaP-Zellen unter Behandlung mit Zellstress-induzierenden Pharmaka zeigte deutliche Unterschiede hinsichtlich der Proliferation bzw. Toxizität in Abhängigkeit des eingesetzten Inhibitors sowie dessen Konzentration. Es ergaben sich Unterschiede in der Sensitivität der beiden Zelllinien gegenüber den Inhibitoren. Die IC<sub>50</sub> der Pharmaka wurde in den folgenden Untersuchungen der RAI2-Proteinexpression verwendet. Die sehr unterschiedliche Sensitivität der Zelllinien gegenüber verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren legt nahe, dass die Verwendung der IC<sub>50</sub> möglicherweise auch in der qPCR vorteilhaft wäre, um eine bessere Vergleichbarkeit herzustellen. Beispielhaft lässt sich hier die Reduktion der RAI2-Induktion bei der Behandlung von KPL-1-Zellen mit Camptothecin nennen, die möglicherweise durch eine zu hohe Toxizität aufgrund der

Behandlung mit Konzentrationen oberhalb der IC50 zu erklären ist. Eine Reduktion der RAI2-Transkripte in der qPCR könnte in diesem Zusammenhang Ausdruck einer massiv erniedrigten Zellzahl sein. Hohe Standardabweichungen lassen sich in diesem Zusammenhang möglicherweise als Ausdruck der massiv reduzierten Zellzahl interpretieren.

Western Blots ermöglichen qualitative und quantitative Aussagen über die Proteinexpression. Zu berücksichtigen ist, dass Western Blots zwar nach einem etablierten Protokoll durchgeführt werden, es aber zahlreiche Variablen in der Durchführung gibt, welche die Ergebnisse beeinflussen. Beispielsweise lassen sich an dieser Stelle die Bindung der primären und sekundären Antikörper nennen. Grundsätzlich handelt es sich allerdings um ein etabliertes Verfahren zur Detektion von Proteinen, das bei einer ausreichend hohen Stichprobenzahl (in dieser Arbeit  $n = 3$ ) eine statistische Auswertung der Ergebnisse ermöglicht. In dieser Arbeit wurde aufgrund insgesamt geringer Standardabweichungen der Students T-Test verwendet. Bei einer größeren Heterogenität der Ergebnisse, wie beispielsweise beim Marker pelf2 $\alpha$ , wäre eine statistische Auswertung mit nicht-parametrischen Tests eine mögliche Alternative. Bei den Proteinexpressionsanalysen mittels Western Blot ist zudem zu berücksichtigen, dass Literaturangaben zufolge Tunicamycin die UPR induzieren sollte, was sich in dieser Studie nicht zeigte (Wang et al. 2015). Aufgrund der teilweise hohen Standardabweichungen ist zudem von einer eingeschränkten Aussagekraft der Ergebnisse auszugehen. Es kann demnach nicht ausgeschlossen werden, dass RAI2 in der UPR eine Rolle spielt. Darüber hinaus ist die Regulation von Paraspeckles zu wenig untersucht, um einzig aufgrund der Expression der Paraspeckle-Marker NONO und PSPC1 eine Aussage über die Beteiligung von RAI2 an der Bildung von Paraspeckles zu treffen. Zur genaueren Untersuchung wäre an dieser Stelle eine Immunfluoreszenz zur Darstellung der fraglichen Colokalisation sinnvoll.

Die Immunfluoreszenz ermöglicht eine spezifische Analyse zellulärer Strukturen. In dieser Arbeit wurde die Methode verwendet, um die Colokalisation von RAI2- und CtBP1-Speckles zu untersuchen. In Folgeexperimenten wäre eine quantitative Analyse der Speckle-Anzahl unter

Behandlung mit genotoxischen Pharmaka sinnvoll, um den Effekt von genotoxischem Zellstress auf die Speckle-Bildung auch statistisch zu erfassen.

#### **5.4 Schlussfolgerungen und Ausblick**

Diese Arbeit zeigt, dass RAI2 in Mamma- und Prostatakarzinomzellen eine Rolle in der DNA-Schadensantwort bei genotoxischem Zellstress spielt. Unter genotoxischem Zellstress zeigte sich eine signifikante Induktion der Expression des *RAI2*-Gens sowie des RAI2-Proteins. Zudem korrelierte die verstärkte Expression des RAI2-Proteins mit dem Expressionsmuster der DNA-Schadensmarker bzw. Zellzyklusmarker p53 und p21 sowie  $\gamma$ H2AX. Außerdem zeigten sich unter genotoxischem Zellstress RAI2-/CtBP-positive Speckles, deren Zusammenhang mit zellulären Stressprozessen jedoch noch unzureichend untersucht ist.

RAI2 ist ein Suppressor der hämatogenen Metastasierung des Mammakarzinoms. Eine erniedrigte RAI2-Expression korreliert mit einer verkürzten Überlebenszeit bei Mamma-, Lungen- und Kolonkarzinomen sowie Ovarialtumoren (Werner et al. 2015). Vorherige Arbeiten des Institutes für Tumorbiologie zeigten eine Induktion von RAI2 unter Hormonentzug in hormonabhängigen Mammakarzinomzellen (Werner et al., unpubliziert). Neuere Ergebnisse identifizierten RAI2 inzwischen als Corepressor Steroid-regulierter Gene in Prostata- und Mammakarzinomzellen (Besler 2018) sowie als Tumorsuppressor beim kolorektalen Karzinom (Yan et al. 2018). In einer weiteren Arbeit konnte RAI2 als wichtige Komponente für die Erhaltung der genomischen Stabilität in Mammakarzinomzellen identifiziert werden, indem RAI2 die DNA-Schadensantwort fördert und somit potentiell die intratumorale Heterogenität vermindert (Böttcher 2019). Die Bedeutung der aus chromosomaler Instabilität resultierenden intratumoralen Heterogenität für die Tumorprogression wurde in den TRACERx Studien hervorgehoben (Jamal-Hanjani et al. 2017, Turajlic et al. 2018). Eine durch genomische Instabilität induzierte, intratumorale Heterogenität ist beim kleinzelligen Lungenkarzinom mit einem erhöhten Rezidiv- und Sterberisiko assoziiert und stellt demnach einen potentiellen prognostischen Marker dar (Jamal-Hanjani et al. 2017). Im Verlauf der Progression auftretende Treibermutationen sind in dieser

Tumorentität häufig auf eine hohe intratumorale Heterogenität zurückzuführen und betreffen auch Gene der DNA-Schadensantwort (Jamal-Hanjani et al. 2017). Auch bei der Progression des Nierenzellkarzinoms spielt die intratumorale Heterogenität eine wichtige Rolle: eine hohe Heterogenität geht hier mit einem graduellen Erwerb der Metastasierungskompetenz einher (Turajlic et al. 2018). Möglicherweise erklärt die Funktion von RAI2 in der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität die tumorsuppressive Wirkung von RAI2, indem die intratumorale Heterogenität vermindert wird (Böttcher 2019). Der genaue tumorsuppressive Wirkmechanismus von RAI2 ist jedoch aktuell unbekannt und es sind weitere Forschungsarbeiten notwendig, um den Wirkmechanismus von RAI2 zu verstehen und daraus Konsequenzen für RAI2 als Tumormarker oder für Krebstherapien abzuleiten.

Da sich diese Arbeit auf zwei hormonabhängige Tumorzelllinien beschränkt, wäre eine Analyse der RAI2-Expression in anderen Tumorentitäten interessant. Außerdem wäre eine detaillierte Analyse der einzelnen Signalwege bzw. derer Komponenten erforderlich, um die Funktion von RAI2 genauer zu untersuchen. Zudem bietet sich eine weitere Analyse der RAI2-/CtBP-positiven Speckles an, um deren potentielle Rolle in der DNA-Schadensantwort besser zu verstehen. An dieser Stelle bietet sich eine statistische Auswertung der Speckle-Anzahl nach der Behandlung mit genotoxischen Pharmaka an sowie die Färbung anderer Komponenten der Stresssignalwege, z. B. p53 und p21. Da CtBP mit Proteinen der HRR interagiert und demnach einen Bezug zur DNA-Schadensantwort besitzt, könnten auch die RAI2-/CtBP-positiven Speckles in diesem Zusammenhang eine Funktion besitzen (Helleday et al. 2007, Chinnadurai 2009, Di et al. 2010). Eine weitere Analyse der Funktion und Wirkmechanismen von RAI2 im Zusammenhang mit der DNA-Schadensantwort, chromosomaler Instabilität, hormonabhängigem Tumorwachstum und der Rolle von RAI2 als Tumorsuppressor ist für ein detailliertes Verständnis wichtig. Möglicherweise ermöglicht dies zukünftig den Einsatz von RAI2 als Tumormarker sowie die Identifikation von RAI2 als Target für spezifische Tumorthérapien.

