

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Klinikum Großhadern

Direktor: Prof. Dr. med. Jens Werner



**Einfluss adrenergen Signallings auf die Tumorprogression des  
kolorektalen Karzinoms - eine grundwissenschaftliche Untersuchung**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Niklas Josef Amann

aus Weißenburg i. Bay.

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Bernhard Renz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Frank Kolligs

Prof. Dr. Dr. Manfred Gross

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 03.02.2022

Für Mama und Papa

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
<b>1.1. KOLOREKTALES KARZINOM</b>	<b>8</b>
1.1.1. EPIDEMIOLOGIE	8
1.1.2. RISIKOFAKTOREN	11
1.1.3. RISIKOGRUPPEN	11
1.1.4. KRAS	12
1.1.5. MIKROSATELLITENINSTABILITÄT	13
<b>1.2. SYMPATHISCHES NERVENSYSTEM</b>	<b>13</b>
1.2.1. SIGNALWEGE DES SYMPATHISCHEN NERVENSYSTEMS	13
1.2.2. BIOSYNTHESE DER KATECHOLAMINE	14
1.2.3. ADRENERGE REZEPTOREN	14
1.2.4. REGULATION DER TUMORMIKROUMGEBUNG (TUMORMICROENVIRONMENT = TME)	16
1.2.5. REGULATION DES TUMORWACHSTUMS	17
<b>1.3. RETROSPEKTIV KLINISCHE DATEN IM KRK</b>	<b>19</b>
<b>2. ANSATZ UND ZIELSETZUNG</b>	<b>21</b>
<b>3. METHODEN</b>	<b>23</b>
<b>3.1. ZELLKULTUR</b>	<b>23</b>
3.1.1. KOLOREKTALE KARZINOMZELLINIEN (KRK ZELLINIEN)	23
3.1.2. KULTIVIERUNG	24
3.1.3. PASSAGIERUNG	24
3.1.4. ZELLZÄHLUNG	25
3.1.5. KRYOKONSERVIERUNG	25
<b>3.2. EZ4U</b>	<b>25</b>
3.2.1. EZ4U UNTER STANDARDBEDINGUNGEN	26
3.2.2. ISOPROTERENOL-APPLIKATION IM EZ4U	26
3.2.3. $\alpha$ -BLOCKER- UND $\beta$ -BLOCKER-APPLIKATION IM EZ4U	27
<b>3.3. REAL-TIME-PCR</b>	<b>27</b>
3.3.1. HERSTELLUNG DER RNA	27
3.3.2. CDNA-SYNTHEISIERUNG	28
3.3.3. REAL-TIME-PCR	29
<b>3.4. WESTERN BLOT</b>	<b>30</b>
3.4.1. BCA-BESTIMMUNG	30
3.4.2. WESTERNBLOT	32
<b>3.5. ZELLYKLUS-ANALYSE</b>	<b>34</b>



3.5.1. ANLEGEN DER ZELLKULTUR	34
3.5.2. ZELLYKLUS-ANALYSE	34
<b>3.6. STAMMZELLMARKER-ANALYSE</b>	<b>35</b>
3.6.1. ANLEGEN DER ZELLKULTUR	35
3.6.2. STAMMZELLMARKER-ANALYSE	35
<b>3.7. IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS ADRENERGER <math>\beta</math>-REZEPTOREN</b>	<b>36</b>
3.7.1. SCHNITTE	36
3.7.2. HERSTELLUNG DER PUFFERLÖSUNGEN	36
3.7.3. ENTPARAFFINIERUNG	36
3.7.4. ANTIGEN-RETRIEVAL	36
3.7.5. IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG	37
3.7.6. GEGENFÄRBUNG	37
<b>3.8. STATISTISCHE AUSWERTUNG</b>	<b>37</b>
<b><u>4. ERGEBNISSE</u></b>	<b><u>38</u></b>
4.1. VIABILITÄTSZUNAHME UNTER ISO-BEHANDLUNG	38
4.2. EINFLUSS DER ADRENERGEN STIMULATION AUF DIE ZELLYKLUSPHASEN	39
4.3. NACHWEIS DER EXPRESSION ADRENERGER $\beta$ -REZEPTOREN AUF RNA-, PROTEIN- UND IMMUNHISTOCHEMISCHER EBENE	40
4.4. EXPRESSION ADRENERGER $\alpha$ -REZEPTOREN AUF RNA-EBENE	44
4.5. ADRENERGE $\beta$ -REZEPTORBLOCKADE UNABHÄNGIG EINER MSI	45
4.6. ADRENERGE $\alpha$ -REZEPTORBLOCKADE ABHÄNGIG EINER MSI	47
4.7. SIGNIFIKANTE ZUNAHME DER KREBSSTAMMZELLPOPULATION IN MSI KRK ZELLLINIEN UNTER ISO-BEHANDLUNG	49
<b><u>5. DISKUSSION</u></b>	<b><u>51</u></b>
5.1. SENSITIVITÄT DER KRK ZELLLINIEN GEGENÜBER $\beta$ -BLOCKERN UNABHÄNGIG DES KRAS-MUTATIONSSTATUS	51
5.2. MSI ZELLLINIEN SIND GEGENÜBER ADRENERGER $\alpha$ -REZEPTORBLOCKADE SENSITIV	54
5.3. SIGNIFIKANTE ZUNAHME DER KREBSSTAMMZELLPOPULATION IN MSI KRK ZELLLINIEN UNTER ISO-BEHANDLUNG	55
5.4. ANSÄTZE ZU WEITEREN GRUNDWISSENSCHAFTLICHEN UND KLINISCHEN STUDIEN	57
<b><u>6. ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b><u>59</u></b>
<b><u>7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>61</u></b>
<b><u>8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>65</u></b>

<b><u>9.</u></b>	<b><u>TABELLENVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>66</u></b>
<b><u>10.</u></b>	<b><u>QUELLENVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>67</u></b>
<b><u>11.</u></b>	<b><u>MATERIAL</u></b>	<b><u>75</u></b>
11.1.	LABORMATERIAL	75
11.2.	ZELLKULTUR	77
11.3.	EZ4U-VIABILITÄTSTTEST	77
11.4.	REAL-TIME-PCR	78
11.5.	WESTERNBLOT	78
11.6.	ZELLZYKLUS-ANALYSE	80
11.7.	STAMMZELLMARKER-ANALYSE	80
11.8.	IMMUNHISTOCHEMIE	80
<b><u>12.</u></b>	<b><u>DANKSAGUNG</u></b>	<b><u>82</u></b>
<b><u>13.</u></b>	<b><u>EIDESSTAATLICHE VERSICHERUNG</u></b>	<b><u>83</u></b>
<b><u>14.</u></b>	<b><u>LEBENS LAUF</u></b>	<b><u>FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</u></b>

## 1. EINLEITUNG

Krebserkrankungen sind eine der häufigsten Erkrankungen und Todesursachen in der westlichen Welt. Insbesondere die malignen kolorektalen Neoplasien machen einen großen Anteil der bösartigen Erkrankungen aus [Koch-Institut, 2017]. Neben somatischen Faktoren könnten auch Faktoren, wie psychosozialer Stress, eine Rolle in der Krebsentstehung und Progression spielen. In Grundlagenstudien im Zell- und Mausmodell konnten dazu mögliche molekulare Mechanismen u.a. im Pankreas-, Ovarial- und Prostatakarzinom identifiziert werden [Renz et al., 2018; Hassan et al., 2013; Thaker et al., 2006].

Stress führt beim Menschen u.a. zur Aktivierung des sympathischen Nervensystems, die katecholaminerge Biosynthese wird induziert [Rassow et al., 2016]. In chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks und Zellen neuronalen Ursprungs werden Adrenalin und Noradrenalin synthetisiert [Rassow et al., 2016]. Über postganglionäre sympathische Nervenenden werden die beiden Neurotransmitter sezerniert und modulieren die Zielzellen über adrenerge  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren [Rassow et al., 2016]. Dadurch werden konsekutiv intrazelluläre Signalwege beeinflusst. Im Rahmen der Immunmodulation können so z.B. sowohl Signalwege stimuliert als auch inhibiert werden [Wang et al., 2020]. Die Expression antiviraler Immunantworten über z.B. Interferon 1 wird gehemmt, hingegen die Expression proinflammatorischer Immunantworten, die über Interleukin  $1\beta$  oder TNF- $\alpha$  gesteuert werden, gefördert [Irwin et al., 2011]. Im Bereich des Herz-Kreislaufsystems führt eine adrenerge Stimulation zu Tachykardie und Vasokonstriktion. Bei chronischem Stress könnte dies langfristig z.B. zu einem arteriellen Hypertonus beitragen, der durch  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Blocker behandelt werden kann. Die adrenerge Wirkung wird dadurch an den jeweiligen Rezeptoren aufgehoben, der Blutdruck gesenkt und Langzeitfolgen können damit potenziell verhindert werden.

Neben der Aktivierung des sympathoadrenergen Systems induziert eine chronische Stressreaktion die Stimulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindendachse mit langanhaltend hoher Cortisolsekretion [Rassow et al., 2016]. Beide Mechanismen begünstigen die Bereitstellung von Energiespeichern [McEwen et al., 2002]. Lipolytische Prozesse werden durch

eine Aktivierung der Proteinkinase A ebenso stimuliert wie die gesteigerte Glykogenolyse mittels cAMP-abhängiger Phosphorylierung der Glykogen-Phosphorylase [Rassow et al., 2016]. Dadurch wird auch die, für das Zellwachstum nötige Energie zur Verfügung gestellt.

Das im Speziellen für die Kanzerogenese charakteristische Tumorwachstum wird u.a. durch Protoonkogene und Tumorsuppressorgene hervorgerufen [Rassow et al., 2016; Hanahan et al., 2011]. Bereits in prämaligen Stadien werden Protoonkogene durch Mutation zu Onkogenen, Tumorsuppressorgene werden hingegen inaktiviert [Rassow et al., 2016; Hanahan et al., 2011]. Onkogene wie RAS, RAF oder MYC hemmen die Apoptose und stimulieren Wachstumssignalkaskaden [Hanahan et al., 2011; Collado et al., 2010; Lowe et al., 2004]. Somit besteht ein dauerhafter Wachstumsreiz der Zellen [Antoni et al., 2006]. In der jüngeren Vergangenheit verdichten sich die Hinweise, dass in dem multifaktoriellen Vorgang der Tumorentstehung, chronischer Stress bestimmte Malignome wie das Pankreas- oder Ovarialkarzinom als potenter Akkzelerator der Tumorgenese fungieren könnte [Renz et al., 2018; Thaker et al., 2006].

In einer retrospektiven Arbeit von Jansen et al., 2014 wurde der Einfluss von  $\beta$ -Blockern auf das Gesamtüberleben bei kolorektalen Karzinomen (KRK) untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Überleben bei Patient\*innen im UICC Stadium IV, die unabhängig von der Tumorthherapie eine  $\beta$ -Blocker-Therapie erhielten, signifikant besser war [Jansen et al., 2014]. Im Vergleich zu keiner im Vorfeld erfolgten  $\beta$ -Blocker-Therapie war die mediane Gesamtüberlebenszeit dieser Patient\*innen 18 Monate länger, KRK-spezifisch 17 Monate (mediane Überlebenszeit 38 bzw 37 Monate vs. 20 Monate). Dies lässt vermuten, dass  $\beta$ -Blocker ebenfalls einen Einfluss auf die Proliferation des KRK haben könnten [Jansen et al., 2014].

## 1.1. Kolorektales Karzinom

### *1.1.1. Epidemiologie*

Das KRK zählt zu den häufigsten Krebsentitäten in Deutschland [Koch-Institut, 2017]. Mit 13,4% ist Darmkrebs bei Männern 2014 an dritter Stelle der häufigsten Tumorneuerkrankungen in Deutschland, bei Frauen mit 12,6% sogar an zweiter Stelle [Koch-Institut, 2017]. Ähnlich verhält es sich auch bei der Mortalität. 11,5%

aller männlichen Krebstodesfälle und 12,1 % aller weiblichen Krebstodesfälle betreffen den Dickdarm. Damit ist KRK die zweithäufigste Krebstodesursache bei Männern und bei Frauen die dritthäufigste [Koch-Institut, 2017]. In absoluten Zahlen gesprochen erkrankten 2014 61000 Menschen neu an einem KRK [Koch-Institut, 2017]. 27890 davon waren weiblich [Koch-Institut, 2017].

Verglichen zu den Werten des statistischen Bundesamt aus 2003 ist die Inzidenz der Rektum- und linksseitigen Kolonkarzinome (Kolon sigmoideum/Kolon descendens) gesunken. Keine Veränderungen fanden sich bei den rechtsseitigen Kolonkarzinomen (Kolon ascendens) [Barnes et al., 2016]. Für das Jahr 2020 wurde ein weiterer Rückgang der Inzidenz auf knapp 58100 prognostiziert [Barnes et al., 2016].

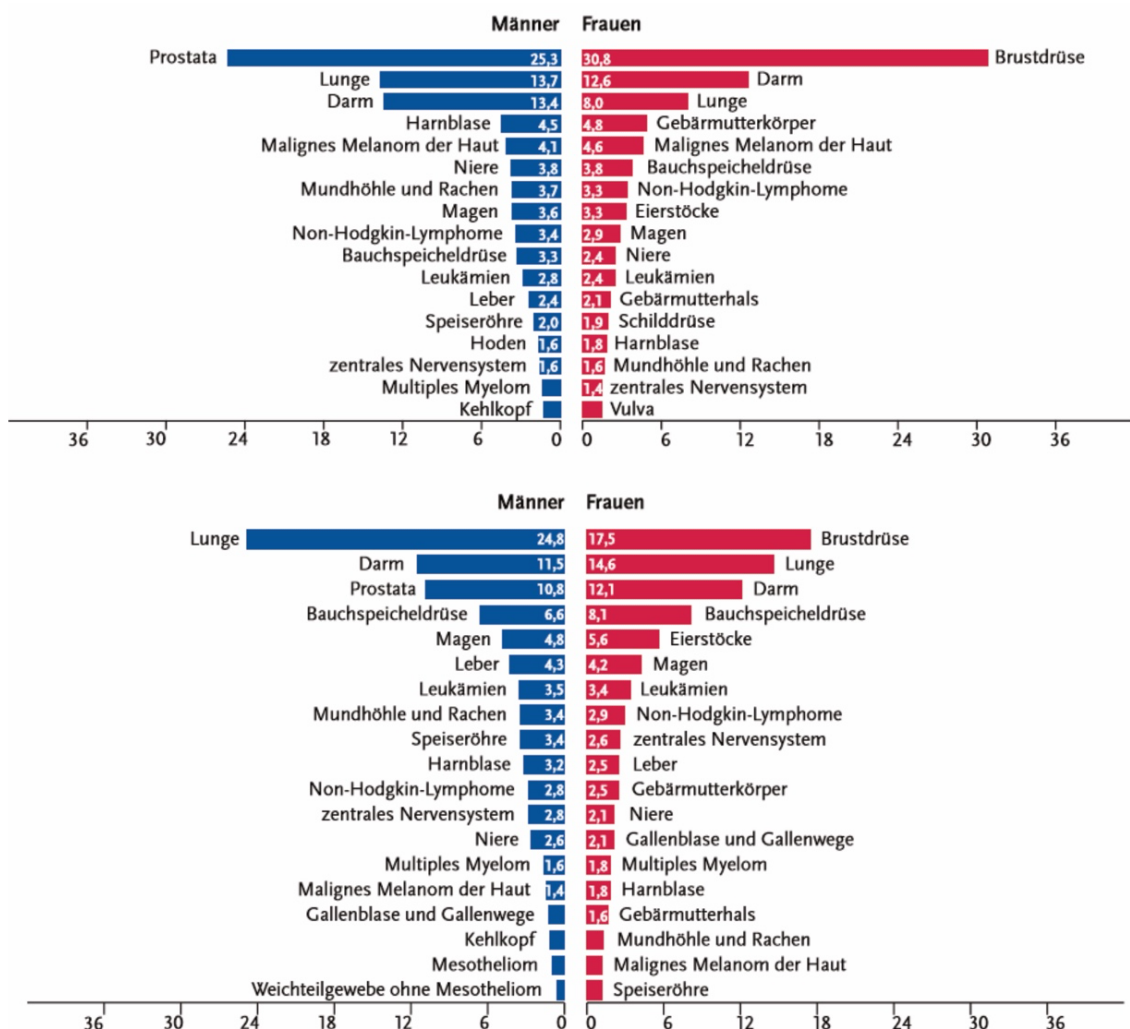


Abbildung 1 - aus Koch-Institut, R. (2017). Krebs in Deutschland für 2014, Robert Koch-Institut: a) Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2014. b) Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2014.