## 6. Zusammenfassung

Mamma- und Prostatakarzinom sind die häufigsten geschlechtsspezifischen Krebserkrankungen in Deutschland und gehören jeweils zu den 10 häufigsten Krebstodesursachen. Zu den grundlegenden Eigenschaften von Krebserkrankungen zählen die Invasion und Metastasierung im Sinne einer Tumorprogression. Sie zählen daher zu den *Hallmarks of Cancer*. Begünstigt werden diese Prozesse durch in Krebszellen häufig beeinträchtigte DNA-Reparaturmechanismen, die zu einer verminderten genetischen Stabilität der Krebszellen beitragen. Krebszellen sind zudem erhöhtem zellulären Stress ausgesetzt. Dabei handelt es sich um einen potentiellen Ansatzpunkt zielgerichteter Tumortherapien wie der erfolgreiche Einsatz von PARP-Inhibitoren zeigt. Vorangegangene Studien der Arbeitsgruppe am Institut für Tumorbioogie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf zeigten, dass ein Zusammenhang zwischen Hypoxie und Hormonentzug in hormonabhängigen Mammakarzinomzellen und einer Induktion von Retinoic-acid induced 2 (RAI2) besteht. Dies legt eine Funktion von RAI2 in der zellulären Stressantwort nahe und somit eine potentielle Funktion als Zellstressmarker.

In dieser Arbeit wurde die Funktion des RAI2-Proteins in der zellulären Stressantwort untersucht. Für die Experimente wurden parentale Mammakarzinom- und Prostatakarzinomzelllinien verwendet. Es wurde der Einfluss verschiedener Zellstress-induzierender Substanzen auf die Gen- und Proteinexpression von RAI2 untersucht sowie die subzelluläre Lokalisation von RAI2. Im Rahmen dieser Arbeit kann ein Zusammenhang zwischen genotoxischem Zellstress und einer Induktion der RAI2-Expression auf Gen- sowie Proteinebene gezeigt werden. Es konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen anderen Zellstressmechanismen und RAI2 gezeigt werden. Die Analyse der subzellulären Lokalisation zeigt die Bildung von RAI2- und CtBP-positiven Speckles bei genotoxischem Zellstress.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass RAI2 in hormonsensitiven Mamma- und Prostatakarzinomzellen bei genotoxischem Zellstress eine Rolle in der DNA-Schadensantwort spielt.

## Summary

Breast cancer and prostate cancer are the most common gender-specific cancer entities in Germany and both of them are listed among the ten most frequent causes of cancer death. Invasion and metastasis are considered to be important factors in carcinogenesis and tumor progression. Therefore, they are also known as part of the *hallmarks of cancer*. Cancer cells often have reduced cell repair functions which leads to impaired genomic stability. Moreover, cancer cells are exposed to a high amount of cellular stress. Regarding targeted tumor therapy these factors are relevant targets as shown by the use of PARP-inhibitors in tumors with impaired base-excision-repair. Previous studies of the working group at the Institute of Tumor Biology at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf show an association between hypoxia and hormone-depletion and up-regulation of Retinoic acid-induced 2 (RAI2) in hormone-dependent breast cancer cells. This leads to the conclusion that RAI2 might play a role in the cellular stress response and thus may function as a marker for cellular stress.

This work analyses the function of RAI2 in the cellular stress response. For this purpose, a breast- and a prostate cancer cell line were used. This work analyses the effect of different cellular stress inducing substances on the RAI2 expression as well as the sub-cellular localisation of RAI2. The results demonstrate a correlation between genotoxic stress and RAI2 induction, both on transcript and on protein-level. There is no clear evidence for a correlation between other cellular stress response mechanisms and RAI2 expression. Analyses of RAI2 sub-cellular localisation show RAI2-/CtBP-positive speckle formation under conditions of genotoxic cellular stress.

In summary, the results show that RAI2 plays a role in hormone-dependent breast cancer and prostate cancer cell lines regarding the DNA damage response to DNA strand breaks.

## Literaturverzeichnis

Abbas, T. & Dutta, A. (2009) p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*, 9, 400-14.

Acosta-Alvear, D., Zhou, Y., Blais, A., Tsikitis, M., Lents, N. H., Arias, C., Lennon, C. J., Kluger, Y. & Dynlacht, B. D. (2007) XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol Cell*, 27, 53-66.

Adriaens, C., Standaert, L., Barra, J., Latil, M., Verfaillie, A., Kalev, P., Boeckx, B., Wijnhoven, P. W., Radaelli, E., Vermi, W., Leucci, E., Lapouge, G., Beck, B., Van Den Oord, J., Nakagawa, S., Hirose, T., Sablina, A. A., Lambrechts, D., Aerts, S., Blanpain, C. & Marine, J. C. (2016) p53 induces formation of NEAT1 lncRNA-containing paraspeckles that modulate replication stress response and chemosensitivity. *Nat Med*, 22, 861-8.

Antoniou, Antonis C., Casadei, Silvia, Heikkinen, Tuomas, Barrowdale, Daniel, Pylkäs, Katri, Roberts, Jonathan, Lee, Andrew, Subramanian, Deepak, De Leeneer, Kim, Fostira, Florentia, Tomiak, Eva, Neuhausen, Susan L., Teo, Zhi L., Khan, Sofia, Aittomäki, Kristiina, Moilanen, Jukka S., Turnbull, Clare, Seal, Sheila, Mannermaa, Arto, Kallioniemi, Anne, Lindeman, Geoffrey J., Buys, Sandra S., Andrulis, Irene L., Radice, Paolo, Tondini, Carlo, Manoukian, Siranoush, Toland, Amanda E., Miron, Penelope, Weitzel, Jeffrey N., Domchek, Susan M., Poppe, Bruce, Claes, Kathleen B.M., Yannoukakos, Drakoulis, Concannon, Patrick, Bernstein, Jonine L., James, Paul A., Easton, Douglas F., Goldgar, David E., Hopper, John L., Rahman, Nazneen, Peterlongo, Paolo, Nevanlinna, Heli, King, Mary-Claire, Couch, Fergus J., Southey, Melissa C., Winqvist, Robert, Foulkes, William D. & Tischkowitz, Marc (2014) Breast-Cancer Risk in Families with Mutations in PALB2. *New England Journal of Medicine*, 371, 497-506.

Bancroft, E. K., Page, E. C., Castro, E., Lilja, H., Vickers, A., Sjöberg, D., Assel, M., Foster, C. S., Mitchell, G., Drew, K., Maehle, L., Axcróna, K., Evans, D. G., Bulman, B., Eccles, D., McBride, D., Van Asperen, C., Vasen, H., Kiemeneij, L. A., Ringelberg, J., Cybulski, C., Wokolorczyk, D., Selkirk, C., Hulick, P. J., Bojesen, A., Skytte, A. B., Lam, J., Taylor, L., Oldenburg, R., Cremers, R., Verhaegh, G., Van Zelst-Stams, W. A., Oosterwijk, J. C., Blanco, I., Salinas, M., Cook, J., Rosario, D. J., Buys, S., Conner, T., Ausems, M. G., Ong, K. R., Hoffman, J., Domchek, S., Powers, J., Teixeira, M. R., Maia, S., Foulkes, W. D., Taherian, N., Ruijs, M., Helderma-Van Den Enden, A. T., Izatt, L., Davidson, R., Adank, M. A., Walker, L., Schmutzler, R., Tucker, K., Kirk, J., Hodgson, S., Harris, M., Douglas, F., Lindeman, G. J., Zgajnar, J., Tischkowitz, M., Clowes, V. E., Susman, R., Ramon Y Cajal, T., Patcher, N., Gadea, N., Spigelman, A., Van Os, T., Liljegren, A., Side, L., Brewer, C., Brady, A. F., Donaldson, A.,

Stefansdottir, V., Friedman, E., Chen-Shtoyerman, R., Amor, D. J., Copakova, L., Barwell, J., Giri, V. N., Murthy, V., Nicolai, N., Teo, S. H., Greenhalgh, L., Strom, S., Henderson, A., Mcgrath, J., Gallagher, D., Aaronson, N., Ardern-Jones, A., Bangma, C., Dearnaley, D., Costello, P., Eyfjord, J., Rothwell, J., Falconer, A., Gronberg, H., Hamdy, F. C., et al. (2014) Targeted prostate cancer screening in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the initial screening round of the IMPACT study. *Eur Urol*, 66, 489-99.