Die Zahlen dazu werden im neuen Krebsreport des Robert-Koch-Instituts in 2022 veröffentlicht. Das Robert-Koch-Institut macht für den Rückgang vor allem Vorsorgeuntersuchungen, wie Koloskopien, verantwortlich [Barnes et al., 2016]. Seit Oktober 2002 steht jeder Person in Deutschland ab dem 55. Lebensjahr gesetzlich eine Koloskopie zur Früherkennung eines kolorektalen Karzinoms zu. Besonders ab diesem Alter zeigen sich die Zahlen als rückläufig [Barnes et al., 2016]. Auch im internationalen Vergleich unterstreichen die Zahlen aus Deutschland den Nutzen der KRK-Vorsorge. Länder, in denen teilweise keine Primärprävention wie Koloskopien durchgeführt wird, hatten keinen Rückgang der Inzidenzen zu verzeichnen [Barnes et al, 2016].

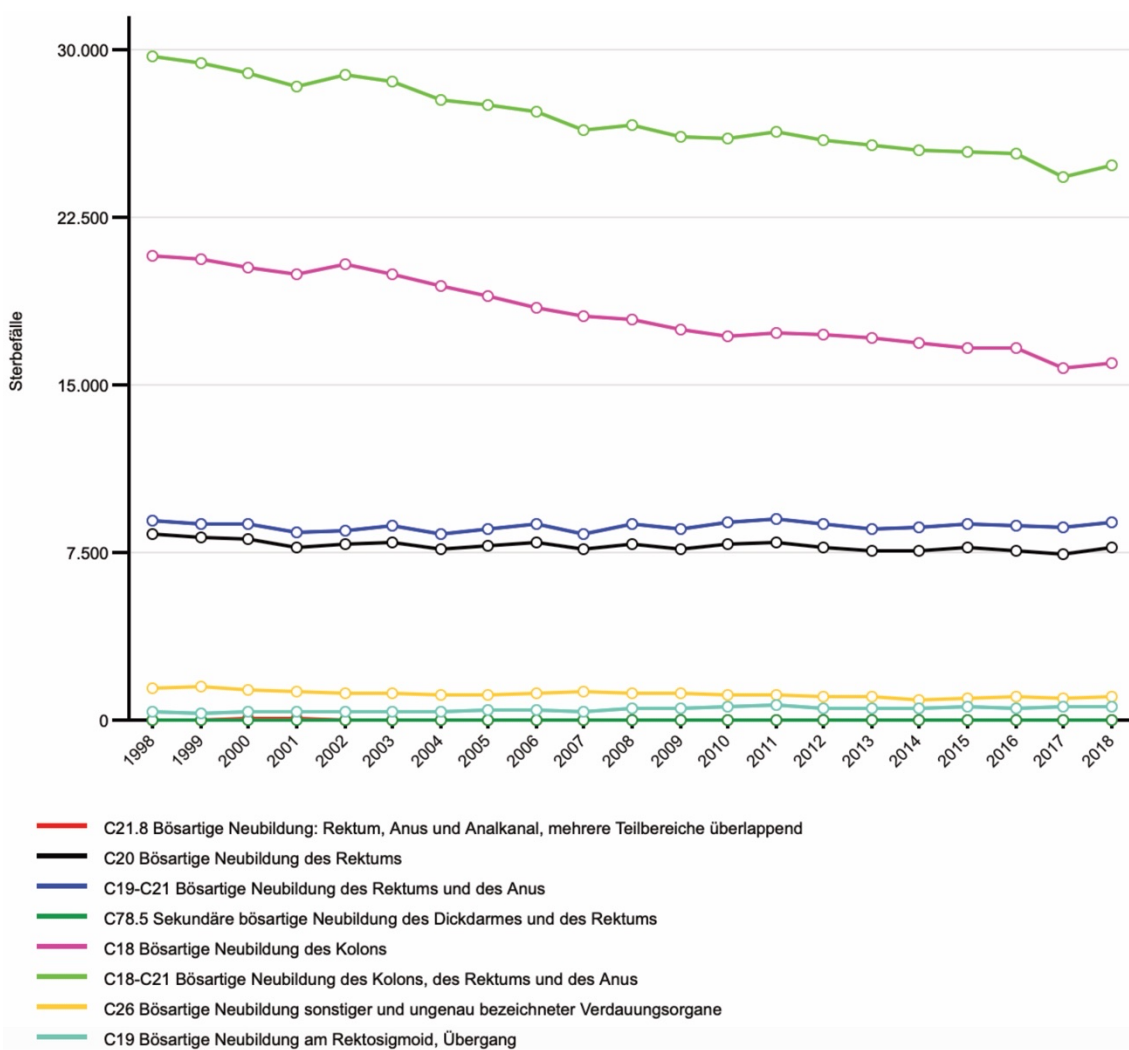


Abbildung 2 - Sterbefälle Dickdarmkrebs aufgeteilt nach Lokalität je 100.000 Einwohner von 1998 bis 2018. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. [www.gbe-bund.de](http://www.gbe-bund.de). Zuletzt aufgerufen am 31.01.2021.

Die Mortalität ist seit 1998 ebenfalls gesunken. Starben im Jahr 1998 noch 29694 Einwohner in Deutschland an einer bösartigen Neubildung des Dickdarmes oder Mastdarmes, waren es 2018 24805 Menschen [Statistisches Bundesamt].

Die Prävalenz stieg dementsprechend weiter an. Die abnehmende Sterberate von Darmkrebs, die damit einhergehenden verbesserten Überlebenschancen und der steigende Anteil einer alternden Bevölkerung im Rahmen des demographischen Wandels tragen dazu bei [Barnes et al., 2016; Koch-Institut, 2010].

### *1.1.2. Risikofaktoren*

Das Risiko an einem KRK zu erkranken korreliert mit mehreren Faktoren. Nicht nur Rauchen, Alkohol und Bewegungsmangel gehen mit einem gesichert erhöhten Risiko an Darmkrebs zu erkranken einher [Aleksandrova et al, 2014; Fedirko et al, 2011]. Auch der Verzehr von ballaststoffarmen Nahrungsmitteln und rotem Fleisch erhöhen das Risiko, an einem KRK zu erkranken [Bouvard et al., 2015; Miller et al., 2010].

### *1.1.3. Risikogruppen*

#### *1.1.3.1. Sporadisches kolorektales Karzinom*

20-30% der Fälle des sporadischen KRK treten familiär gehäuft auf [S3-Leitlinie Darmkrebs 2019; Jasperson et al., 2010; Fuchs et al., 1994]. Die Erkrankung tritt vermehrt in einer Familie auf, eine konkrete genetische Ursache ist jedoch im Gegensatz zu den hereditären Formen nicht feststellbar [S3-Leitlinie Darmkrebs 2019; Jasperson et al., 2010]. Deshalb spricht man auch in diesen Fällen des KRK von einem sporadischen familiären KRK [Jasperson et al., 2010]. Verwandte ersten Grades besitzen ein zwei- bis dreifach erhöhtes Risiko an Dickdarmkrebs zu erkranken als Personen aus nicht betroffenen Familien [Fuchs et al., 1994; Andrieu et al., 2004].

#### *1.1.3.2. Hereditäres kolorektales Karzinom*

Hereditär auftretende Entitäten des kolorektalen Karzinoms werden in mehrere Gruppen unterteilt. Die häufigsten Formen sind das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC/Lynch-Syndrom) und die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP).

Das HNPCC/Lynch-Syndrom gehört zu den erblichen Tumorsyndromen. Werden anamnestisch bei dem/der betroffenen Patient\*in bzw. Familie die sog.

revidierten Bethesda-Kriterien erfüllt, soll eine weitere Abklärung hinsichtlich einer möglichen Mutation im Mismatch-Repair-System (siehe Kapitel 1.1.5. Mikrosatelliteninstabilität) erfolgen [S3-Leitlinie Darmkrebs 2019]. Liegt eine pathogene Mutation vor, spricht man vom Lynch-Syndrom [S3-Leitlinie Darmkrebs 2019]. Es besteht dabei ein 50-70% Lebenszeitrisiko, an einem KRK zu erkranken [S3-Leitlinie Darmkrebs 2019].

Zu adenomatösen Polyposis Syndromen zählt neben der FAP auch die MUTYH-assoziierte Polyposis (MAP). Die FAP als autosomal-dominant vererbte Erkrankung ist durch eine Mutation im APC-Gen gekennzeichnet. Daraus folgt ein starkes Wachstum adenomatöser Polypen, mehr als 100 im Darmtrakt sind keine Seltenheit [S3-Leitlinie Darmkrebs 2019]. Die Inzidenz für ein KRK liegt bei nahezu 100%. Die MAP hingegen ist die einzige autosomal-rezessiv vererbte Krankheit. Sie geht mit einem KRK-Lebenszeitrisiko von 79-80% einher [S3-Leitlinie Darmkrebs 2019].

Ein erhöhtes Risiko besteht auch bei den nicht-adenomatösen Polyposis-Syndromen [S3-Leitlinie Darmkrebs 2019]. Darunter fallen unter anderem die hamartomatösen Polyposis-Syndrome, wie das Peutz-Jeghers-Syndrom oder auch das hyperplastische Polyposis-Syndrom [Aretz et al., 2010].

#### *1.1.3.3. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen*

Colitis ulcerosa geht mit einem erhöhtem Risiko einher, an einem KRK zu erkranken [Renz et al, 2013; Ekbohm et al., 1990; Greenstein et al., 1981]. Dies trifft auch für Morbus Crohn zu [Renz et al., 2013; Larsen et al., 2007; Greenstein et al., 1981]. Das Risiko bei Colitis ulcerosa ist jedoch im Vergleich beider Morbiditäten größer [Renz et al., 2013; Greenstein et al., 1981].

#### *1.1.4. KRAS*

KRAS ist ein Protoonkogen [Waters et al., 2018]. Protoonkogene sind Gene, die u.a. durch Mutationen im Promotorbereich oder chromosomale Translokationen in Onkogene umgewandelt werden können [Todd et al., 1999]. Diese stimulieren wiederum durch eine unregulierte Signaltransduktion das Zellwachstum. In inaktivem Zustand liegt KRAS GDP-gebunden vor und kann über eine GTPase in eine aktive, GTP-gebundene Form transferriert werden [Vigil et al., 2010]. Durch die KRAS-Aktivierung werden Signalwege wie z.B. von RAF-MAPK oder



PI3K stimuliert [McCormick et al., 2015]. Eine unkontrollierte Tumorgenese ist die Folge. In zahlreichen Krebsentitäten können Mutationen im KRAS-Gen vorliegen, so auch im KRK [S3-Leitlinie Darmkrebs 2019].

#### *1.1.5. Mikrosatelliteninstabilität*

Mikrosatelliten sind kurze (meist wenige Basenpaare), repetitive DNA-Sequenzen, sie liegen in kodierenden und nicht-kodierenden Regionen [Buecher et al., 2012; Ellegreen et al., 2004]. Durch ihre kurzen, repetitiven Sequenzen sind sie während der Replikation besonders anfällig für Fehler [Buecher et al., 2012]. Diese Fehler werden normalerweise durch die mismatch repair Proteine (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) behoben [Buecher et al., 2012]. Sofern eine Mutation in eines der vier Proteinen auftritt, ist das System defizitär und fehlerhafte Replikationen sammeln sich in den Mikrosatelliten an. [Buecher et al., 2012]. Eine Mikrosatelliteninstabilität ist die Folge und kann eine Karzinogenese fördern (siehe Kapitel 1.1.3.2. Hereditäres kolorektales Karzinom) [Buecher et al., 2012].

Es werden zwei Mutationstypen der Mikrosatelliteninstabilität unterschieden: eine somatische Mutation aufgrund einer Hypermethylierung bei MLH1 in der Promotorregion und eine Keimbahnmutation in eines der vier MMR-Proteinen [Buecher et al., 2012].

## 1.2. Sympathisches Nervensystem

### *1.2.1. Signalwege des sympathischen Nervensystems*

Noradrenalin und Adrenalin dienen als Neurotransmitter des vegetativen Nervensystems. Mittels parakriner Sekretion aus Nervenfasern modifiziert Noradrenalin das Zielorgan, Adrenalin wiederum über endokrine Wege aus der Nebenniere [Wang et al., 2020; Cole et al., 2015]. Über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) an der Zielzelle kann z.B. die Genexpression der Zielzelle reguliert werden [Cole et al., 2015].

### 1.2.2. Biosynthese der Katecholamine

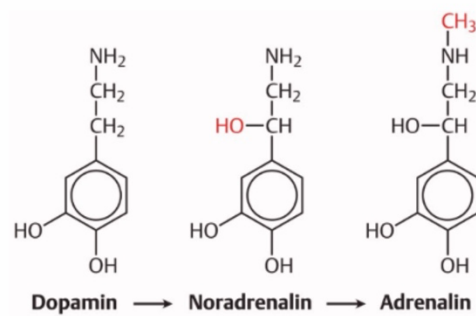


Abbildung 3 - Biosynthese der Katecholamine. Rassow J et al., 2014.

Ausgehend von der Aminosäure Tyrosin wird über den Zwischenschritt der Dopamin-Synthese Dopamin in noradrenergen Neuronen und im Nebennierenmark mittels Hydroxilierung Noradrenalin gebildet [Kirshner et al., 1959]. 80% des Noradrenalins wird wiederum mittels Methylierung in Adrenalin umgewandelt [Kirshner et al., 1959].

### 1.2.3. Adrenerge Rezeptoren

#### 1.2.3.1. Adrenerge $\alpha$ -Rezeptoren

Adrenerge  $\alpha$ -Rezeptoren werden in  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Rezeptoren unterteilt. Man unterscheidet zum einen drei Subtypen des  $\alpha$ 1-Rezeptors:  $\alpha$ 1a-,  $\alpha$ 1b-,  $\alpha$ 1d-Rezeptor. Drei Subtypen gibt es ebenso bei  $\alpha$ 2-Rezeptoren:  $\alpha$ 2a-,  $\alpha$ 2b- und  $\alpha$ 2c-Rezeptor. Die adrenergen  $\alpha$ -Rezeptoren gehören zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und werden über das sympathische Nervensystem reguliert. Ein Nachweis des adrenergen  $\alpha$ 1a- und  $\alpha$ 2c-Rezeptors erfolgte bis dato in kolorektalen Zellen nicht. Beide werden vorwiegend im Gehirn vorgefunden [Perez et al., 2020]. Deshalb lag der Schwerpunkt bei dieser Arbeit auf den adrenergen Rezeptoren  $\alpha$ 1b (3 Primer-Splicevarianten),  $\alpha$ 1d (2 Primer-Splicevarianten),  $\alpha$ 2a (1 Primer-Splicevariante) sowie  $\alpha$ 2b (1 Primer-Splicevariante).

Die Signaltransduktion über  $\alpha$ 1-Rezeptoren erfolgt durch einen  $G_q$ -gekoppelten Protein-Rezeptor [Gilman et al., 1987]. Durch seine heterotrimer Struktur besteht er aus einer  $G_q\alpha$ - und einer  $G\beta\gamma$ -Einheit [Gilman et al., 1987]. Im inaktiven Zustand ist GDP an beide Einheiten gebunden. Nach Aktivierung des Rezeptors bindet GTP an den  $G_q\alpha$ -Komplex, dieser spaltet sich von  $G\beta\gamma$ -Einheit ab und die

Phospholipase C Typ  $\beta$  (PLC- $\beta$ ) wird aktiviert [Chen et al., 2014]. Diese hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>) [Chen et al., 2014]. Als second messenger steuern sie wiederum Calcium-abhängige Prozesse in der Zelle [Chen et al., 2014].

Auch  $\alpha$ 2-Rezeptoren aktivieren ihre Signalwege über heterotrimere GCPRs. Diese bestehen aus einer G<sub>i</sub> $\alpha$ - und einer G $\beta\gamma$ -Einheit [Gilman et al., 1987]. Im aktiven Zustand bindet ebenfalls GTP an den G<sub>i</sub> $\alpha$ -Komplex [Dorsam et al., 2007]. Die Adenylylcyclase wird durch diesen Komplex gehemmt, ATP kann folglich nicht mehr in cAMP umgewandelt werden [Dorsam et al., 2007]. Der cAMP-Spiegel fällt und cAMP-abhängige Signalwege wie der der PKA werden inhibiert [Dorsam et al., 2007].