Beatson, G. T. (1899) On the Etiology of Cancer, with a Note of some Experiments. *Br Med J*, 1, 399-400.

Bell, K. J., Del Mar, C., Wright, G., Dickinson, J. & Glasziou, P. (2015) Prevalence of incidental prostate cancer: A systematic review of autopsy studies. *Int J Cancer*, 137, 1749-57.

Berman, A. T., Thukral, A. D., Hwang, W. T., Solin, L. J. & Vapiwala, N. (2013) Incidence and patterns of distant metastases for patients with early-stage breast cancer after breast conservation treatment. *Clin Breast Cancer*, 13, 88-94.

Bernardo, G. M., Lozada, K. L., Miedler, J. D., Harburg, G., Hewitt, S. C., Mosley, J. D., Godwin, A. K., Korach, K. S., Visvader, J. E., Kaestner, K. H., Abdul-Karim, F. W., Montano, M. M. & Keri, R. A. (2010) FOXA1 is an essential determinant of ER $\alpha$  expression and mammary ductal morphogenesis. *Development*, 137, 2045-54.

Besler, K., Weglarz, A., Zill, C., Jensen, J., Wikman, H., Pantel, K., Werner, S. (2018) Role of RAI2 protein in progression of breast and prostate cancer to hormone independent disease [abstract]. *Cancer Res*, 78.

Bidard, F. C., Vincent-Salomon, A., Gomme, S., Nos, C., De Rycke, Y., Thiery, J. P., Sigal-Zafrani, B., Mignot, L., Sastre-Garau, X., Pierga, J. Y. & Institut Curie Breast Cancer Study, Group (2008) Disseminated tumor cells of breast cancer patients: a strong prognostic factor for distant and local relapse. *Clin Cancer Res*, 14, 3306-11.

Blevins, M. A., Huang, M. & Zhao, R. (2017) The Role of CtBP1 in Oncogenic Processes and Its Potential as a Therapeutic Target. *Mol Cancer Ther*, 16, 981-990.

Bond, C. S. & Fox, A. H. (2009) Paraspeckles: nuclear bodies built on long noncoding RNA. *J Cell Biol*, 186, 637-44.

Böttcher, L. 2019. The role of RAI2 protein in the maintenance of genomic stability. Dissertation, Universität Hamburg.

Broeders, M., Moss, S., Nystrom, L., Njor, S., Jonsson, H., Paap, E., Massat, N., Duffy, S., Lynge, E., Paci, E. & Group, Euroscreen Working (2012) The

impact of mammographic screening on breast cancer mortality in Europe: a review of observational studies. *J Med Screen*, 19 Suppl 1, 14-25.

Brown, J. S., O'carrigan, B., Jackson, S. P. & Yap, T. A. (2017) Targeting DNA Repair in Cancer: Beyond PARP Inhibitors. *Cancer Discov*, 7, 20-37.

Bubendorf, L., Schöpfer, A., Wagner, U., Sauter, G., Moch, H., Willi, N., Gasser, T. C. & Mihatsch, M. J. (2000) Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Hum Pathol*, 31, 578-83.

Cammack, R., Atwood, T., Campbell, P., Parish, H., Smith, H., Vella, F., Stirling, J. (2006) *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology* [Online]. Online: Oxford University Press. Available: <https://www.oxfordreference.com/view/10.1093/acref/9780198529170.001.0001/acref-9780198529170?btog=chap&hide=true&page=423&pageSize=20&skipEditions=true&sort=titlesort&source=%2F10.1093%2Facref%2F9780198529170.001.0001%2Facref-9780198529170> [Abgerufen am 15.07.2020].

Chao, S. H., Fujinaga, K., Marion, J. E., Taube, R., Sausville, E. A., Senderowicz, A. M., Peterlin, B. M. & Price, D. H. (2000) Flavopiridol inhibits P-TEFb and blocks HIV-1 replication. *J Biol Chem*, 275, 28345-8.

Chen, X., Shen, J. & Prywes, R. (2002) The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem*, 277, 13045-52.

Chinnadurai, G. (2009) The transcriptional corepressor CtBP: a foe of multiple tumor suppressors. *Cancer Res*, 69, 731-4.

Chircop, M. & Speidel, D. (2014) Cellular stress responses in cancer and cancer therapy. *Front Oncol*, 4, 304.

Clarke, H. J., Chambers, J. E., Liniker, E. & Marciniak, S. J. (2014) Endoplasmic reticulum stress in malignancy. *Cancer Cell*, 25, 563-73.

Clemens, M. J., Bushell, M. & Morley, S. J. (1998) Degradation of eukaryotic polypeptide chain initiation factor (eIF) 4G in response to induction of apoptosis in human lymphoma cell lines. *Oncogene*, 17, 2921-31.

Cubillos-Ruiz, J. R., Bettigole, S. E. & Glimcher, L. H. (2017) Tumorigenic and Immunosuppressive Effects of Endoplasmic Reticulum Stress in Cancer. *Cell*, 168, 692-706.

Curtin, Nicola J. (2012) DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nature Reviews Cancer*, 12, 801.

Daugaard, M., Rohde, M. & Jaattela, M. (2007) The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett*, 581, 3702-10.

David, S. S., O'shea, V. L. & Kundu, S. (2007) Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*, 447, 941-50.

Del Rivero, J. & Kohn, E. C. (2017) PARP Inhibitors: The Cornerstone of DNA Repair-Targeted Therapies. *Oncology (Williston Park)*, 31, 265-73.

Di, L. J., Byun, J. S., Wong, M. M., Wakano, C., Taylor, T., Bilke, S., Baek, S., Hunter, K., Yang, H., Lee, M., Zvosec, C., Khramtsova, G., Cheng, F., Perou, C. M., Miller, C. R., Raab, R., Olopade, O. I. & Gardner, K. (2013) Genome-wide profiles of CtBP link metabolism with genome stability and epithelial reprogramming in breast cancer. *Nat Commun*, 4, 1449.

Di, L. J., Fernandez, A. G., De Siervi, A., Longo, D. L. & Gardner, K. (2010) Transcriptional regulation of BRCA1 expression by a metabolic switch. *Nat Struct Mol Biol*, 17, 1406-13.

Elmore, S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, 495-516.

Epstein, J. I., Egevad, L., Amin, M. B., Delahunt, B., Srigley, J. R. & Humphrey, P. A. (2016) The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol*, 40, 244-52.

Farmer, H., McCabe, N., Lord, C. J., Tutt, A. N., Johnson, D. A., Richardson, T. B., Santarosa, M., Dillon, K. J., Hickson, I., Knights, C., Martin, N. M., Jackson, S. P., Smith, G. C. & Ashworth, A. (2005) Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, 434, 917-21.

Fda (2017) *FDA approves maintenance treatment for recurrent epithelial ovarian, fallopian tube or primary peritoneal cancers* [Online]. Online. Available: <https://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm548948.htm> [Abgerufen am 12.04.2018].

Fda (2018) *FDA approves olaparib for germline BRCA-mutated metastatic breast cancer* [Online]. Available: <https://www.fda.gov/drugs/informationondrugs/approveddrugs/ucm592357.htm> [Abgerufen am 21.4.2018].