#### 1.2.3.2. Adrenerge $\beta$ -Rezeptoren

Adrenerge  $\beta$ -Rezeptoren gehören wie die adrenergen  $\alpha$ -Rezeptoren zu den GCPR. Sie unterteilen sich in der Subtypen:  $\beta$ 1- (1 Primer-Splicevariante),  $\beta$ 2- (1 Primer-Splicevariante) und  $\beta$ 3-Rezeptor (2 Primer-Splicevarianten). Adrenerge Rezeptoren sind an einer Vielzahl von Stoffwechselwegen beteiligt. Der  $\beta$ 3-Rezeptor reguliert unter anderem den Fettstoffwechsel [Philipson et al., 2020],  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Rezeptoren vermitteln zu großem Anteil die Effekte des adrenergen Nervensystems, indem sie an zahlreichen Stoffwechselwegen teilhaben. Neben dem Herz-Kreislauf-System wird durch diese Rezeptoren unter anderem auch die Sekretion von Insulin in der Bauchspeicheldrüse oder die Kontraktilität glatter Muskulatur in Gefäßen beeinflusst [Philipson et al., 2020].

Die Signaltransduktion über  $\beta$ -Rezeptoren verhält sich spiegelbildlich zu  $\alpha$ 2-Rezeptoren [Dorsam et al., 2007]. Als heterotrimerer Rezipetor besteht GCPR aus einer G<sub>s</sub> $\alpha$ - und G $\beta\gamma$ -Einheit [Gilman et al., 1987]. Nach Aktivierung bindet GTP an die G<sub>s</sub> $\alpha$ -Einheit, dieser Komplex wiederum aktiviert im Gegensatz zum G<sub>i</sub> $\alpha$ -Komplex des  $\alpha$ 2-Rezeptores die Adenylylcyclase [Dorsam et al., 2007]. Der cAMP-Spiegel steigt an, die PKA wird aktiviert und weitere Prozesse wie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB werden gestartet [Dorsam et al., 2007].

#### 1.2.4. Regulation der Tumormikroumgebung (Tumormicroenvironment = TME)

Auf vielen Tumorzellen und verschiedensten Zellen des TME ist die Expression adrenerger Rezeptoren nachgewiesen [Wang et al, 2020; Cole et al., 2015]. Das sympathische Nervensystem kann dadurch auch das TME regulieren und somit indirekt das Tumorwachstum modulieren [Renz et al., 2018; Cole et al., 2015].

Nordadrenalin ist an der Entwicklung von Immunzellen sowohl über das Knochenmark als auch über die lymphatischen Organe beteiligt [Cole et al., 2015]. Diese Zellen migrieren in das TME und können die Metastastierung beeinflussen [Cole et al., 2015; Sloan et al., 2010].

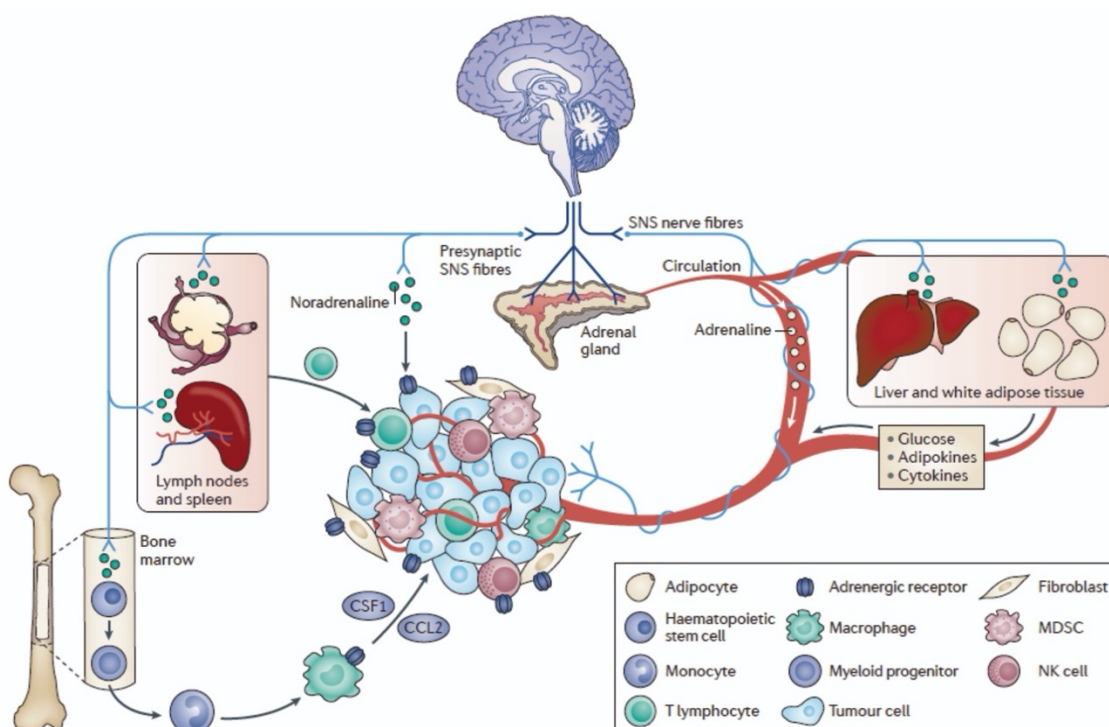


Abbildung 4 - Regulation der Tumormikroumgebung durch das sympathische Nervensystem. Abbildung aus: Cole, S. W., et al. (2015).

Adrenalin und Noradrenalin können zudem das Tumorwachstum steuern, indem sie metabolische Prozesse, wie der Bereitstellung von Glukose oder die Zytokinausschüttung, modulieren [Cole et al., 2015]. Nach der Aktivierung von  $\beta$ -Arrestin über adrenerge Signalwege kommt es zu einer gesteigerten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL6 oder IL8 [Cole et al., 2015; Sloan et al., 2010; Nilsson et al., 2007]. Indem zusätzlich die Menge an M-CSF erhöht wird, werden vermehrt Makrophagen in das TME rekrutiert und die inflammatorische Antwort stimuliert [Cole et al., 2015]. Neben der proinflammatorischen Wirkung gibt es Anzeichen, dass das adrenerge

Nervensystem eine zelluläre Immunantwort unterdrücken kann [Cole et al., 2015]. Die Expression u.a. von Interferon Typ 1 und 2 kann ebenso wie die Funktion der natürlichen Killerzellen oder T-Lymphozyten gehemmt werden [Cole et al., 2015, Inbar et al., 2011; Collado-Hidalgo et al., 2006]. Das adrenerge Nervensystem beeinflusst demnach entscheidend die körpereigene Immunmodulation.

### 1.2.5. Regulation des Tumorwachstums

ATP kann über Stimulation  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren durch eine Adenylatcyclase in cAMP umgewandelt werden [Sloan et al., 2010]. cAMP wiederum stimuliert über PKA und CREB neben der Bildung von Transkriptionsfaktoren die Expression von BARK [Sloan et al., 2010]. BARK aktiviert  $\beta$ -Arrestin. Darüber werden nicht nur inflammatorische Prozesse gesteuert, sondern ebenso rückwirkend die cAMP-Aktivierung gehemmt [Sloan et al., 2010]. Des Weiteren wird über cAMP der EPAC-Signalweg gesteuert und Einfluss auf Wachstumsfaktoren genommen, die über die RAF-Kaskade reguliert werden [Sloan et al., 2010].

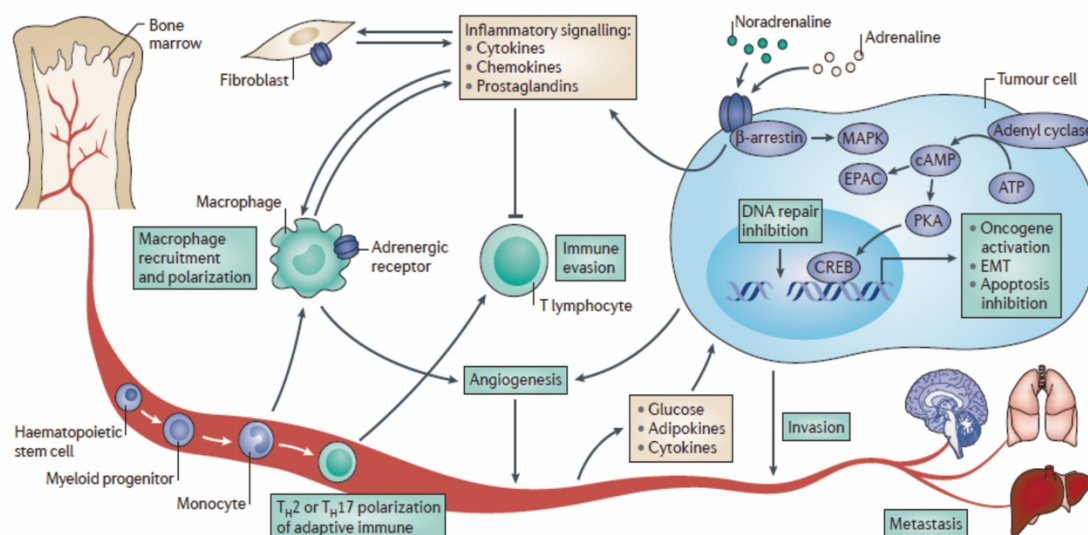


Abbildung 5 - Molekulare Mechanismen der Regulation des Tumorwachstums durch das sympathische Nervensystems. Abbildung aus: Cole, S. W., et al. (2015).

#### 1.2.5.1. Molekulargenetische Abläufe

Mittels adrenerger Signalwege können Prozesse im Zellinneren, wie der ATR-, p21- und der ATK-Signalweg, aktiviert werden. In Folge dessen werden p53 als

Tumorsuppressorgen gehemmt und Prozesse zur DNA-Reparatur ausgeschaltet [Cole et al., 2015; Cole et al., 2012].

Neben der Hemmung von Zellreparaturmechanismen wirkt sich das adrenerge Nervensystem auch auf Wachstumskaskaden aus. Ein bekanntes Beispiel ist der Her2neu-Signalweg [Hara et al., 2011]. Nach Bindung von ERBB2 an den Her2neu-Rezeptor wird die Transkription von Wachstumshormonen mittels RAS-RAF-MAPK-Weg gefördert und eine über den mTOR-Signalweg regulierte Apoptose inhibiert [Cole et al., 2015; Hara et al., 2010].

#### *1.2.5.2. Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und Angiogenese*

Erste Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen dem sympathischen Nervensystem und der epithelial-mesenchymalen Transition [Cole et al., 2015; Calvani et al., 2015]. Matrix-Metalloproteinasen (MMP) sind maßgeblich an der EMT beteiligt. Sie werden von Tumoren selbst produziert und können als Promotoren fungieren [Radisky et al., 2010; Polette et al., 2004]. MMP können neben der EMT auch die Angiogenese in Tumorgewebe beeinflussen [Jablonska-Trypuc et al., 2016; Cole et al., 2015].

Über adrenerge Signalwege können direkt neue Gefäße entstehen [Chakroborty et al., 2009; Hanahan et al., 2000]. IL6 und VEGF als vaskuläre Wachstumsfaktoren werden über katecholaminerge Stimulation der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren verstärkt produziert und sichern so die vaskuläre Versorgung des Tumors [Chakroborty et al., 2009]. Zahalka et al., 2017 konnte diese Erkenntnis bestätigen, indem er zeigte, dass der Verlust des für den adrenergen  $\beta$ 2-Rezeptor kodierenden Gens zu einer Hemmung der Angiogenese und zu einer verstärkten oxidativen Phosphorylierung führte [Zahalka et al., 2017].

#### *1.2.5.3. Zelltod*

Neben dem proliferativen Effekt kann das sympathische Nervensystem auch apoptotische Prozesse beeinflussen. Indem Adrenalin über adrenerge  $\beta$ 2-Rezeptoren die Phosphorylierung des proapoptotischen Proteins BAD stimuliert, kann Zelluntergang verhindert werden [Sastry et al., 2007]. Denn BAD als „Bcl-2 Antagonist of cell death“ blockt Bcl-2. Dieses wirkt als anti-apoptotisches Protein

protoonkogen [Elmore et al., 2007]. Durch die doppelte Hemmung kann der Zelltod unterbunden und das Zellwachstum gefördert werden.

### 1.3. Retrospektiv klinische Daten im KRK

Im April 2014 publizierten Jansen, et al eine Studie zum Thema „Stage-specific associations between beta blocker use and prognosis after colorectal cancer“. Auf deren Grundlage basiert diese Promotionsarbeit. In dieser Fall-Kontroll-Studie wurde das Überleben in Abhängigkeit einer  $\beta$ -Blockertherapie von KRK-Patient\*innen untersucht [Jansen et al., 2014]. Der Zeitraum der Studie war auf 5 Jahre angelegt und Patient\*innen, mit Erstdiagnose KRK in den Jahren 2003 bis 2007, eingeschlossen. Aufgrund kardiovaskulärer Komorbiditäten, wie arterielle Hypertonie, Herzinsuffizienz, KHK oder Diabetes mellitus, erfolgte bereits im Vorfeld und unabhängig der Krebserkrankung eine  $\beta$ -Blockertherapie. Von den 509 Patient\*innen erhielten 434 eine selektive und 72 eine nicht-selektive  $\beta$ -Blockertherapie [Jansen et al., 2014].

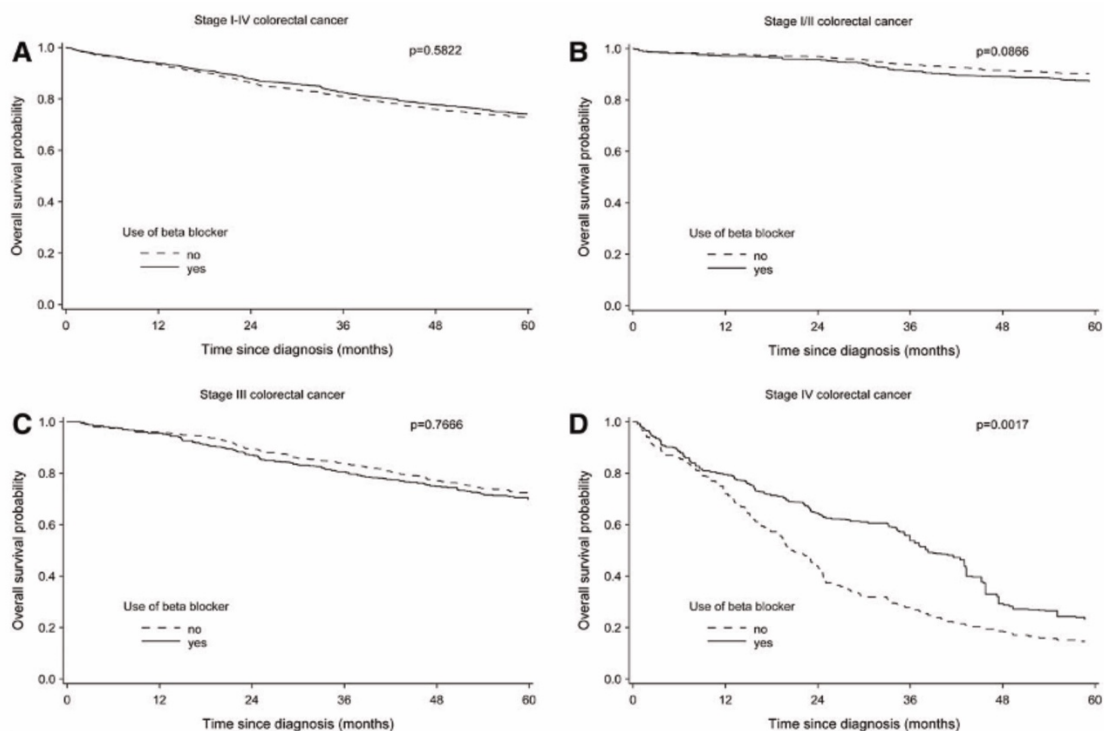


Abbildung 6 - Gesamtüberleben kolorektales Karzinom nach UICC-Stadium und einer unabhängig der Krebserkrankung erfolgten beta-Blockertherapie. Abbildung aus: Jansen, L., et al. (2014).

Im UICC-Stadium IV zeigte sich im Gegensatz zu den Stadien I-III eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens bei Patient\*innen mit KRK

unter  $\beta$ -Blockertherapie im Vergleich zu denen ohne  $\beta$ -Blockertherapie. Das mediane Gesamtüberleben dieser Patient\*innen war 18 Monate länger, KRK-spezifisch 17 Monate (mediane Überlebenszeit 38 bzw. 37 Monate vs. 20 Monate).

Dieses Ergebnis lässt die Frage stellen, weshalb eine  $\beta$ -Blockertherapie im UICC-Stadium IV diese signifikante Wirkung auf das Gesamtüberleben besitzt.



## 2. ANSATZ UND ZIELSETZUNG

Adrenerge Signalwege können modulierend die Initiierung, Progression und Metastasierung von Tumoren beeinflussen. Sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der translationalen Forschung konnte bereits für verschiedene Krebsentitäten wie Pankreaskarzinom, Prostatakarzinom und Ovarialkarzinom die Bedeutung adrenerger Signalwege gezeigt werden [Renz et al., 2018; Kim-Fuchs et al., 2014; Hassan et al., 2013; Thaker et al., 2006]. Auch in Grundlagenarbeiten zum KRK konnte dies bereits nachvollzogen werden [Pu et al., 2012; Wong et al., 2011].

Adrenerge Signalwege werden über adrenerge  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren gesteuert. Dies führte zur Annahme, dass die Tumorentwicklung und Progression unter anderem auch von einer  $\beta$ -Blocker-Therapie reguliert und folglich eine antikanzerogene Wirkung erzeugt werden könnte [Coelho et al., 2015; Schuller et al., 2012]. In wieweit jedoch der KRAS-Status dabei eine Rolle spielt, bleibt unklar.

In der Arbeit von Ahmed et al., 2013 wurden 24 KRK Zelllinien genetisch und epigenetisch charakterisiert. Unsere Hypothese fußte schlussendlich auf folgenden zwei Tatsachen:

1. In der retrospektiven Fall-Kontroll-Studie von Jansen et al., 2014 zeigte sich, dass KRK-Patient\*innen im UICC-Stadium IV, die bereits unter einer  $\beta$ -Blockertherapie bei vorliegenden Komorbiditäten standen, eine signifikante Verlängerung von insgesamt 18 Monaten in ihrem Gesamtüberleben bzw. von 17 Monaten im KRK-spezifischen Überleben hatten verglichen mit KRK-Patient\*innen, die keine  $\beta$ -Blockertherapie im Vorfeld erhielten (mediane Überlebenszeit 38 bzw 37 Monate vs. 20 Monate) [Jansen et al., 2014]. Dieser Benefit war in den anderen UICC-Stadien nicht evident.
2. Deutlich über 90% der Pankreaskarzinome sind KRAS-mutiert(MT) [Hingorani et al., 2005]. In der Arbeit von Renz et al., 2018 konnte gezeigt werden, dass die KRAS-induzierte Tumorgenese des Pankreaskarzinoms im murinen Modell durch neuropsychologischen Stress akzeleriert wird. Dies wird wiederum durch adrenerge  $\beta$ -Rezeptoren reguliert. Die Blockade des  $\beta$ 2-Rezeptors führte in einem relevanten, genetisch entwickelten

Mausmodell zu einem signifikant verlängertem Gesamtüberleben der Tiere. Die retrospektive Analyse einer Patientenkohorte, welche an einem Pankreaskarzinom operiert wurde, zeigte ebenfalls ein signifikant besseres Gesamtüberleben von Patient\*innen, die mit nicht-selektiven  $\beta$ -Blockern behandelt wurden [Renz et al., 2018].

Aufgrund dieser Daten stellte sich die Frage, weshalb nur Patient\*innen mit fortgeschrittenem KRK von einer  $\beta$ -Blockertherapie profitieren könnten. Eine mögliche Erklärung könnte die größere Bedeutung einer  $\beta$ -Blockertherapie bei KRAS-MT Tumoren sein. Die Frage, die es in dieser Arbeit zu beantworten galt, lautete folglich:

Gibt es einen Unterschied in der Sensitivität von  $\beta$ -Blockern abhängig vom KRAS-Status im KRK?

Es sollte weiterhin untersucht werden, ob signifikante Unterschiede innerhalb der einzelnen  $\beta$ -Blockerklassen (nicht-selektiv vs. selektiv für  $\beta_{1/2}$ -Rezeptor) bestehen. Da in Renz et al., 2018 die Blockade des  $\beta_2$ -Rezeptors zu einem signifikant verlängertem Gesamtüberleben im Mausmodell führte, vermuten wir, dass es beim KRK einen ähnlichen Wirkmechanismus geben könnte.

### 3. METHODEN

#### 3.1. Zellkultur

Alle Arbeiten an Zellkulturen wurden, wenn nicht anders erwähnt, unter sterilen Bedingungen auf einer Werkbank mit Laminar Air Flow-Technik durchgeführt. Die Kultivierung fand in einem Brutschrank bei einem CO<sub>2</sub>- Gehalt von 5%, einer Temperatur von 37°C und einer Luftfeuchtigkeit von 95% statt.

##### 3.1.1. Kolorektale Karzinomzelllinien (KRK Zelllinien)

Es wurden folgende KRK Zelllinien verwendet: HT29, HCT116, SW480, Colo320, DLD1, LS147T.

Zelllinie	MSI-Status	KRAS	BRAF	PIK3CA	PTEN	TP53
Colo320	MSS	WT	WT	WT	WT	R248W
HT29	MSS	WT	V600E	P449T <sup>b</sup>	WT	R273H
SW480	MSS	G12V	WT	WT	WT	R273H; P309S
DLD-1	MSI	G13D	WT	E545K; D549N	WT	S241F
HCT116	MSI	G13D	WT	H1047R	WT	WT
LS174T	MSI	G12D	WT	H1047R	WT	WT

Tabelle 1 - Charakterisierung kolorektaler Karzinomzelllinien. Aus Ahmed, D., et al. (2013).

Für die folgenden Experimente wurden HT29 und Colo320 als KRAS-WT Zelllinien ausgewählt [Ahmed et al., 2014]. SW480, DLD1, HCT116 und LS174T hingegen zeigten eine Mutation im KRAS-Gen [Ahmed et al., 2014]. Tabelle 1 aus Ahmed et al. (2013) charakterisiert molekulargenetisch die verwendeten Zelllinien. Abbildung 7 wiederum zeigt die Morphologie der in dieser Arbeit sechs verwendeten Zelllinien unter dem Lichtmikroskop bei einer Vergrößerung von 1:40. Links (a/b) KRAS-WT-Zelllinien, mittig (c/d) und rechts (e/f) KRAS-mutiert.

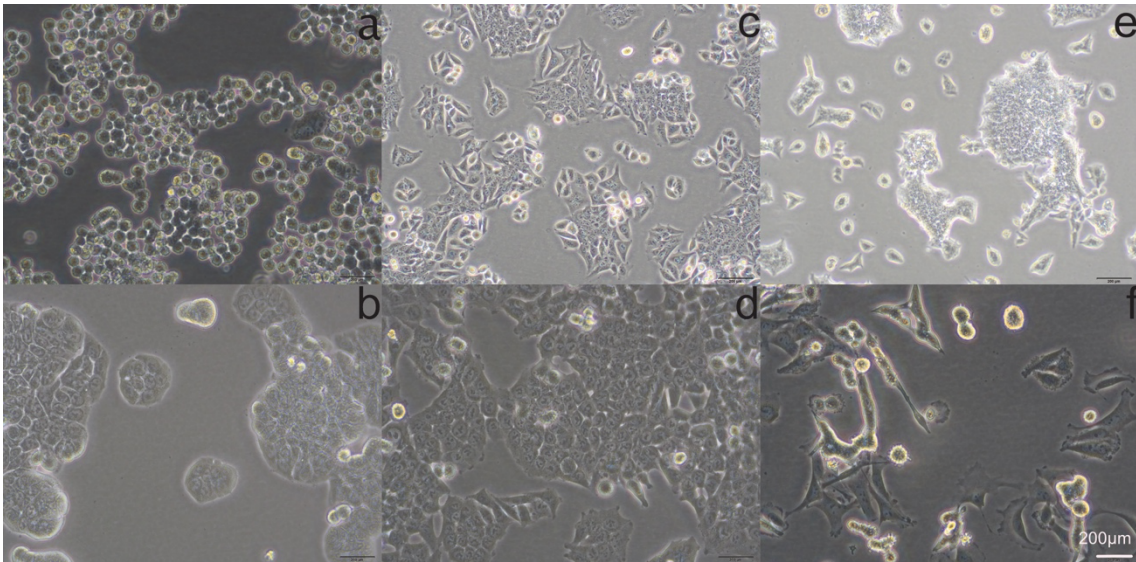


Abbildung 7 - Kolorektale Zelllinien. KRas-WT - a) Colo320, b) HT29; KRas-mut - c) DLD1, d) HCT116, e) LS174T, f) SW480

### 3.1.2. Kultivierung

Zunächst wurde Medium (wenn nicht anders erwähnt: RPMI, 10% FBS) im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Nach 20min UV-Licht-Bestrahlung und anschließender 80%-alkoholhaltiger Desinfektion der Werkbank wurde das eingefrorene Zellpellet zum Auftauen in ein 37°C-warmes Wasserbad gehalten, desinfiziert und unter die sterile Werkbank gestellt. Die 1,5ml des Zellpellets wurden abpipettiert, in 5ml Medium in einem 15ml Falcon suspendiert, daraufhin 5min bei 20°C und 125G zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 5ml frischen Medium resuspendiert. Nach der anschließenden Zellzählung konnten die Zellen mit einer Dichte von  $2 \times 10^3 / \text{cm}^2$  in einer mit bereits 5ml Medium gefüllte 25cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche ausgesät werden.

### 3.1.3. Passagierung

Bei einer Zelldichte von maximal 80% wurden die Zellen gesplittet und passagiert. Nach Verwerfen des Zellmediums wurde die Zellkulturflasche mehrfach mit 5ml DPBS gespült, die Spülflüssigkeit verworfen und im Anschluss 2ml Trypsin in die Zellkulturflasche gegeben, um die gesamte Zelloberfläche zu bedecken. Für 5min wurde im Brutschrank weiter inkubiert. Durch vorsichtiges Klopfen konnten die restlichen Zellen gelöst werden. Unter der Werkbank wurden 3ml RPMI-Medium zur Trypsin-Inaktivierung hinzugegeben, das Gemisch resuspendiert und in ein 15ml Falcon pipettiert. Dieses wurde im Anschluss bei 20°C und 125G 5min lang zentrifugiert. Nach Zellzählung und Aussaat mit einer

Dichte von  $2 \times 10^3/\text{cm}^2$  wurden in eine  $25\text{cm}^2$ -Zellkulturflasche 20ml Medium hinzugegeben und die neue Zellpassage im Brutschrank inkubiert.

#### 3.1.4. Zellzählung

Nach oben genannter Trypsinierung und Zentrifugation wurden von der neuen Suspension  $300\mu\text{l}$  abpipettiert und in ein  $1,5\text{ml}$  Tube gegeben. Mit einem Verdünnungsverhältnis von 10:1 wurden  $10\mu\text{l}$  der Zellsuspension in  $90\mu\text{l}$  Trypanblaulösung pipettiert und resuspendiert. Trypanblau dient als Nachweis der Zellviabilität. Leblose Zellen werden angefärbt, indem der Farbstoff über eine nicht mehr funktionelle Membran in die Zelle gelangt und dort an interzelluläre Proteine bindet. Aufgrund der zytotoxischen Wirkung des Farbstoffes sollte zügig gearbeitet werden [PanRean, Datasheet Trypanblau].

Anhand einer Neubauer-Zählkammer konnte die Zellanzahl mithilfe der nachfolgenden Formel bestimmt werden:

$$\frac{\text{Zellanzahl aller 4 Kammern}}{4} \times 10 (\text{Verdünnung}) \times 10^4 (\text{pro ml})$$

#### 3.1.5. Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung mussten zunächst die Zellen, wie im vorherigen Punkt geschildert, gezählt werden. Fünf Millionen Zellen sind zur Kryokonservierung nötig. Die dafür berechnete Suspensionsmenge wurde abpipettiert, in ein  $1,5\text{ml}$  Falcon gegeben und im Anschluss erneut bei  $20^\circ\text{C}$  und  $125\text{G}$  in der Tischzentrifuge  $5\text{min}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen,  $950\mu\text{l}$  FBS und  $50\mu\text{l}$  DMSO zügig auf das im Falcon befindliche Zellpellet gegeben, vermischt und in ein  $1\text{ml}$ -Kryoröhrchen pipettiert. Die Probe wurde bei  $-80^\circ\text{C}$  zunächst in eine mit  $80\%$ -Alkohol getränkten Box für zwei bis drei Tage eingefroren und final bei  $-80^\circ\text{C}$  in Stickstoff gelagert.

### 3.2. EZ4U

Der EZ4U-Test ist ein Zellviabilitätstest, der eine Weiterentwicklung des Thymidintests und MTT-Assays darstellt. Hierbei werden Tetrazoliumsalze zu farbigem Formazan reduziert. Diese chemische Reaktion erfordert intakte Mitochondrien und setzt folglich lebende Zellen voraus. Das dabei entstehende Chromophor zeichnet sich durch eine fehlende Zytotoxizität und fehlende

Radioaktivität aus. Die Versuchsbedingungen werden vereinfacht [Biozol, EZ4U 4th Generation].

### *3.2.1. EZ4U unter Standardbedingungen*

Zur Durchführung eines EZ4U-Viabilitätstest wurde eine 96-Well-Platte benötigt. Nach Zellzählung wurden 5000 Zellen mit 200µl Zellmedium jeweils in ein Well unter sterilen Bedingungen ausgesät. In drei weitere Wells wurde zum Abschluss als Kontrollmedium reines RPMI-Medium pipettiert. Die Platte wurde anschließend im Brutschrank unter Standardbedingungen bebrütet.

Nach 24h wurde die EZ4U-Lösung hergestellt. Das EZ4U-Substrat wurde mit 2,5ml EZ4U-Aktivator vermischt und auf 37°C erwärmt. Pro Well wurden nun 20µl der EZ4U-Lösung pipettiert. Anschließend wurde die 96-Well-Platte in einen 37°C warmen Wärmeschrank für weitere 2h inkubiert.

In der abschließenden Messung wurden mittels ELISA-Reader bei einer Lichtlänge von 450nm und 620nm die Absorption des Mediums untersucht und die Ergebnisse in eine Microsoft-Excel-Tabelle (Version: Office 365) überführt.

### *3.2.2. Isoproterenol-Applikation im EZ4U*

Zur Stimulation des Zellwachstums wurde Isoproterenol (ISO) verwendet. ISO fungiert als Sympathomimetikum und ist zudem ein sehr potenter  $\beta$ -Agonist [Sigma Aldrich, Datasheet Isoproterenol hydrochloride]. Die Versuchsreihe schloss zwei Messungen mit ein, nach 0h und 24h. Die zwei 96-Well-Platten wurden in den Brutschrank gestellt, nach 24h wurde das Medium erstmals gewechselt. 200µl reines RPMI-Medium ohne FBS wurden jeweils in ein Well gegeben. Ziel war ein Zellzyklusstopp. Die 96-Well-Platten wurden für weitere 24h im Brutschrank inkubiert, damit die Zellen auf denselben Ausgangsstand gebracht werden konnten. Nach weiteren 24h wurde das Medium erneut verworfen und 200µl an RPMI-Medium mit 5% FBS und ISO in den Konzentrationen 1µmol (nur im ersten Versuch zur Bestimmung einer idealen ISO-Konzentration) und 10µmol hinzugegeben. Pro Konzentration wurden drei Wells als Kontrollen benötigt. Eine 96-Well-Platte wurde für weitere 24h inkubiert, ein EZ4U-Viabilitätstest wurde zur 0h-Bestimmung bei der anderen Platte, wie unter 3.2.1. beschrieben, durchgeführt.

Nach 24h wurde das Procedere wiederholt. Das Medium wurde gewechselt, 200µl an RPMI-Medium mit 5% FBS und 10µmol ISO in die angelegten Wells pipettiert und im Anschluss der EZ4U-Test nach insgesamt 24h-ISO Stimulation durchgeführt.

### *3.2.3. $\alpha$ -Blocker- und $\beta$ -Blocker-Applikation im EZ4U*

Als Substanzen fungierten die  $\beta$ -Blocker Propranolol (nicht-selektiv), Atenolol ( $\beta$ 1-selektiv) und ICI 118,551 ( $\beta$ 2-selektiv). Außerdem wurden die  $\alpha$ -Blocker Doxazosin ( $\alpha$ 1-selektiv) und Yohimbin ( $\alpha$ 2-selektiv) verwendet.

In Anlehnung an die mittlere inhibitorische Konzentration  $IC_{50}$ , ermittelt in der Arbeit von Marisa Coelho, ergaben sich folgende Konzentrationen: 25µmol Propranolol, 25µmol Atenolol und 2,5µmol ICI118,551 [Coelho et al., 2015]. Für  $\alpha$ -Blocker galten folgende Konzentrationen: Doxazosin mit 30µmol und 40µmol, Yohimbin mit 200µmol und 300µmol.