Fox, A. H., Bond, C. S. & Lamond, A. I. (2005) P54nrb forms a heterodimer with PSP1 that localizes to paraspeckles in an RNA-dependent manner. *Mol Biol Cell*, 16, 5304-15.

Fox, A. H., Lam, Y. W., Leung, A. K., Lyon, C. E., Andersen, J., Mann, M. & Lamond, A. I. (2002) Paraspeckles: a novel nuclear domain. *Curr Biol*, 12, 13-25.

- Fox, A. H. & Lamond, A. I. (2010) Paraspeckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a000687.
- Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O. & Samali, A. (2010) Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol*, 2010, 214074.
- Furuta, T., Takemura, H., Liao, Z. Y., Aune, G. J., Redon, C., Sedelnikova, O. A., Pilch, D. R., Rogakou, E. P., Celeste, A., Chen, H. T., Nussenzweig, A., Aladjem, M. I., Bonner, W. M. & Pommier, Y. (2003) Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem*, 278, 20303-12.
- Gleason, D. F. (1966) Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep*, 50, 125-8.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- Helleday, T., Lo, J., Van Gent, D. C. & Engelward, B. P. (2007) DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)*, 6, 923-35.
- Hetz, C. & Papa, F. R. (2018) The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol Cell*, 69, 169-181.
- Hetz, Claudio (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, 89-102.
- Holbrook, J. A., Neu-Yilik, G., Hentze, M. W. & Kulozik, A. E. (2004) Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat Genet*, 36, 801-8.
- Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Chu, T. M., Wajsman, Z. L., Friedman, M., Papsidero, L., Kim, U., Chai, L. S., Kakati, S., Arya, S. K. & Sandberg, A. A. (1980) The LNCaP cell line—a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog Clin Biol Res*, 37, 115-32.
- Humphrey, P. A. (2004) Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol*, 17, 292-306.
- Jamal-Hanjani, M., Wilson, G. A., Mcgranahan, N., Birkbak, N. J., Watkins, T. B. K., Veeriah, S., Shafi, S., Johnson, D. H., Mitter, R., Rosenthal, R., Salm, M., Horswell, S., Escudero, M., Matthews, N., Rowan, A., Chambers, T., Moore, D. A., Turajlic, S., Xu, H., Lee, S. M., Forster, M. D., Ahmad, T., Hiley, C. T., Abbosh, C., Falzon, M., Borg, E., Marafioti, T., Lawrence, D., Hayward, M.,

Kolvekar, S., Panagiotopoulos, N., Janes, S. M., Thakrar, R., Ahmed, A., Blackhall, F., Summers, Y., Shah, R., Joseph, L., Quinn, A. M., Crosbie, P. A., Naidu, B., Middleton, G., Langman, G., Trotter, S., Nicolson, M., Remmen, H., Kerr, K., Chetty, M., Gomersall, L., Fennell, D. A., Nakas, A., Rathinam, S., Anand, G., Khan, S., Russell, P., Ezhil, V., Ismail, B., Irvin-Sellers, M., Prakash, V., Lester, J. F., Kornaszewska, M., Attanoos, R., Adams, H., Davies, H., Dentre, S., Taniere, P., O'sullivan, B., Lowe, H. L., Hartley, J. A., Iles, N., Bell, H., Ngai, Y., Shaw, J. A., Herrero, J., Szallasi, Z., Schwarz, R. F., Stewart, A., Quezada, S. A., Le Quesne, J., Van Loo, P., Dive, C., Hackshaw, A., Swanton, C. & Consortium, T. Racex (2017) Tracking the Evolution of Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 376, 2109-2121.

Jiang, P., Ray, A., Rybak, L. P. & Brenner, M. J. (2016) Role of STAT1 and Oxidative Stress in Gentamicin-Induced Hair Cell Death in Organ of Corti. *Otol Neurotol*, 37, 1449-56.

Jiricny, J. (2006) The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 335-46.

Johns, L. E. & Houlston, R. S. (2003) A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. *BJU Int*, 91, 789-94.

Kandoth, C., McLellan, M. D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J. F., Wyczalkowski, M. A., Leiserson, M. D. M., Miller, C. A., Welch, J. S., Walter, M. J., Wendl, M. C., Ley, T. J., Wilson, R. K., Raphael, B. J. & Ding, L. (2013) Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, 502, 333-339.

Kang, Y. & Pantel, K. (2013) Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer Cell*, 23, 573-81.

Karimian, A., Ahmadi, Y. & Yousefi, B. (2016) Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair (Amst)*, 42, 63-71.

Kast, K., Rhiem, K., Wappenschmidt, B., Hahnen, E., Hauke, J., Bluemcke, B., Zarghooni, V., Herold, N., Ditsch, N., Kiechle, M., Braun, M., Fischer, C., Dikow, N., Schott, S., Rahner, N., Niederacher, D., Fehm, T., Gehrig, A., Mueller-Reible, C., Arnold, N., Maass, N., Borck, G., De Gregorio, N., Scholz, C., Auber, B., Varon-Manteeva, R., Speiser, D., Horvath, J., Lichey, N., Wimberger, P., Stark, S., Faust, U., Weber, B. H., Emons, G., Zachariae, S., Meindl, A., Schmutzler, R. K. & Engel, C. (2016) Prevalence of BRCA1/2 germline mutations in 21 401 families with breast and ovarian cancer. *J Med Genet*, 53, 465-71.

- Katsogiannou, M., Ziouziou, H., Karaki, S., Andrieu, C., Henry De Villeneuve, M. & Rocchi, P. (2015) The hallmarks of castration-resistant prostate cancers. *Cancer Treat Rev*, 41, 588-97.
- King, M. C., Marks, J. H., Mandell, J. B. & New York Breast Cancer Study, Group (2003) Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*, 302, 643-6.
- Klaunig, J. E. (2018) Oxidative Stress and Cancer. *Curr Pharm Des*, 24, 4771-4778.
- Kopnin, B. P. (2000) Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc)*, 65, 2-27.
- Kouros-Mehr, H., Slorach, E. M., Sternlicht, M. D. & Werb, Z. (2006) GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland. *Cell*, 127, 1041-55.
- Krokan, H. E. & Bjoras, M. (2013) Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a012583.
- Kumar, A., Rajendran, V., Sethumadhavan, R. & Purohit, R. (2013) AKT kinase pathway: a leading target in cancer research. *ScientificWorldJournal*, 2013, 756134.
- Kurebayashi, J., Kurosumi, M. & Sonoo, H. (1995) A new human breast cancer cell line, KPL-1 secretes tumour-associated antigens and grows rapidly in female athymic nude mice. *Br J Cancer*, 71, 845-53.
- Lane, D. P. (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358, 15-6.
- Langlands, F. E., Horgan, K., Dodwell, D. D. & Smith, L. (2013) Breast cancer subtypes: response to radiotherapy and potential radiosensitisation. *Br J Radiol*, 86, 20120601.
- Lee, E. Y. & Muller, W. J. (2010) Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a003236.
- Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K. & Kaufman, R. J. (2002) IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev*, 16, 452-66.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) (2019a) Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Version 5.1, AWMF Registernummer: 043/022OL [Online].

Online: AWMF online. Available: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/043-022OLI\\_S3\\_Prostatakarzinom\\_2019-06.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/043-022OLI_S3_Prostatakarzinom_2019-06.pdf) [Abgerufen am 15.07.2020].

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, Awmf) (2019b) *S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1, AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL* [Online]. Online: AWMF online. Available: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/021-007OLI\\_S3\\_Kolorektales-Karzinom-KRK\\_2019-01.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021-007OLI_S3_Kolorektales-Karzinom-KRK_2019-01.pdf) [Abgerufen am 22.08.2020].

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, Awmf) (2020a) *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.3, AWMF Registernummer: 032-045OL* [Online]. Online: AWMF online. Available: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/> [Abgerufen am 15.07.2020].

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, Awmf) (2020b) *S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Keimzelltumoren des Hodens* [Online]. Online: AWMF online. Available: [https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user\\_upload/Downloads/Leitlinien/Hodentumoren/LL\\_Hodentumoren\\_Langversion\\_1.1.pdf](https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Hodentumoren/LL_Hodentumoren_Langversion_1.1.pdf) [Abgerufen am 15.07.2020].