Die Hemm-Versuchsreihe wurde identisch zur Stimulations-Versuchsreihe durchgeführt. Lediglich die oben erwähnten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blocker-Konzentrationen wurden den Zelllinien zugefügt, nachdem sie vorher mit 10µmol ISO stimuliert wurden.

## 3.3. Real-Time-PCR

### *3.3.1. Herstellung der RNA*

#### *3.3.1.1. Herstellung des Zellpellets*

Nach der Zellzählung wurden fünf Millionen Zellen bei 20°C und bei 125G für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 1ml DPBS auf das Zellpellet gegeben. Nach Resuspension konnte das Gemisch in ein 1,5ml-Tube pipettiert und erneut bei 20°C und bei 125G für 5min zentrifugiert werden. Der Überstand wurde dann verworfen.

#### *3.3.1.2. RNA-Isolierung*

Die Herstellung von RNA erfolgte gemäß dem RNeasy® Mini Kit von Qiagen. Zunächst wurden 350µl RLT-Puffer auf das Zellpellet pipettiert, im Anschluss 70%-Ethanol im Verhältnis 1:1 und vorsichtig resuspendiert. Die 700µl wurden in

ein RNeasy® Mini Spin Column übertragen, welches zuvor in einem 2ml-Tube platziert und bei >8000G 15sec in der Tischzentrifuge zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen, 700µl RW1-Puffer in die Spin Column gegeben, erneut bei >8000G 15sec zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Anschließend wurden zunächst 500µl RPE-Puffer in das Spin Column hinzugegeben, bei >8000G 15sec in der Tischzentrifuge zentrifugiert, nochmals 500µl RPE-Puffer in das Spin Column pipettiert und für weitere 2min bei > 8000G zentrifugiert.

Die RNeasy® Spin Column wurde im Anschluss in ein 1,5ml-Tube gestellt, 50µl RNase-freies Wasser hinzugegeben und 1min bei >8000G zentrifugiert. Das RNeasy® Spin Column wurde entsorgt, die hergestellte RNA befindet sich im 1,5ml-Tube.

### *3.3.1.3. Messung der RNA-Konzentration*

Mithilfe des NanoDrop-Messgerätes kann die RNA-Konzentration gemessen werden. Dazu musste 1µl der RNA-Lösung auf die ausgewiesene Messstelle pipettiert werden. Über die eigens im NanoDrop-Messgerät integrierte Software wurde die Konzentration der RNA-Probe bestimmt.

### *3.3.2. cDNA-Synthesierung*

#### *3.3.2.1. DNA-Elimination*

Zunächst wurden die Substanzen auf Eis gestellt. 2µl des gDNA Wipeout-Puffers wurden in ein 0,5ml-Tube pipettiert. Die restlichen 12µl des 14µl-Mixes zur DNA-Elimination bestanden aus RNase-freiem Wasser und der RNA.

Für den Mix wurden 700ng an RNA benötigt. Über die durch das NanoDrop-Messgerät ermittelte RNA-Konzentration konnte die dafür benötigte µl-Menge berechnet und wiederum von den Gesamt-12µl abgezogen werden. Die damit berechnete Restmenge ergab die Menge an RNase-freiem Wasser. Diese wurden in das 0,5ml-Tube hinzugegeben und gemischt. Der Mix wurde für 2min bei 42°C inkubiert und im Anschluss erneut auf Eis gestellt.



### 3.3.2.2. Reverse-Transkriptase-Reaktion

4µl Quantiscript-RT-Puffer, 1µl RT-Primer-Mix und 1µl Reverse-Transkriptase-Master-Mix wurden in dieser Reihenfolge in einem 0,5ml-Tube vermischt. 6µl des Reverse-Transkriptase-Mixes wurden zu den 14µl der eliminierten DNA dazugegeben, anschließend für 15min bei 42°C und für 3min bei 95°C inkubiert. Die fertige cDNA wurde auf Eis gestellt.

### 3.3.3. Real-Time-PCR

Wie bereits bei der Herstellung der cDNA wurden die Materialien zunächst auf Eis gestellt. 10µl des SsoFast™ EvaGreen® Master Mix wurden in ein Well der PCR-96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden 7µl RNase-freies Wasser und 2µl cDNA hinzugefügt. Als letzter Schritt wurde 1µl des benötigten Primers dazugegeben. Pro cDNA-Probe wurden jeweils zwei Wells zur Kontrolle benötigt.

Primer	Primer-Sequenz	Amplifikat
ADRA1B	AGACGTTGGGCATTGTGGTCGGTATGTTTCATCTTGTGCTGGCTACCCTTCTTCAT CGCTCTACCGCTTGGCTCCTTGTCTCCACCCTGAAGCCCCCGACGCCGTGTT CAAGGTGGTGTCTGGCTGGGCTACTTCAACAG	112bp
ADRA1D	GGAGGCCCGCCAGTGGTGGCCGTAGACACGCCAGAGAGGGCGGCGGGCGCCG GCGACGACGGCACTGGCAGCGCAGGAGACGGAGGAAGCGCGCTTGAACCTCG CGGCTGGAACAGGGGTAGATGAGCGGGTTCACGCAGCTGTTGAAGTAGCCGAG CCAGAAGATGACCT	140bp
ADRA2A	GGCGGGCCCCGCACACGGTAAGACCTCTTGCTTTTCGCTCAGGCTCAAGATTCAA GATACAGATATTGATATGTATATATATATTTAATTTCTGTCTCATCCTTCCAAGTTAT CAGGCCACCGATGATTTTTGT	102bp
ADRA2B	ACCCAAGCCACTAAAAACCCTCTTGGTGTGGCCGGTAAATGTCGAAACGTTGT CATGTAGCGTAATAACTCAGACCTTTCAGCCAGAAGAACACATTCTCAAAGAGA TCCTTAACTTGAAATAGTGATTCTGTCTGCCACTCCCGG	119bp
ADRB1	CAAGTGCCACGTGAATTTGCTGGTAAAGTTAGCACTTGTGTGTAAATTCTACT TCCTCTTGTGTGTTTTACCAAGTATTTATACTCTGGTGCAACTAACTACTGTGTGA GGAATTGGTCCAT	94bp
ADRB2	TCAACTGCTATGCCAATGAGACCTGCTGTGACTTCTTACGAACCAAGCCTATGC CATTGCCTCTTCCATCGTGTCTTCTACGTTCCCTGGTGATCATGGTCTTCGTG TA	82bp
ADRB3	GGAAGGTGAGTGGGAAGGTAGAGTTGTGGAAAGGCTGGGAAACATCAGAATA TATTATGACACAAGACATTTGACCAACCAAGCAATGCTTTGTGCCTGTGCC	77bp
GAPDH	GTATGACAACGAATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCACAT GGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAG GAAGAGAGAGACCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACAC	117bp

Tabelle 2 - Primer für RT-PCR mit Primersequenz und Amplifikat [Bio-Rad, Validierungsdaten].

Als Kontrollgruppe pro Primer diene jeweils ein Zwei-Well-Paar, in welches lediglich 2µl RNase-freies Wasser statt cDNA pipettiert wurden. Folgende Primer wurden verwendet: *GAPDH*, *GUSB*, *ADRB1*, *ADRB2*, *ADRB3*, *ADRA1b*, *ADRA1d*, *ADRA2a*, *ADRA2b*.

Nach Kleben des optical adhesive films auf die PCR-96-Well-Platte wurde die Platte bei 125G 1min lang zentrifugiert. Anschließend wurde die RT-PCR durchgeführt. Die Holding Stage wurde auf 95°C für 20min konfiguriert und die anschließende Cycle Stage aus 40 Zyklen à 95°C für 3min mit nachfolgender 20min Abkühlung auf 65°C durchgeführt. Die abschließende Melt Curve Stage bestand aus 15min bei 95°C, 1min bei 60°C und 15min bei 95°C. Die ermittelten Werte aus dem StepOnePlus® RTPCRSystem wurden im Anschluss in eine Microsoft-Excel-Tabelle übertragen.



Abbildung 8 – Systemeinstellung der RT-PCR-Temperaturkurve im StepOnePlus RTPCRSystem

## 3.4. Western Blot

### 3.4.1. BCA-Bestimmung

#### 3.4.1.1. Anlegen der Zellkultur und Proteinlyse

Während des Passagierens wurden 1.000.000 Zellen aus dem 15ml Falcon entnommen und in einer Petrischale ausgesät, 5ml RPMI-Medium mit 10% FBS dazugegeben und unter Standardbedingungen inkubiert. Bei einer Zellkonfluenz von 80% wurde die Petrischale auf Eis gestellt, das Medium abgesaugt und 200µl Lyse-Puffer dazu gegeben. Der Lyse-Puffer bestand aus 89/100 ddH<sub>2</sub>O und 11/100 Puffer-Lösung (1/100 Proteinase Inhibitor 100x, 10/100 Ripa Lysis Puffer 10x). Nach 2min Wartezeit konnten die Zellen vorsichtig von der Oberfläche gelöst werden.

Die 200µl Puffer-Zell-Suspension wurde anschließend in ein 1,5ml-Tube pipettiert und für 30min auf Eis gestellt. Währenddessen wurde alle 10min die Suspension mittels Vortexmixer gemischt, im Anschluss für 10min bei 10000G und 4°C zentrifugiert und der Überstand mit Vorsicht in ein neues 1,5ml-Tube

pipettiert. 25µl des Überstandes wurden nochmals in ein neues 1,5ml-Tube gegeben, im Verhältnis 1:10 mit 225µl des Ripa-Puffers ohne Proteinase-Inhibitor verdünnt und jeweils 50µl in 3 Wells einer 96-Well-Platte pipettiert.

#### 3.4.1.2. Herstellung der Verdünnungsreihe und anschließende Messung der Proteindichte

Für die benötigte Verdünnungsreihe zur BCA-Bestimmung wurde zunächst Ripa-Puffer oder DBPS nach Schema in acht mal zwei Wells pipittiert (µl-Angabe siehe Tabelle 2). In die obersten 225µl Puffer wurden im Anschluss 150µl 2mg/ml BSA hinzugegeben und vermischt. 200µl der nun entstandenen 800µl/ml Lösung wurden resuspendiert und in die darunter liegende Reihe pipettiert. Die Verdünnung mit der Konzentration 400µg/ml war hergestellt. Dieser Schritt wurde weitere viermal wiederholt, um eine Endkonzentration von 25µg/ml zu erreichen. Die letzten beiden Paare wurden von der Verdünnungsreihe ausgenommen, sie dienten als Kontrolle und bestanden lediglich aus Pufferlösung.

200µl des BCA Protein Assay Kit (Zusammensetzung 50:1 - Teil A:Teil B) wurden jedem Proteinlysate zugefügt. Nach 2h Abdunkeln der 96-Well-Platte und vorsichtigem Schwenken wurde mithilfe des ELISA-Readers bei 550nm Wellenlänge die Proteindichte gemessen.

800µg/ml	150µl 2mg/ml BSA + 225µl Puffer
400µg/ml	200µl der Lösung 800µg/ml + 200µg Puffer
200µg/ml	200µl der Lösung 400µg/ml + 200µg Puffer
100µg/ml	200µl der Lösung 200µg/ml + 200µg Puffer
50µg/ml	200µl der Lösung 100µg/ml + 200µg Puffer
25µg/ml	200µl der Lösung 50µg/ml + 200µg Puffer
0µg/ml	Nur Puffer
Blank	Nur Puffer

Tabelle 3 - Verdünnungsreihe zur BCA-Bestimmung aus dem Labor für experimentelle Chirurgie der LMU München

### 3.4.2. Westernblot

#### 3.4.2.1. Gel-Herstellung

Nach Einspannen des Deck- und Gelglases in die Haltevorrichtung wurden diese zunächst auf Undurchlässigkeit geprüft. Zur Herstellung des Trenngels (12%) wurden anschließend in ein 50ml Falcon gefüllt (Angaben für zwei Gele): 4,3ml H<sub>2</sub>O, 2,5ml 1,5M Tris pH 8,8, 100µl 10% SDS, 100µl 10% APS. 3ml Polyacrylamid und 10µl Temed wurden als letztes hinzugegeben und die Trenngellösung vermischt. Die Lösung wurde zwischen beide Gläser in die Haltevorrichtung gegossen und bis 2cm unterhalb der Endmarkierung eine waagrechte Gelkante bildend aufgefüllt. 30min wurde im Anschluss zur Aushärtung gewartet.

Für das Sammelgel wurden folgende Substanzen in ein 50ml Falcon vermischt (Angaben für zwei Gele): 2,3ml H<sub>2</sub>O, 380µl 1M Tris pH 6,8, 30µl 10% SDS, 30µl 10% APS. Anschließend wurden 380µl Polyacrylamid und 7µl Temed dazugegeben. Die Sammelgel-Lösung wurde danach auf das Trenngel bis zur Endmarkierung aufgegossen. Um Luftblasen zu vermeiden, wurde Isopropanolol als Abschluss auf das Sammelgel gegeben. Der für die Bildung der Geltaschen nötige Kamm wurde zwischen die Gläser eingefügt und wurde 30min ausgehärtet.

Die Gläser wurden hierauf im Elektrophorator platziert. Der zehnfache Laufpuffer (30g Tris Base, 144g Glycin, 10g SDS, 1l VE-H<sub>2</sub>O) wurde 1:10 verdünnt (100ml 10-fach Laufpuffer und 900ml VE-H<sub>2</sub>O) und in die Elektrophorator-Box gefüllt, bis der Pufferstand ca. 2,5cm erreicht hatte. Bei 70V wurde das Gel für 10min leer laufen gelassen.

#### 3.4.2.2. Proteinübertragung

30µg Protein werden für einen Westernblot benötigt. Die dafür benötigte µl-Menge wurde bestimmt (siehe BCA-Bestimmung) und mit ddH<sub>2</sub>O entsprechend auf 30µl in einem 1,5ml-Tube aufgefüllt. Anschließend wurden 7,5µl Laemmli (1/4 des Protein-ddH<sub>2</sub>O-Volumen) hinzu pipettiert und kurz resuspendiert. Der Standard (Precursor Plus Protein) wurde in die erste Geltasche vorsichtig gegeben und im Anschluss die Proteinprobe vorsichtig in eine weitere Tasche gefüllt. Bei 120V wurden die Proben für 60min durch das Gel im Elektrophorator laufen gelassen.

### 3.4.2.3. Blotting

Der zum Blotting benötigte Blottpuffer ist folgendermaßen zusammengesetzt: 30g Tris Base, 144g Glycin, 1l VE-H<sub>2</sub>O. Anschließend wurde dieser zehnfache Blottpuffer 1:10 verdünnt (100ml Blottpuffer, 200ml Methanol, 700ml VE-H<sub>2</sub>O) und bei 4°C gelagert. 10min vor Ende der Proteinübertragung wurden die für die Blottingbox zugeschnittenen Materialien (Membran, Whatmann Paper, Schwämme) im Blottpuffer eingeweicht.

Das Gel wurde aus der Glasverankerung vorsichtig gelöst und nach folgendem Schema das Blotting-Material zusammengebaut:

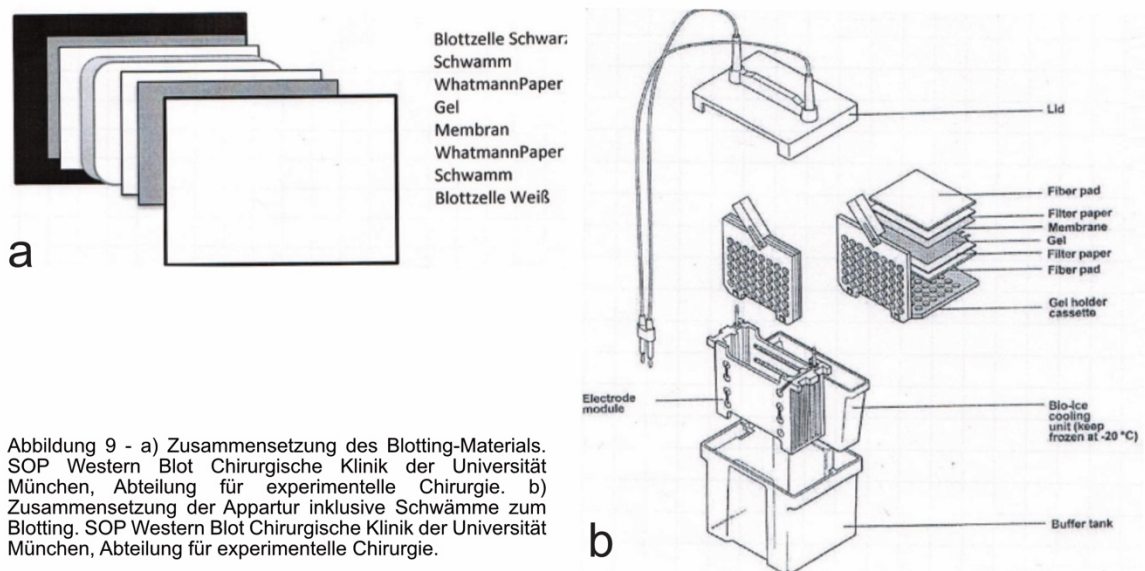


Abbildung 9 - a) Zusammensetzung des Blotting-Materials. SOP Western Blot Chirurgische Klinik der Universität München, Abteilung für experimentelle Chirurgie. b) Zusammensetzung der Apparatur inklusive Schwämme zum Blotting. SOP Western Blot Chirurgische Klinik der Universität München, Abteilung für experimentelle Chirurgie.

Der Blottingblock wurde danach mit Eis und Blottpuffer aufgefüllt und bei 300mA für 60min laufen gelassen.

### 3.4.2.4. Blocking

Nach dem Blotting wurde die Membran in eine Blockingbox gelegt, 5%-haltige Milchpulverlösung (0,5g Milchpulver auf 10ml TBST) hinzugegeben, bei Raumtemperatur für eine Stunde vorsichtig geschwenkt und im Anschluss die Suspension verworfen. Über Nacht wurde die Blockingbox bei 4°C mit Milchpulverlösung und GAPDH-Antikörper (1:2500 Verdünnung, 5µl GAPDH: 9995µl Milchpulverlösung) weiter geschwenkt. Im Anschluss wurde die Membran dreimal 5min in TBST gewaschen. Für eine weitere Stunde wurde die Membran mit einem zweiten Antikörper (zB ADRB1) in einer 5%-Albumin Lösung inkubiert

und anschließend erneut dreimal 5min in TBST gewaschen. Die Membran konnte anschließend mithilfe des Odyssey-CLx-Readers entwickelt werden.

### 3.5. Zellzyklus-Analyse

#### *3.5.1. Anlegen der Zellkultur*

##### *3.5.1.1. Versuchsgrundlage*

500.000 Zellen wurden pro Well auf einer 6-Well-Platte mit 2ml Medium ausgesät und für 24h inkubiert. Insgesamt wurden zwei 6-Well-Platten angelegt. Pro Well-Platte bestand zudem eine Kontrollprobe ohne Zellen. Nach 24h wurde ein Mediumwechsel mit reinem RPMI-Medium (ohne FBS) zum Zellzyklusstopp durchgeführt und weitere 24h bebrütet.

##### *3.5.1.2. Stimulation*

Nach insgesamt 48h wurde die erste 6-Well-Platte zur Messung vorbereitet und aus der Versuchsreihe genommen. Das alte Medium in der zweiten 6-Well-Platte wurde jeweils mit 2ml RPMI-Medium, 5% FBS und 10 $\mu$ M ISO ersetzt und erneut inkubiert. Nach 24h wurde diese 24h-Messung aus der Versuchsreihe genommen.

#### *3.5.2. Zellzyklus-Analyse*

Nachdem das Medium verworfen wurde, konnten die sechs Wells jeweils mit 500 $\mu$ l Trypsin benetzt werden. Die Kulturen wurden für 5min in den Brutschrank gestellt, anschließend mit 1,5ml RPMI-Medium pro Well gespült und durch vorsichtiges Resuspendieren konnten die Zellen gelöst und gezählt werden. Jeweils 500.000 Zellen pro Well wurden in zwei FACS-Tubes (Probe/Kontrolle) aufgeteilt. Es wurde anschließend 1ml DPBS hinzugefügt, mit dem Vortex-Mixer vorsichtig gemischt und 5min bei 20°C und 500G zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, 100 $\mu$ l 70% Ethanol pro FACS-Tube auf die Zellen gegeben und über Nacht die Proben bei 4°C gelagert. Am Folgetag wurden die Zellen zweimalig mit 1ml DPBS gewaschen, erneut mit dem Vortex-Mixer durchmischt und für 5min bei 20°C und 500G zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen. Die RNase 100 $\mu$ g/ml wurde 1:10 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und 50 $\mu$ l jeweils in ein FACS-Tube gegeben. Hoechst® 33342 wurde 1:10000 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und



davon 600µl in lediglich ein FACS-Tube pipettiert. Stattdessen wurden in die Kontrollprobe 600µl ddH<sub>2</sub>O gegeben. Für weitere 2h wurden die FACS-Tubes abgedunkelt bei Raumtemperatur gelagert, nochmals auf dem Vortex-Mixer vermischt und die Zellzyklus-Analyse anschließend mittels LSR-Fortessa™ Flow Cytometer durchgeführt. Die Daten konnten mittels FACSDiva™ Software erhoben und in Excel-Tabellen ausgewertet werden.

### 3.6. Stammzellmarker-Analyse

#### 3.6.1. Anlegen der Zellkultur

Das Anlegen der Zellkultur und die Versuchsvorbereitung entsprachen der Zellzyklus-Analyse (siehe 3.5.1.).

#### 3.6.2. Stammzellmarker-Analyse

Jeweils 150.000 Zellen pro Well wurden in 7 FACS-Tubes übertragen. Nach folgendem Schema (siehe Tabelle 2) wurden die Antikörper in die einzelnen FACS-Tubes pipettiert (1µl CD44, 2,5µl CD133, 2,5µl CD24, 1µl Rat IgG2b, 0,675µl Mouse IgG1, 2,5µl Mouse IgG2a).

		FITC	PE	PerCP	APC
1	Unstained				
2	ISO	Rat IgG2b	Mouse IgG1		Mouse IgG2a
3	FMO FITC - CD44-anti-mouse/human Antibody		CD133	7AAD	CD24
4	FMO PE – CD133-anti-mouse Antibody	CD44		7AAD	CD24
5	FMO PerCP	CD44	CD133		CD24
6	FMO APC – CD133-anti-mouse Antibody	CD44	CD133	7AAD	
7	Sample	CD44	CD133	7AAD	CD24

Tabelle 4 - Pipettierschema der Antikörperfärbung zur Analyse von Stammzellmarkern

Die Proben wurden für 30min bei 4°C abgedunkelt gelagert und anschließend 2,5µl 7AAD in die vorhergesehenen FACS-Tubes pipettiert (siehe Tabelle 2). Nach 5min Wartezeit wurden in jedes Tube 2ml des FACS-Puffers (1 Liter DPBS, 5mg BSA, 2ml Natriumazid) hinzugefügt. Die Proben wurden für 5min bei 20°C und 500G zentrifugiert, der Überstand abgegossen und 300µl FACS-Puffer erneut auf die Zellen gegeben. Die Tubes wurden nochmals mittels Vortex-Mixer gemischt. Im Anschluss wurde die Stammzellmarker-Analyse mittels LSR-Fortessa Flow Cytometer vorgenommen. Die Daten wurden in der FACSDiva Software

transformiert und konnten mittels Excel-Tabellen hinsichtlich ihrer Signifikanzen analysiert werden.

### 3.7. Immunhistochemischer Nachweis adrenerger $\beta$ -Rezeptoren

#### *3.7.1. Schnitte*

Nach erfolgreicher Paraffin-Einbettung wurden zunächst die Organpräparate mittels Mikrotom in 4 $\mu$ m-Schnitte geschnitten. Im Anschluss wurden sie auf Superfrost Plus Objektträger aufgezogen. Diese wurden im Anschluss bei 56°C für eine Stunde, über Nacht bei 37°C und im Anschluss bei Raumtemperatur gelagert.

#### *3.7.2. Herstellung der Pufferlösungen*

Der für die Immunhistochemie benötigte Citratpuffer setzt sich folglich zusammen: 10,5g Citronensäure-Monohydrat wurden mit 500ml H<sub>2</sub>O als Solution A in Lösung gebracht, Solution B bestand aus 14,705g tri-Natriumacetat-Dihydrat und 500ml H<sub>2</sub>O. 18ml Solution A, 82ml Solution B und 1000ml H<sub>2</sub>O wurden nun in einem 1000ml-Erlenmeyerkolben zum Citratpuffer gemischt.

Für die AEC-Substrat-Lösung wurden 50mg AEC in 5ml N,N-Dimethylformamid gelöst und in einen 1000ml-Erlenmeyerkolben mit 200ml H<sub>2</sub>O vermischt. 2ml hundertfacher Natriumacetat-Stammlösung (28,7g/100ml H<sub>2</sub>O) und 100 $\mu$ l 30%-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurden zu der Lösung hinzugegeben.

#### *3.7.3. Entparaffinierung*

Die Objektträger wurden in folgender Reihenfolge entparaffiniert: zweimal 10min in Xylol-Lösung, zweimal 5min in 100% Ethanol, zweimal 5min in 96% Ethanol, zweimal 5min in 70% Ethanol und mit abschließend Aqua destilliert gespült.

#### *3.7.4. Antigen-Retrieval*

Die Objektträger wurden in eine Küvette mit Citratpuffer gegeben. Die Küvette mit dem Objektträger wurde nun für 30min bei 96°C ins Wasserbad gestellt und im Anschluss mit Leitungswasser für 5min gespült. Damit die endogene Peroxidase blockiert werden konnte, wurde für 30min 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Objektträger gegeben und 5min mit PBS ausgewaschen.



### *3.7.5. Immunhistochemische Färbung*

Ab diesem Schritt wurden alle Inkubationen in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die Objektträger mussten zunächst mit der langen Kante auf Zellstoff kräftig abgeklopft werden, damit sich die Rückstände der vorigen Lösung lösen konnten. Mit dem PAP-Pen wurde nun möglichst eng ein geschlossener Kreis um das Gewebe gezogen. Die Blocking-Solution aus dem ImmPRESS Kit wurde vorsichtig auf den Objektträger getropft, bis das Gewebe komplett bedeckt war. Nach 20min wurden die Objektträger auf Zellstoff abgeklopft und der Primär-Antikörper, der vorher 1:250 mit 1%-BSA-PBS (0,5g BSA in 50ml PBS) verdünnt wurde, aufgetragen. Diese wurden entweder über Nacht bei 4°C oder bei Raumtemperatur für 1 Stunde gelagert. Die Objektträger wurden erneut abgeklopft, für 5min in PBS gewaschen, abgeklopft und das ImmPRESS Anti-Rabbit-Ig-Reagent für 30min aufgetragen. Erneut wurden die Objektträger für 5min in PBS gewaschen und die AEC-Substratlösung für 20min auf die Objektträger gegeben. Die Farbentwicklung des Präparats wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Abschließend wurden die Proben für 5min unter Leitungswasser gespült.

### *3.7.6. Gegenfärbung*

Mit Aqua destilliert wurden die Objektträger kurz gespült und drei- bis sechsmal in Hämalaun eingetaucht. Mit Leitungswasser wurden die Proben für 10min gespült und die Farbentwicklung unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Zum Abschluss wurden sie mit Aquatex eingedeckt und gelagert.

## 3.8. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse mittels T-test, bei parametrisch und intervallskalierten Werten, und p-Wert-Bestimmung erfolgte über GraphPadPrism 9 (Graph Pad). Ein p-Wert von  $<0,05$  wurde als statistisch signifikant bezeichnet. Alle Werte sind Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung von mindestens drei Versuchsreihen. Affinity Designer (Affinity/Serif) wurde zur graphischen Verarbeitung verwendet.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Viabilitätszunahme unter ISO-Behandlung

Es sollte untersucht werden, ob ISO als synthetisches Kathecholamin Einfluss auf die Proliferation bzw. Viabilität von KRK Zelllinien mit KRAS-Wildtyp (WT) bzw. KRAS-Mutation (MT) hat. Zur optimalen Dosisfindung wurden zunächst die Zelllinien Colo320 (KRAS-WT) und SW480 (KRAS-MT) verwendet.

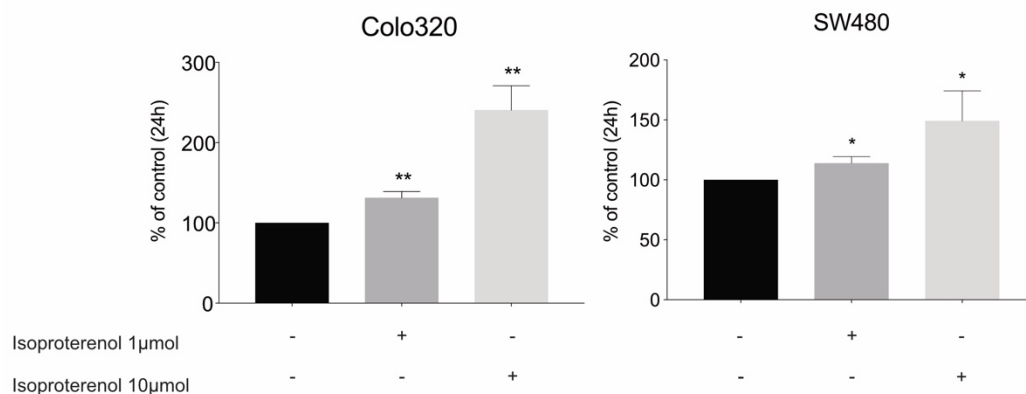
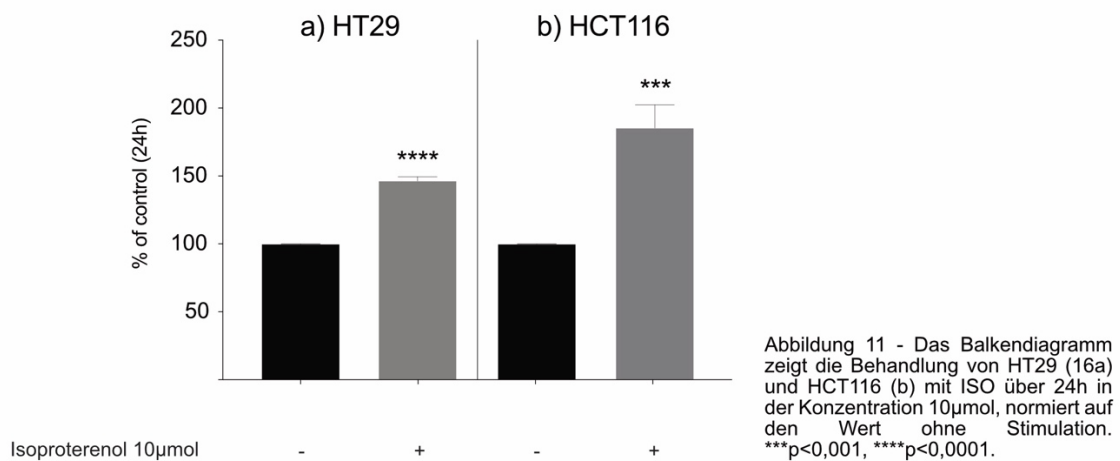


Abbildung 10 - Das Balkendiagramm zeigt die Behandlung von Colo320 und SW480 mit ISO über 24h in den Konzentrationen 1 µmol und 10 µmol, normiert auf den Wert ohne Stimulation. \*p<0,05, \*\*p<0,01.

Die Balkendiagramme in Abbildung 10 weisen eine ISO-dosisabhängige Zunahme der Viabilität auf. Colo320 zeigte bei den Konzentrationen von 1 µmol und 10 µmol eine maximale Zunahme auf 240% im Vergleich zur nicht behandelten Kontrolle (240,4% ± 17,58%). Bei der Zelllinie SW480 kam es zu einem Anstieg auf 150% (149,14% ± 14,48%). Beide Ergebnisse erreichten statistische Signifikanz (Colo320 p<0,005; SW480 p<0,05). Demzufolge konnte in KRAS-MT als auch bei KRAS-WT Zellen unter ISO-Stimulation bei Konzentrationen von 1 µmol und 10 µmol eine vermehrte Viabilität nachgewiesen werden. Um dies zu bestätigen, wurden weitere KRAS-WT (HT29) und KRAS-MT (HCT 116) Zelllinien untersucht. Hier zeigte sich ebenfalls unter 10 µmol ISO-Stimulation eine hochsignifikante Zunahme der Viabilität (HT29 p<0,0001; HCT116 p<0,001), siehe Abbildung 11.



#### 4.2. Einfluss der adrenergen Stimulation auf die Zellzyklusphasen

Nachdem eine Zunahme der Zellviabilität unter 10µmol ISO-Stimulation sowohl in KRAS-MT als auch KRAS-WT Zelllinien hochsignifikant war, sollte der Einfluss einer 10µmol ISO-Stimulation auf die Zellzyklusphasen näher untersucht werden.