Leitlinienprogramm Onkologie Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, Awmf (2018a) *S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren* [Online]. Online: AWMF online. Available: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/032-035OLI\\_S3\\_KF\\_Ovarialkarzinom\\_2018-11.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-035OLI_S3_KF_Ovarialkarzinom_2018-11.pdf) [Abgerufen am 10.07.2020].

Leitlinienprogramm Onkologie Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, Awmf (2018b) *S3-Leitlinie Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms* [Online]. Online: AWMF online. Available: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/020-007OL\\_I\\_S3\\_Lungenkarzinom\\_2018-03.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/020-007OL_I_S3_Lungenkarzinom_2018-03.pdf) [Abgerufen am 20.07.2020].

Leitlinienprogramm Onkologie Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, Awmf (2019) *S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Hodgkin Lymphoms bei erwachsenen Patienten* [Online]. Online: AWMF online. Available: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/018-029OLI\\_S3\\_Hodgkin-Lymphom\\_Erwachsene\\_Diagnostik\\_Therapie\\_Nachsorge\\_2019-05.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/018-029OLI_S3_Hodgkin-Lymphom_Erwachsene_Diagnostik_Therapie_Nachsorge_2019-05.pdf) [Abgerufen am 20.07.2020].

Lieber, M. R. (2010) The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem*, 79, 181-211.

- Linde, L., Boelz, S., Nissim-Rafinia, M., Oren, Y. S., Wilschanski, M., Yaacov, Y., Virgilis, D., Neu-Yilik, G., Kulozik, A. E., Kerem, E. & Kerem, B. (2007) Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin. *J Clin Invest*, 117, 683-92.
- Lord, C. J. & Ashworth, A. (2012) The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*, 481, 287-94.
- Lord, C. J. & Ashworth, A. (2017) PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science*, 355, 1152-1158.
- Luo, G., Lu, Y., Jin, K., Cheng, H., Guo, M., Liu, Z., Long, J., Liu, C., Ni, Q. & Yu, X. (2015) Pancreatic cancer: BRCA mutation and personalized treatment. *Expert Rev Anticancer Ther*, 15, 1223-31.
- Maquat, L. E. (2004) Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 89-99.
- Maucher, V. (2020) *Etoposid* [Online]. Gelbe Liste online: Medizinische Medien Informations GmbH. Available: [https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Etoposid\\_738](https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Etoposid_738) [Abgerufen am 10.08.2020].
- Mcquiston, A. & Diehl, J. A. (2017) Recent insights into PERK-dependent signaling from the stressed endoplasmic reticulum. *F1000Res*, 6, 1897.
- Mello, S. S., Sinow, C., Raj, N., Mazur, P. K., Biegging-Rolett, K., Broz, D. K., Imam, J. F. C., Vogel, H., Wood, L. D., Sage, J., Hirose, T., Nakagawa, S., Rinn, J. & Attardi, L. D. (2017) Neat1 is a p53-inducible lincRNA essential for transformation suppression. *Genes Dev*, 31, 1095-1108.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., Ding, W. & Et Al. (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266, 66-71.
- Montecucco, A., Zanetta, F. & Biamonti, G. (2015) Molecular mechanisms of etoposide. *EXCLI J*, 14, 95-108.
- Nakagawa, S., Yamazaki, T. & Hirose, T. (2018) Molecular dissection of nuclear paraspeckles: towards understanding the emerging world of the RNP milieu. *Open Biol*, 8.
- Ncbi (2020) *Heat shock protein family A (Hsp70) member 8* [Online]. Online: NCBI. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3312> [Abgerufen am 30.08.2020].
- Negrini, S., Gorgoulis, V. G. & Halazonetis, T. D. (2010) Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 220-8.

- Nesic, K., Wakefield, M., Kondrashova, O., Scott, C. L. & Mcneish, I. A. (2017) Targeting DNA repair: the genome as a potential biomarker. *J Pathol*.
- Nickoloff, J. A., Jones, D., Lee, S. H., Williamson, E. A. & Hromas, R. (2017) Drugging the Cancers Addicted to DNA Repair. *J Natl Cancer Inst*, 109.
- Nijman, S. M. (2011) Synthetic lethality: general principles, utility and detection using genetic screens in human cells. *FEBS Lett*, 585, 1-6.
- O'Connor, Mark J (2015) Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Molecular Cell*, 60, 547-560.
- Ojha, R. & Amaravadi, R. K. (2017) Targeting the unfolded protein response in cancer. *Pharmacol Res*, 120, 258-266.
- Pflaum, J., Schlosser, S. & Muller, M. (2014) p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front Oncol*, 4, 285.
- Pubchem (2020a) *PubChem Compound Summary for CID 3467, Gentamicin* [Online]. Online: National Center for Biotechnology Information. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gentamicin> [Abgerufen am 10.08.2020].
- Pubchem (2020b) *PubChem Compound Summary for CID 6197, Cycloheximide* [Online]. Online: National Center for Biotechnology Information. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cycloheximide> [Abgerufen am 10.08.2020].
- Pubchem (2020c) *PubChem Compound Summary for CID 24360, Camptothecin* [Online]. Online: National Center for Biotechnology Information. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Camptothecin> [Abgerufen am 10.08.2020].
- Pubchem (2020d) *PubChem Compound Summary for CID 11104835, Tunicamycin V* [Online]. Online: National Center for Biotechnology Information. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tunicamycin-V> [Abgerufen am 10.08.2020].
- Rahbar, H., Partridge, S. C., Javid, S. H. & Lehman, C. D. (2012) Imaging axillary lymph nodes in patients with newly diagnosed breast cancer. *Curr Probl Diagn Radiol*, 41, 149-58.
- Renovanz, M. & Kim, E. L. (2014) Intratumoral heterogeneity, its contribution to therapy resistance and methodological caveats to assessment. *Front Oncol*, 4, 142.
- Rich, T., Allen, R. L. & Wyllie, A. H. (2000) Defying death after DNA damage. *Nature*, 407, 777-83.

Robert Koch-Institut, Gesellschaft Der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland E.V. (2019) *Krebs in Deutschland 2015/2016* [Online]. Berlin. Available: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2019/krebs\\_in\\_deutschland\\_2019.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/krebs_in_deutschland_2019.pdf?__blob=publicationFile) [Abgerufen am 20.10.2020].

Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C. & Bonner, W. M. (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol*, 146, 905-16.

Ron, D. & Walter, P. (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 519-29.

Roy, R., Chun, J. & Powell, S. N. (2011) BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer*, 12, 68-78.

Sabharwal, S. S. & Schumacker, P. T. (2014) Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat Rev Cancer*, 14, 709-21.

Saisomboon, S., Kariya, R., Vaeteewoottacharn, K., Wongkham, S., Sawanyawisuth, K. & Okada, S. (2019) Antitumor effects of flavopiridol, a cyclin-dependent kinase inhibitor, on human cholangiocarcinoma in vitro and in an in vivo xenograft model. *Heliyon*, 5, e01675.

Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D. E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W. C., Green, R., Shen, B. & Liu, J. O. (2010) Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat Chem Biol*, 6, 209-217.

Sedlacek, H. H. (2001) Mechanisms of action of flavopiridol. *Crit Rev Oncol Hematol*, 38, 139-70.

Sharma, A., Singh, K. & Almasan, A. (2012) Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. *Methods Mol Biol*, 920, 613-26.

Shen, X., Zhang, K. & Kaufman, R. J. (2004) The unfolded protein response--a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J Chem Neuroanat*, 28, 79-92.

Sisinni, L., Pietrafesa, M., Lepore, S., Maddalena, F., Condelli, V., Esposito, F. & Landriscina, M. (2019) Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Breast Cancer: The Balance between Apoptosis and Autophagy and Its Role in Drug Resistance. *Int J Mol Sci*, 20.

Storm, M., Sheng, X., Arnoldussen, Y. J. & Saatcioglu, F. (2016) Prostate cancer and the unfolded protein response. *Oncotarget*, 7, 54051-54066.

Szostakowska, M., Trebinska-Stryjewska, A., Grzybowska, E. A. & Fabisiowicz, A. (2019) Resistance to endocrine therapy in breast cancer: molecular mechanisms and future goals. *Breast Cancer Res Treat*, 173, 489-497.

Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A. & Takeda, S. (1998) Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J*, 17, 5497-508.

Tubbs, A. & Nussenzweig, A. (2017) Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell*, 168, 644-656.

Turajlic, S., Xu, H., Litchfield, K., Rowan, A., Chambers, T., Lopez, J. I., Nicol, D., O'Brien, T., Larkin, J., Horswell, S., Stares, M., Au, L., Jamal-Hanjani, M., Challacombe, B., Chandra, A., Hazell, S., Eichler-Jonsson, C., Soultati, A., Chowdhury, S., Rudman, S., Lynch, J., Fernando, A., Stamp, G., Nye, E., Jabbar, F., Spain, L., Lall, S., Guarch, R., Falzon, M., Proctor, I., Pickering, L., Gore, M., Watkins, T. B. K., Ward, S., Stewart, A., Dinatale, R., Becerra, M. F., Reznik, E., Hsieh, J. J., Richmond, T. A., Mayhew, G. F., Hill, S. M., McNally, C. D., Jones, C., Rosenbaum, H., Stanislaw, S., Burgess, D. L., Alexander, N. R., Swanton, C., Peace & Consortium, T. Racerx Renal (2018) Tracking Cancer Evolution Reveals Constrained Routes to Metastases: TRACERx Renal. *Cell*, 173, 581-594 e12.

Ulm, M., Ramesh, A. V., Mcnamara, K. M., Ponnusamy, S., Sasano, H. & Narayanan, R. (2019) Therapeutic advances in hormone-dependent cancers: focus on prostate, breast and ovarian cancers. *Endocr Connect*, 8, R10-R26.

Vandewynckel, Y. P., Laukens, D., Geerts, A., Bogaerts, E., Paridaens, A., Verhelst, X., Janssens, S., Heindryckx, F. & Van Vlierberghe, H. (2013) The paradox of the unfolded protein response in cancer. *Anticancer Res*, 33, 4683-94.

Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A. J. (2000) Surfing the p53 network. *Nature*, 408, 307-10.

Wang, H., Wang, X., Ke, Z. J., Comer, A. L., Xu, M., Frank, J. A., Zhang, Z., Shi, X. & Luo, J. (2015) Tunicamycin-induced unfolded protein response in the developing mouse brain. *Toxicol Appl Pharmacol*, 283, 157-67.

Wang, M. & Kaufman, R. J. (2014) The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat Rev Cancer*, 14, 581-97.

Wang, M. & Kaufman, R. J. (2016) Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature*, 529, 326-35.

Wang, M., Law, M. E., Castellano, R. K. & Law, B. K. (2018a) The unfolded protein response as a target for anticancer therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol*, 127, 66-79.

Wang, Y., Hu, S. B., Wang, M. R., Yao, R. W., Wu, D., Yang, L. & Chen, L. L. (2018b) Genome-wide screening of NEAT1 regulators reveals cross-regulation between paraspeckles and mitochondria. *Nat Cell Biol*, 20, 1145-1158.

Wegelin, O., Van Melick, H. H. E., Hooft, L., Bosch, Jhr, Reitsma, H. B., Barentsz, J. O. & Somford, D. M. (2017) Comparing Three Different Techniques for Magnetic Resonance Imaging-targeted Prostate Biopsies: A Systematic Review of In-bore versus Magnetic Resonance Imaging-transrectal Ultrasound fusion versus Cognitive Registration. Is There a Preferred Technique? *Eur Urol*, 71, 517-531.

Werner, S., Brors, B., Eick, J., Marques, E., Pogenberg, V., Parret, A., Kemming, D., Wood, A. W., Edgren, H., Neubauer, H., Streichert, T., Riethdorf, S., Bedi, U., Baccelli, I., Jücker, M., Eils, R., Fehm, T., Trumpp, A., Johnsen, S. A., Klefström, J., Wilmanns, M., Müller, V., Pantel, K. & Wikman, H. (2015) Suppression of early hematogenous dissemination of human breast cancer cells to bone marrow by retinoic Acid-induced 2. *Cancer Discov*, 5, 506-19.

West, J. A., Mito, M., Kurosaka, S., Takumi, T., Tanegashima, C., Chujo, T., Yanaka, K., Kingston, R. E., Hirose, T., Bond, C., Fox, A. & Nakagawa, S. (2016) Structural, super-resolution microscopy analysis of paraspeckle nuclear body organization. *J Cell Biol*, 214, 817-30.

Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C. & Micklem, G. (1995) Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*, 378, 789-92.

Wörmann, B. (2014) Krebsfrüherkennung in Deutschland 2014. Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO).

Yan, W., Wu, K., Herman, J. G., Xu, X., Yang, Y., Dai, G. & Guo, M. (2018) Retinoic acid-induced 2 (RAI2) is a novel tumor suppressor, and promoter region methylation of RAI2 is a poor prognostic marker in colorectal cancer. *Clin Epigenetics*, 10, 69.

Yanagitani, K., Imagawa, Y., Iwawaki, T., Hosoda, A., Saito, M., Kimata, Y. & Kohno, K. (2009) Cotranslational targeting of XBP1 protein to the membrane promotes cytoplasmic splicing of its own mRNA. *Mol Cell*, 34, 191-200.

Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. & Mori, K. (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 107, 881-91.

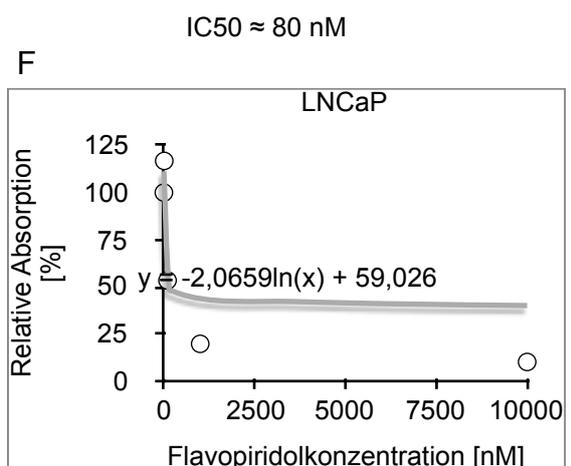
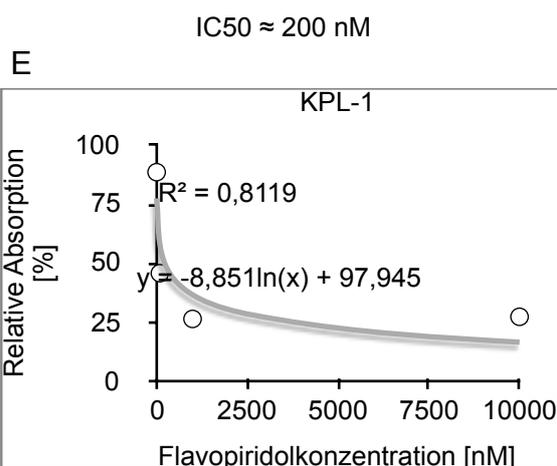
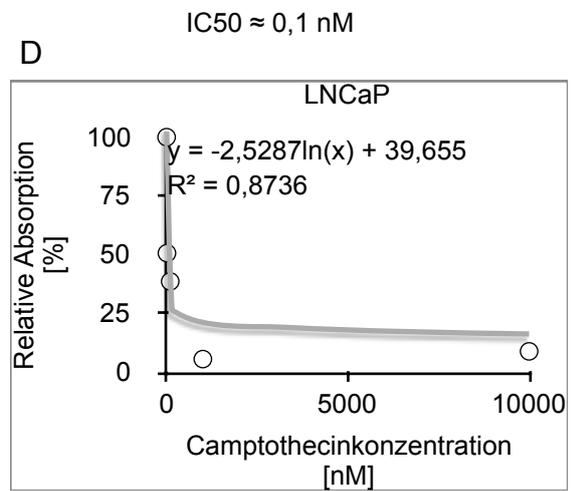
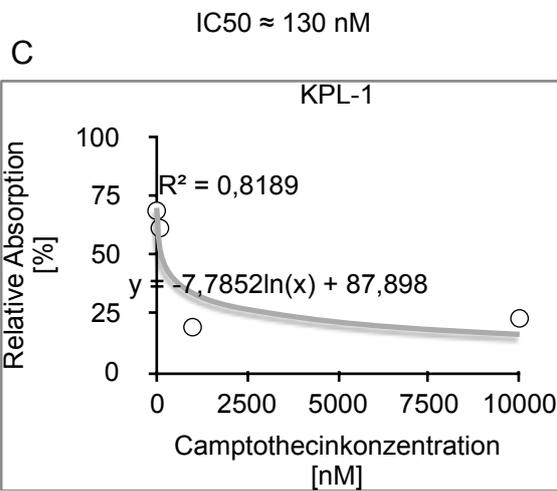
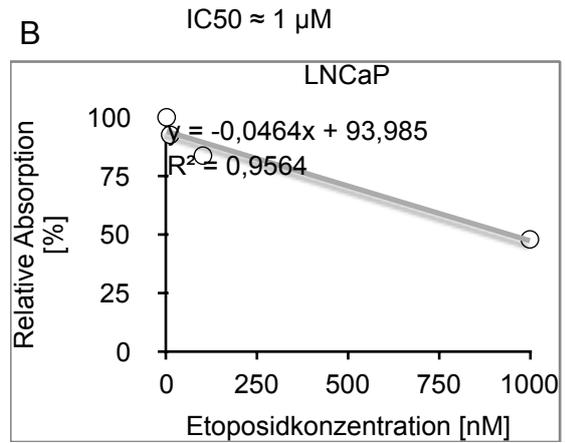
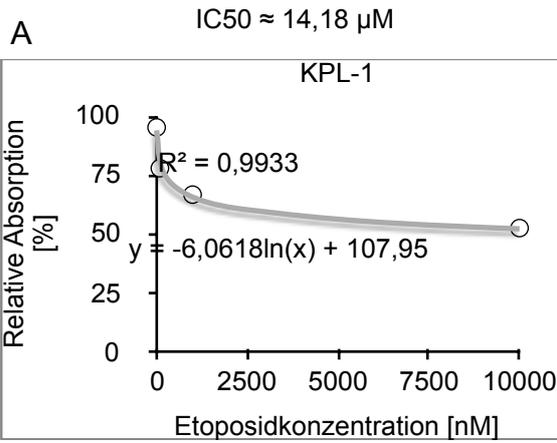
Yuan, J., Adamski, R. & Chen, J. (2010) Focus on histone variant H2AX: to be or not to be. *FEBS Lett*, 584, 3717-24.