Die G0-Phase beschreibt einen inaktiven Zellzustand, der oft reversibel ist [Rassow et al., 2016]. Die Zelle kann dabei einerseits ihre Teilungsaktivität komplett einstellen, andererseits sich aber auch bei bestehender Regenerationsfähigkeit in einem Ruhezustand befinden [Rassow et al., 2016]. Die G1-Phase gilt allgemein als Wachstumsphase und dient zur Vorbereitung auf die Zellteilung [Rassow et al., 2016]. Die S-Phase wird durch die dort stattfindende DNA-Replikation gekennzeichnet. Die Zell-DNA liegt folglich am Ende dieser Phase in zweifacher Menge vor [Rassow et al., 2016]. Als G2/M-Phase wird diejenige Phase im Zellzyklus bezeichnet, in der die Zellteilung abschließend vorbereitet und durchgeführt wird [Rassow et al., 2016]. Die Zellzahl hat sich schließlich verdoppelt. Die Zellproliferation verläuft somit in der S- und G2/M-Phase. Die Summe beider Phasen sollte demnach in diesem Versuch untersucht werden.

Die Zellzyklusphasen wurden nach der 10µmol ISO-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle analysiert. Die absoluten Werte der unbehandelten Kontrollen wurden zur besseren Darstellung auf einen 100%-Ausgangswert normiert. Alle vier Zelllinien zeigten eine Zunahme des S- und G2/M-Phasen-Anteils im Zellzyklus unter 10µmol ISO. HCT116 (124,8% ± 6,11%), HT29 (157,7% ± 15,99%) und Colo320 (127,7% ± 4,85%) wiesen signifikante Werte

auf. Bei SW480 (132,8% ± 18,66%) war ein Trend in der Verschiebung des Zellzyklus hin zu einer gesteigerten Proliferation zu erkennen. Insgesamt sind diese Ergebnisse kongruent zu den Resultaten aus 4.1. Durch eine adrenerge Stimulation zeigte sich ein höherer Anteil der wachstumsspezifischen Phasen im Zellzyklus. Ein Unterschied im KRAS-Mutationsstatus, besonders unter 10µmol ISO-Behandlung, ließ sich nicht darstellen. Sowohl KRAS-MT als auch KRAS-WT KRK Zelllinien wiesen signifikante Werte auf.

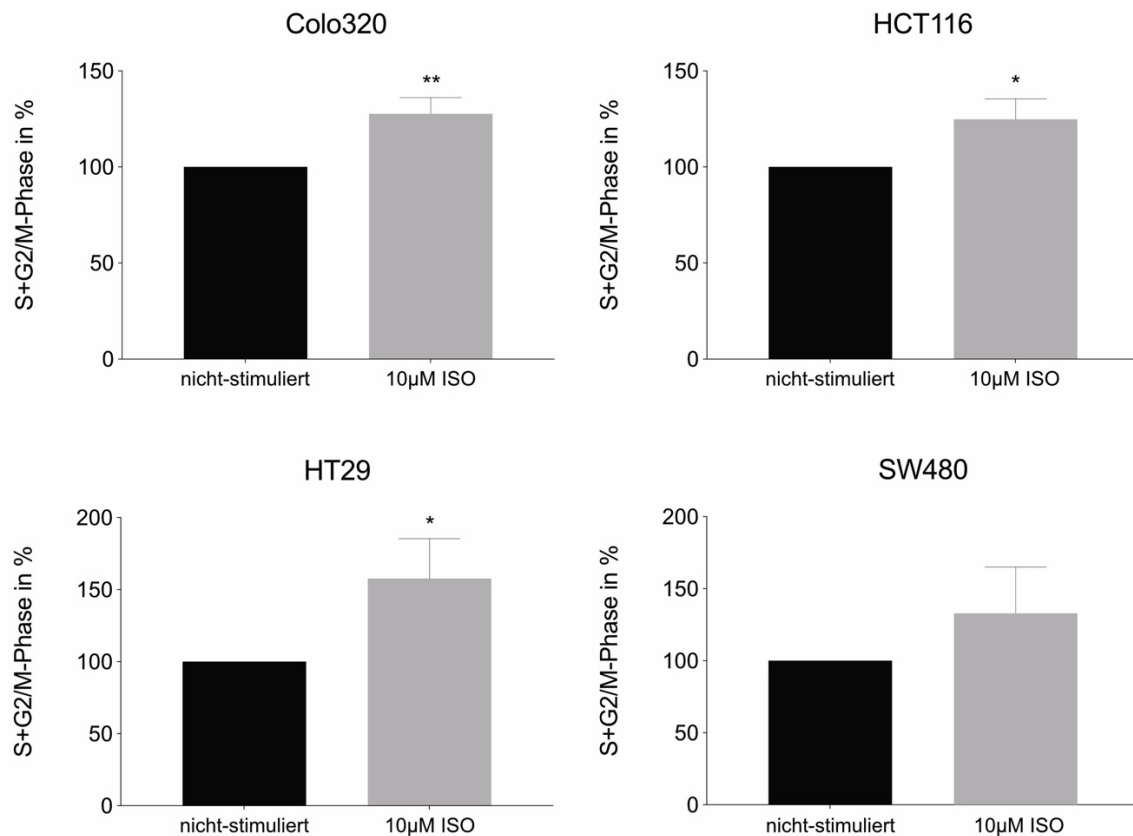
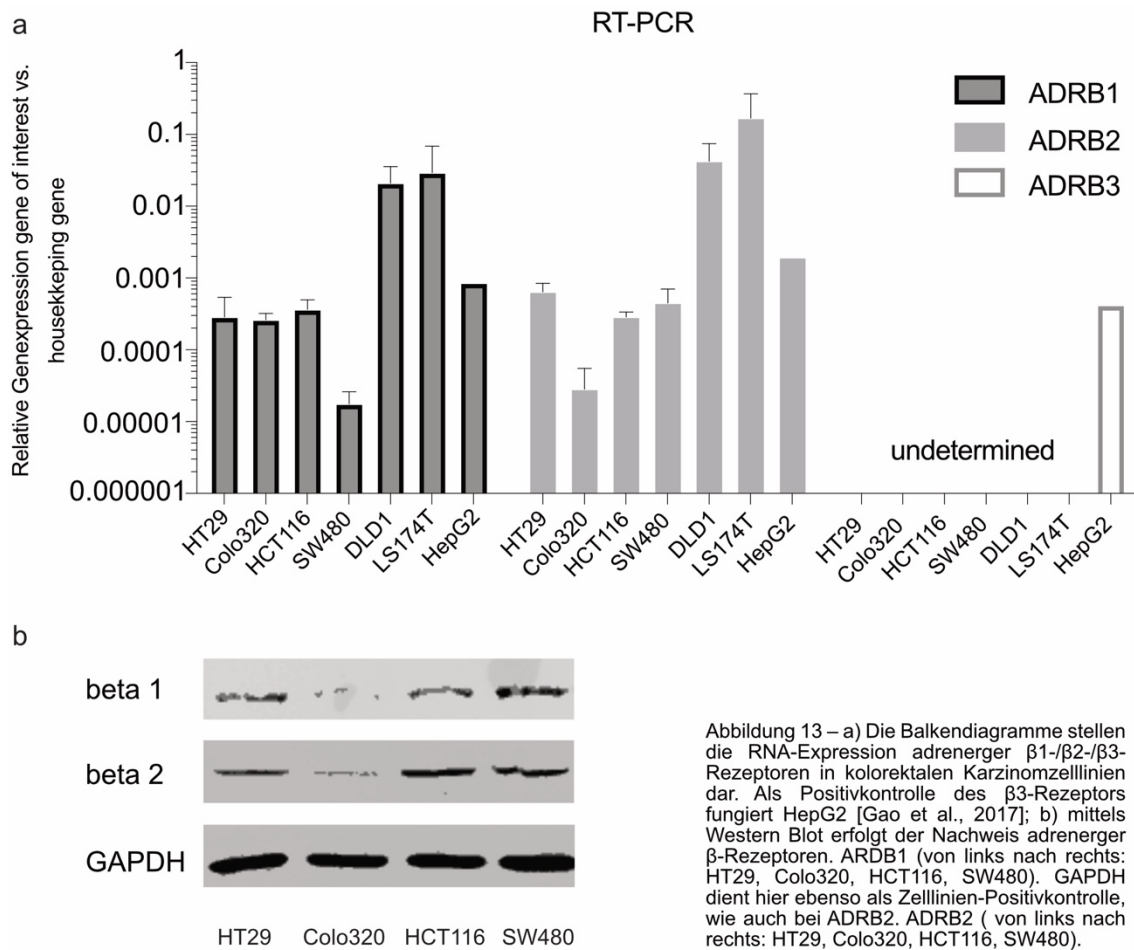


Abbildung 12 – Die Balkendiagramme vergleichen die Summe der Zellzyklusphasen S+G2/M-Phase im nicht-stimulierten und mit 10µmol ISO behandelten Zustand. Der absolute Wert der nicht-stimulierten S+G2/M-Phase wurde für den relativen Vergleich mit einer ISO-Behandlung auf 100% normiert. \*p<0,05, \*\*p<0,01.

### 4.3. Nachweis der Expression adrenerger $\beta$ -Rezeptoren auf RNA-, Protein- und immunhistochemischer Ebene

Unsere Arbeitsgruppe konnte in der Vergangenheit zeigen, dass die KRAS-induzierte Tumorgenese im PDAC (pancreatic ductal adenocarcinoma) kathecholaminabhängig über adrenerge  $\beta$ 2-Rezeptoren akzeleriert wird [Renz et al., 2018]. Hier sollte nun die Expression adrenerger  $\beta$ -Rezeptoren in KRK Zelllinien untersucht werden. Der Nachweis erfolgte zunächst mittels RT-PCR und Western Blot. Zudem wurden zwei weitere KRK Zelllinien für die folgenden

Versuchsreihen zusätzlich untersucht. DLD1 und LS174T als KRAS-MT Zelllinien.



Um die Expression adrenerger Rezeptoren auf RNA-Ebene zu detektieren, wurde eine RT-PCT durchgeführt. Die Ergebnisse werden in Abbildung 13 gezeigt.

Abbildung 13a demonstriert, dass in allen sechs KRK Zelllinien sowohl der adrenerge  $\beta$ 1- als auch  $\beta$ 2-Rezeptor exprimiert wird. Die Expression des  $\beta$ 3-Rezeptors konnte hingegen nicht belegt werden. HepG2-RNA diente in diesem Falle als Positivkontrolle, welche in der RT-PCR den adrenergen  $\beta$ 3-Rezeptor exprimiert. Demzufolge ist zu vermuten, dass primär über  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Rezeptoren adrenerges Signalling die Zellproliferation modulieren könnte. In der Expression adrenerger  $\beta$ -Rezeptoren zeigt sich auf RNA-Ebene kein signifikanter Unterschied im KRAS-Status. Um die Expression auf Proteinebene zu bestätigen, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. ADRB1 (atomare Masse = 55kDa) und ADRB2 (atomare Masse = 46kDa) wurden sowohl in KRAS-

MT Zelllinien (HCT116, SW480), als auch in KRAS-WT Zelllinien (HT29, Colo320) exprimiert (Abbildung 13b).

Zusätzlich soll die Expression adrenerger  $\beta$ 2-Rezeptoren im Normalgewebe des Kolons verschiedener Patient\*Innen immunhistochemisch untersucht werden.

Die immunhistochemischen Präparate in Abbildung 14 zeigen eine deutliche Expression des Rezeptors in der Schleimhaut. Besonders konzentriert ist er in der Lamina epithelialis mucosae mit leichtem Übergang in die Lamina propria der Tunica Mucosa. Das Vorliegen kolorektaler adrenerger  $\beta$ 2-Rezeptoren konnte demzufolge im humanen Kolongewebe immunhistochemisch bestätigt werden.

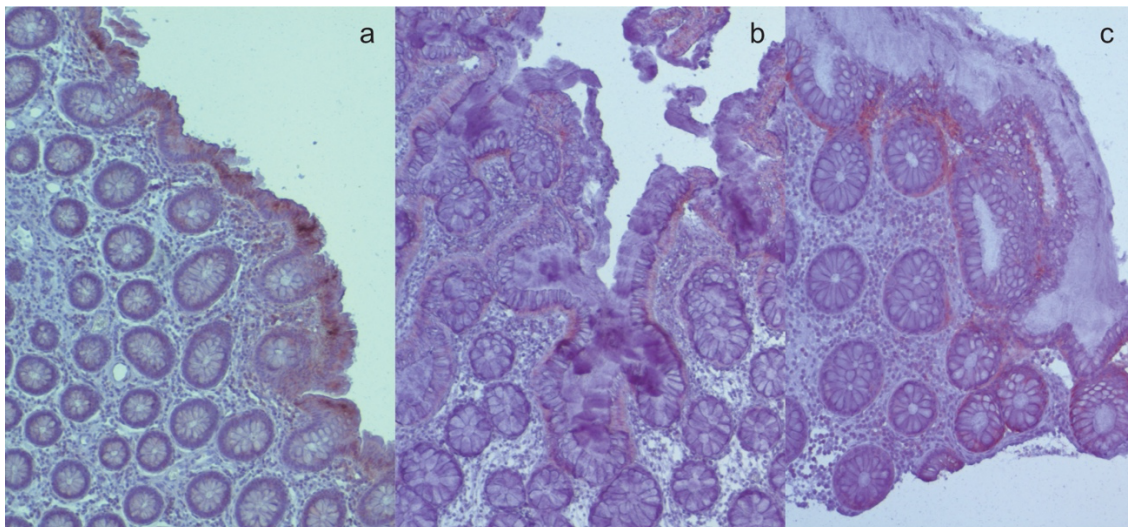
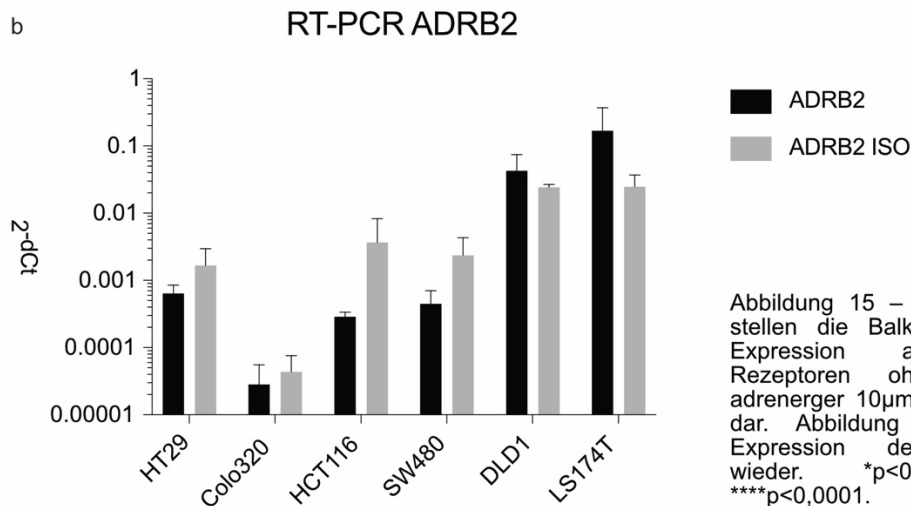
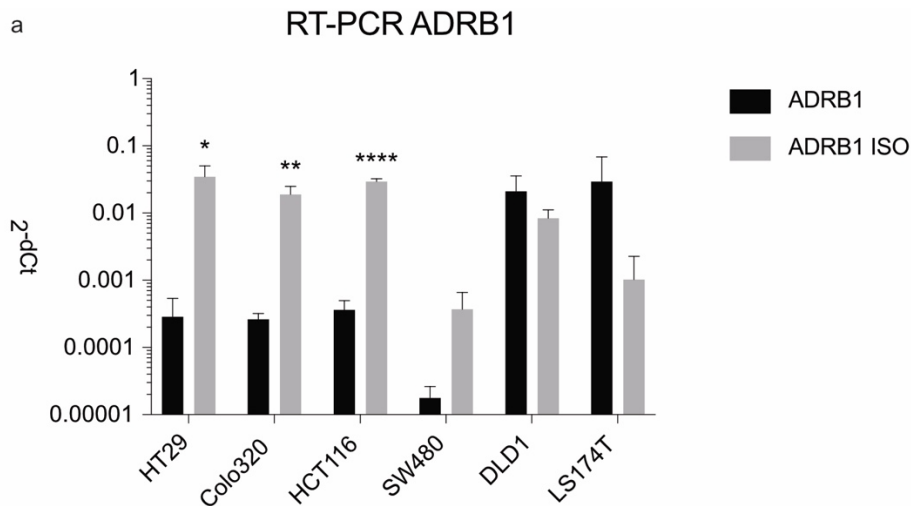


Abbildung 14 – Immunhistochemischer Nachweis der Expression adrenerger beta2-Rezeptoren im kolorektalen Normalgewebe. Die Abbildungen a-c verdeutlichen dies anhand der Präparate von drei verschiedenen Patient\*Innen.