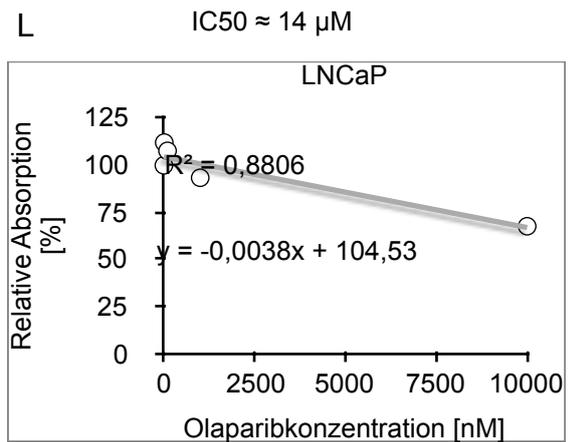
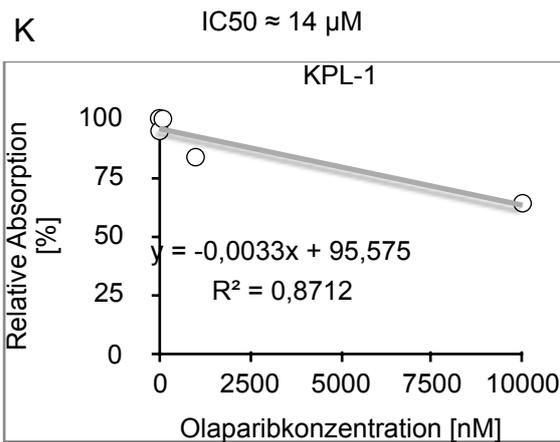
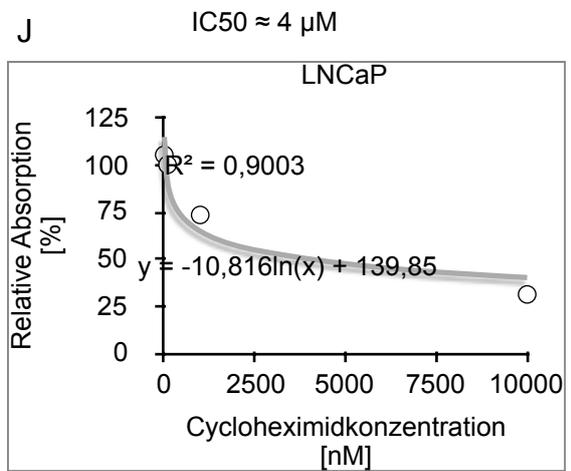
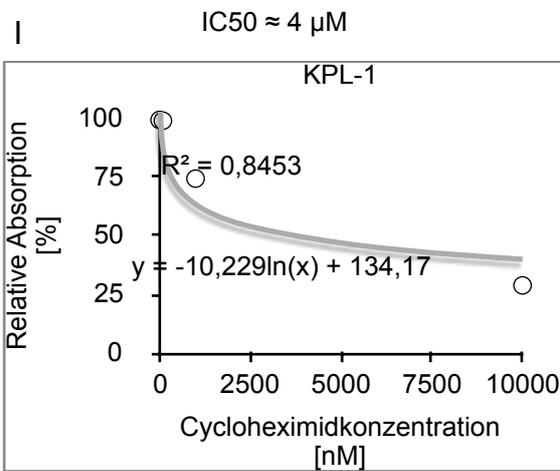
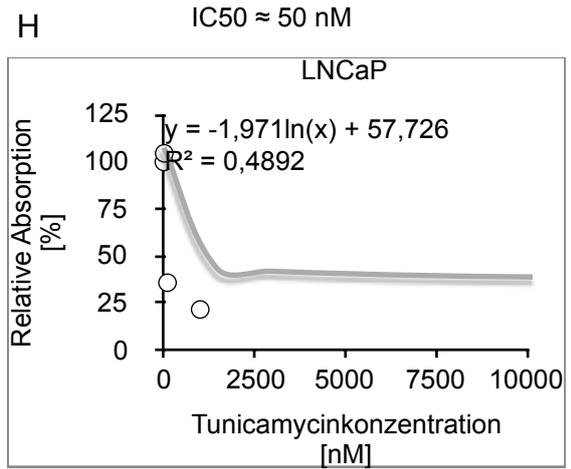
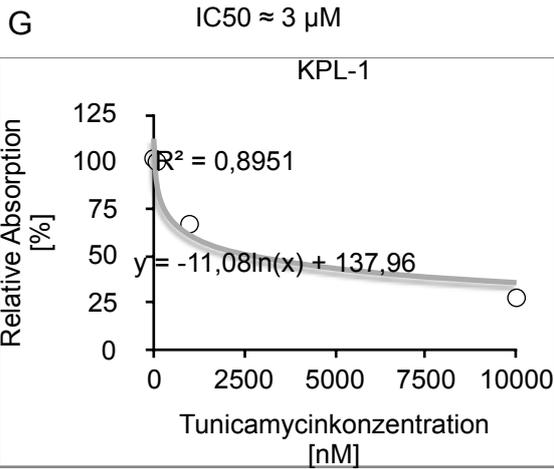
Zeegers, M. P., Jellema, A. & Ostrer, H. (2003) Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma: a meta-analysis. *Cancer*, 97, 1894-903.

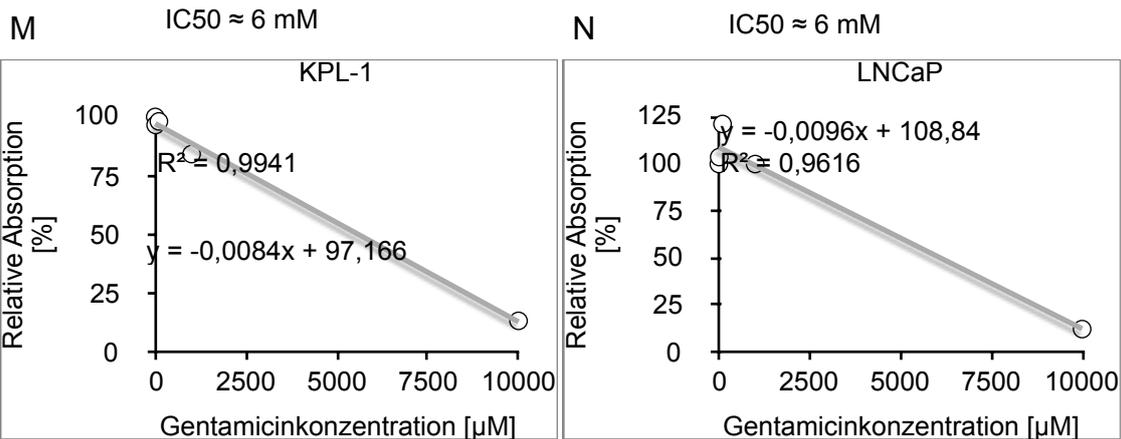
Zhao, X., Wei, C., Li, J., Xing, P., Li, J., Zheng, S. & Chen, X. (2017) Cell cycle-dependent control of homologous recombination. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 49, 655-668.

Zilfou, J. T. & Lowe, S. W. (2009) Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1, a001883.

# Anhang

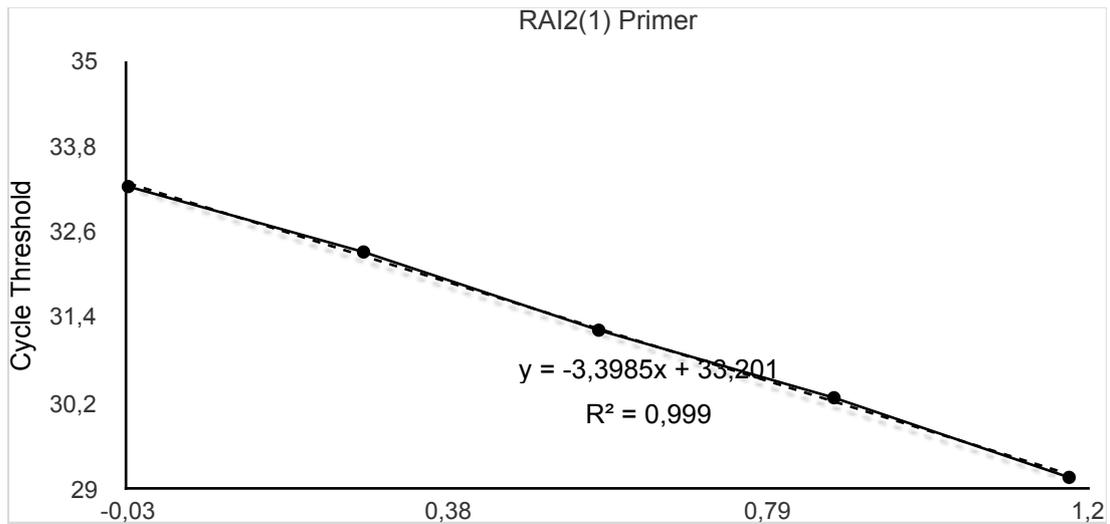
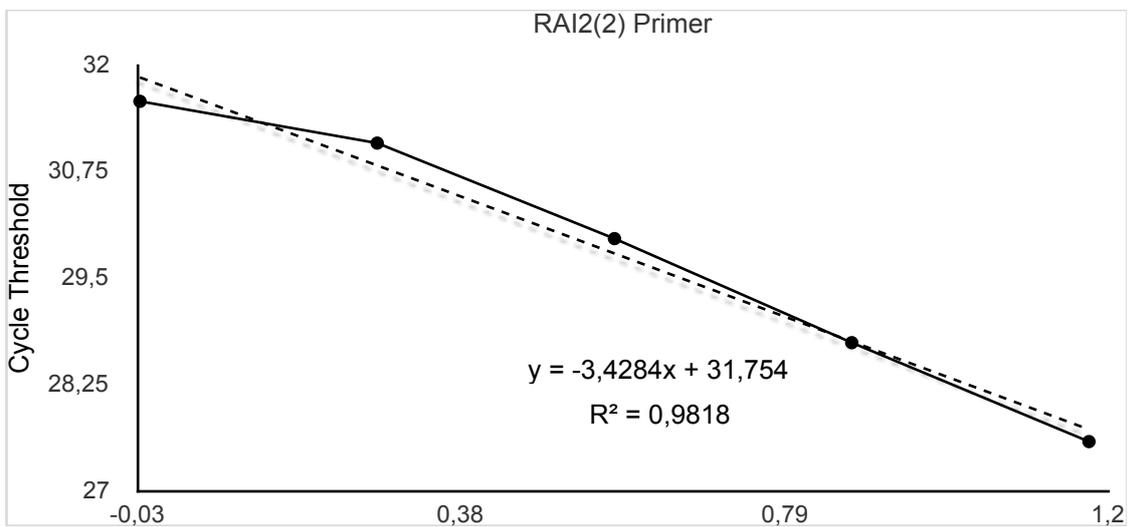






**Abbildung A1: Funktionsgleichungen zur Beschreibung der Proliferation von KPL-1- und LNCaP-Zellen bei Behandlung mit Pharmaka sowie daraus berechnete IC50.**

Proliferation bei Behandlung mit Etoposid von KPL-1 (A) und LNCaP (B), bei Behandlung mit Camptothecin von KPL-1 (C) und LNCaP (D), bei Behandlung mit Flavopiridol von KPL-1 (E) und LNCaP (F), bei Behandlung mit Tunicamycin von KPL-1 (G) und LNCaP (H), bei Behandlung mit Cycloheximid von KPL-1 (I) und LNCaP (J), bei Behandlung mit Olaparib von KPL-1 (K) und LNCaP (L) und bei Behandlung mit Gentamicin von KPL-1 (M) und LNCaP (N). Zur Berechnung der IC50 wurde die mittlere relative Absorption gegenüber der jeweils eingesetzten Konzentration aufgetragen und mit Excel eine Regressionsanalyse durchgeführt. Bestimmung der IC50 als x bei y = 50. Der Korrelationskoeffizient  $R^2$  wurde als Gütemaß für die Korrelation bestimmt.

**A****B**

**Abbildung A2: Standardkurven der Primer RAI2(1) (A) und RAI2(2) (B) bei 60,1°C.**

Die Effizienzbestimmung erfolgte mittels qPCR für zwei die RAI2-Primerpaare RAI2(1) und RAI2(2) bei 60,1 °C. Für die Auswahl eines effizienten Primers wurde die Cycle Threshold gegenüber der logarithmisch auf der x-Achse dargestellten Verdünnungsreihe eines cDNA-Templates von 1000 ng aufgetragen. Primer RAI2(1) zeigt mit  $R^2 = 0,999$  eine höhere Effizienz als der Primer RAI2(2) mit  $R^2 = 0,9818$ .

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben. An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Harriet Wikman-Kocher und Dr. Stefan Werner bedanken, die mich während der Doktorarbeit betreut haben und mir die Mitarbeit an diesem interessanten Thema ermöglicht haben. Vielen herzlichen Dank für die Betreuung und Unterstützung! Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Pantel für die Möglichkeit bedanken, am Institut für Tumorbologie meine Doktorarbeit zu verfassen. Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei allen aus dem Team der AG Wikman bedanken, die mich bei Fragen und Schwierigkeiten immer tatkräftig unterstützt haben. An dieser Stelle möchte ich mich vor allem bei Lena, Katharina, Svenja und Jolanthe bedanken. Auch beim gesamten Tumorbologie-Team möchte ich mich für die hilfreiche Unterstützung in allen technischen und wissenschaftlichen Fragen bedanken. Besonderes bedanken möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern, die mich während meines Studiums und der Doktorarbeit unterstützt haben.

## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.



### **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....