Nach Behandlung mit 10 $\mu$ mol ISO, sollte die Expression des adrenergen  $\beta$ 1-Rezeptors in KRK Zelllinien im Zustand nicht behandelt vs. behandelt verglichen werden (siehe Abbildung 15a). Ein signifikanter Unterschied besteht bei HT29, Colo320 und HCT116 ( $p < 0,05$ ). Bei den Zelllinien SW480, DLD1 und LS174T hingegen finden sich keine signifikanten Ergebnisse, bei DLD1 und LS174T tendenziell sogar niedrigere Werte auf RNA-Ebene unter 10 $\mu$ mol ISO-Stimulation.



Die Veränderung der Expression des adrenergen  $\beta$ 2-Rezeptors durch eine adrenerge Stimulation wird in Abbildung 15b dargestellt. Unter 10 $\mu$ mol ISO war diese wie beim adrenergen  $\beta$ 1-Rezeptor tendenziell bei den Zelllinien HT29, Colo320, HCT116 und SW480 zunehmend. DLD1 und LS174T zeigten ebenso wie beim adrenergen  $\beta$ 1-Rezeptor eine verminderte Expression. Eine Signifikanz der Werte bestand jedoch in beiden Fällen nicht ( $p > 0,05$ ).

Sowohl der adrenerge  $\beta$ 1- als auch  $\beta$ 2-Rezeptor wird von allen sechs KRK Zelllinien exprimiert und unter ISO-Behandlung kann es zu einer erhöhten Expression mit teilweise hochsignifikanten Werten kommen.



#### 4.4. Expression adrenerger $\alpha$ -Rezeptoren auf RNA-Ebene

Da adrenerge Signalwege nicht nur über  $\beta$ -Rezeptoren, sondern potenziell auch über  $\alpha$ -Rezeptoren beeinflusst werden könnten, sollte deren Expression in KRK Zelllinien analysiert werden.

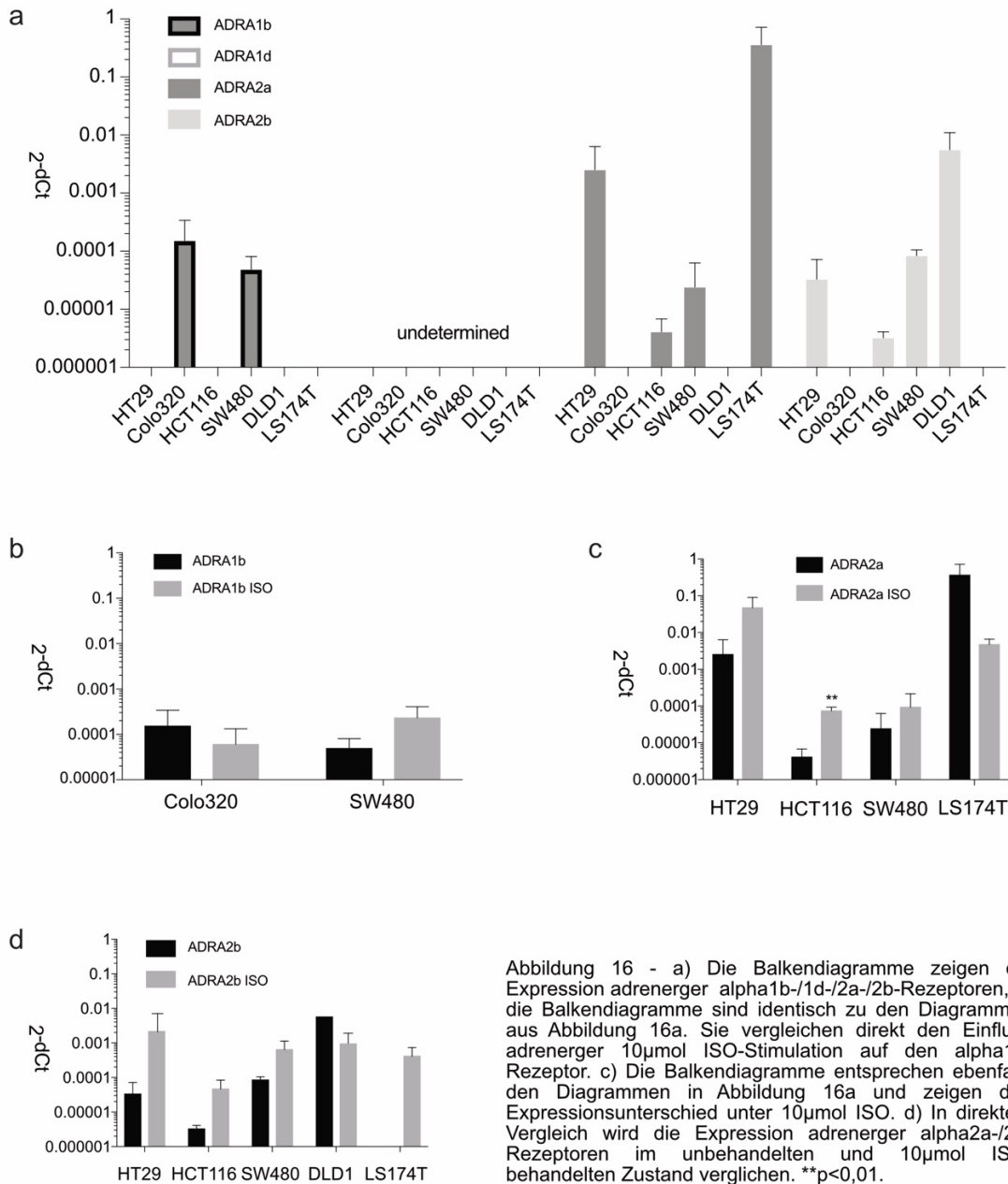


Abbildung 16 - a) Die Balkendiagramme zeigen die Expression adrenerger  $\alpha$ 1b-/1d-/2a-/2b-Rezeptoren, b) die Balkendiagramme sind identisch zu den Diagrammen aus Abbildung 16a. Sie vergleichen direkt den Einfluss adrenerger  $10\mu\text{mol}$  ISO-Stimulation auf den  $\alpha$ 1b-Rezeptor. c) Die Balkendiagramme entsprechen ebenfalls den Diagrammen in Abbildung 16a und zeigen den Expressionsunterschied unter  $10\mu\text{mol}$  ISO. d) In direktem Vergleich wird die Expression adrenerger  $\alpha$ 2a-/2b-Rezeptoren im unbehandelten und  $10\mu\text{mol}$  ISO-behandelten Zustand verglichen. \*\*p<0,01.

Adrenerge  $\alpha$ 1b-Rezeptoren wurden lediglich in Colo320- und SW480-Zelllinien exprimiert. A1d-Rezeptoren waren in keiner Zelllinie nachweisbar. Dagegen konnte eine Expression adrenerger  $\alpha$ 2a- und  $\alpha$ 2b-Rezeptoren sowohl bei HT29, als auch bei Colo320 und SW480 belegt werden. Der adrenerge  $\alpha$ 2a-Rezeptor zeigte sich zudem bei LS174T, der  $\alpha$ 2b-Rezeptor bei DLD1 (Abbildung 16a).



Im weiteren wurde das Expressionsmuster der  $\alpha$ -Rezeptoren in KRK Zelllinien unter 10 $\mu$ mol ISO-Behandlung untersucht. Trotz ISO wurde unverändert kein  $\alpha$ 1d-Rezeptor exprimiert. Der  $\alpha$ 1b-Rezeptor hingegen war bei SW480 tendenziell unter 10 $\mu$ mol ISO vermehrt. Nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) nahm er wiederum bei Colo320 tendenziell ab.

Als einzige Zelllinie zeigte HCT116 eine signifikant vermehrte Expression von  $\alpha$ 2a-Rezeptoren unter der adrenergen Stimulation ( $p < 0,01$ ). Eine Zunahme, jedoch nicht signifikant, lag bei HT29 und SW480 vor, eine Abnahme dagegen bei LS174T ( $p > 0,05$ ). Ähnlich verhielt es sich beim  $\alpha$ 2b-Rezeptor. HT29, HCT116 und SW480 zeigten unter der 10 $\mu$ mol ISO-Behandlung erneut tendenziell eine Zunahme der Expression, vermindert war sie hingegen bei DLD1. Unter adrenerger Stimulation konnte zudem der  $\alpha$ 2b-Rezeptor bei LS174T nachgewiesen werden, obwohl dieser unstimuliert nicht vorhanden war.

Unabhängig vom KRAS-Mutationsstatus findet die Expression der  $\alpha$ -Rezeptoren ebenso der  $\beta$ -Rezeptoren in den sechs KRK Zelllinien statt. Auffallend ist, dass unter ISO-Behandlung besonders adrenerge  $\beta$ -Rezeptoren eine erhöhte Expression mit teilweise hochsignifikanten Werten vorweisen.

#### 4.5. Adrenerge $\beta$ -Rezeptorblockade unabhängig einer Mikrosatelliteninstabilität

Nachdem adrenerge  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren auf RNA- und Protein-Ebene nachgewiesen werden konnten und ein Einfluss des KRAS-Mutationsstatus widerlegt wurde, sollte die Auswirkung einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptorblockade auf die Viabilität von KRK Zelllinien unter 10 $\mu$ mol ISO-Behandlung untersucht werden. Die adrenergen  $\beta$ -Rezeptoren wurden zunächst mit dem nicht-selektiven  $\beta$ -Blocker Propranolol und den selektiven  $\beta$ -Blockern Atenolol ( $\beta$ 1) und ICI118,551 ( $\beta$ 2) gehemmt. Im Folgeversuch wurde der Einfluss einer Blockade der adrenergen  $\alpha$ -Rezeptoren durch die selektiven  $\alpha$ -Blocker Doxazosin ( $\alpha$ 1) und Yohimbin ( $\alpha$ 2) untersucht.

Propranolol als nicht-selektiver  $\beta$ -Blocker hemmte sowohl in KRAS-MT, als auch in KRAS-WT Zelllinien die Proliferation signifikant ( $p < 0,05$ : Colo320, HT29, LS174T, SW480). Ebenfalls wirkten die selektiven  $\beta$ -Blocker auf KRAS-MT und KRAS-WT Zelllinien signifikant hemmend ( $p < 0,05$  –  $\beta$ 1-Blocker: Colo320, HT29, LS174T, SW480;  $p < 0,05$  –  $\beta$ 2-Blocker: Colo320, HT29, LS174T, SW480).

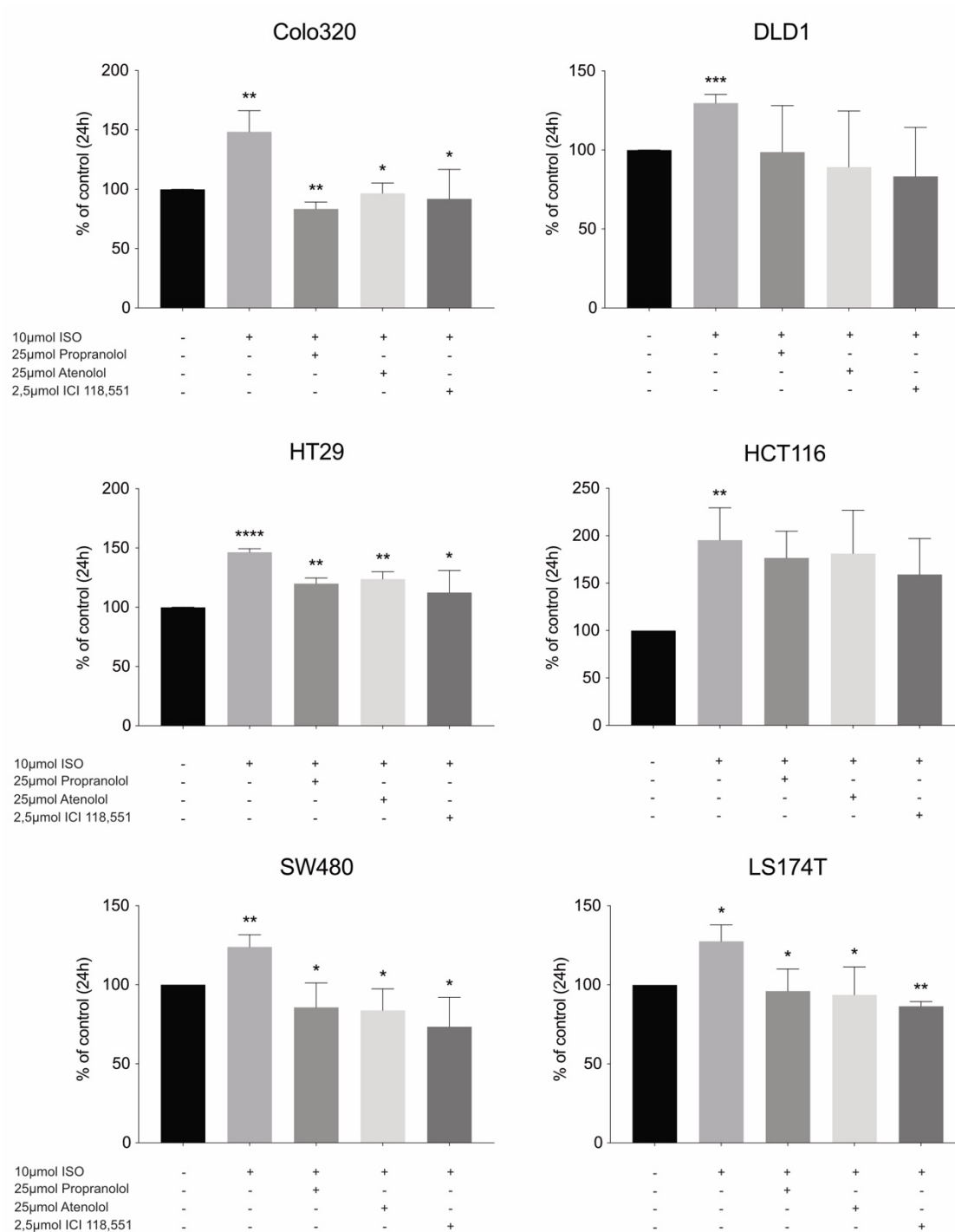


Abbildung 17 – Die Balkendiagramme zeigen den Einfluss einer nichtselektiven bzw. selektiven beta-Blocker-Rezeptorhemmung auf die Proliferation KRC Zelllinien unter 10µmol-ISO-Behandlung über 24h, normiert auf den Wert der 10µmol-ISO (links: MSS, rechts: MSI). Der 10µmol-ISO-Wert wurde auf den Wert ohne Behandlung normiert. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

Die Viabilität der KRC Zelllinien Colo320, HT29, LS174T und SW480 wurde dementsprechend durch alle verwendeten  $\beta$ -Blocker signifikant gehemmt. HCT116 und DLD1 konnten von keinem  $\beta$ -Blocker, und damit über keinen  $\beta$ -adrenergen Signalweg signifikant gehemmt werden (Abbildung 16).

Die Untersuchungen zeigen, dass der KRAS-Status in Bezug auf die Sensitivität gegenüber  $\beta$ -Blockern keinen Einfluss zu haben scheint. Interessanterweise

weisen aber die Zelllinien DLD1 und HCT116, bei denen eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) vorliegt, keine Sensitivität gegenüber  $\beta$ -Blockern auf. LS174, ebenfalls MSI, zeigt wiederum eine Sensitivität.

#### 4.6. Adrenerge $\alpha$ -Rezeptorblockade abhängig einer Mikrosatelliteninstabilität

Doxazosin als selektiver  $\alpha$ 1-Blocker schränkte die Proliferation aller sechs Zellreihen signifikant bei 40 $\mu$ mol ein ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 17). Signifikante Werte befanden sich zudem bei 30 $\mu$ mol Doxazosin in HT29, HCT116, LS174T und SW480 ( $p < 0,05$ ). Yohimbin als selektiver  $\alpha$ 2-Blocker hemmte die Zelllinien DLD1, HCT116, LS174T und SW480 teilweise hochsignifikant in den Konzentrationen 200 $\mu$ mol und 300 $\mu$ mol ( $p < 0,05$ ). Hingegen wurden die Zelllinien Colo320 und HT29 durch Yohimbin nur eingeschränkt inhibiert.

Es fällt auf, dass MSI KRK Zelllinien eine ausgeprägte und teilweise hochsignifikante Sensitivität gegenüber adrenergen  $\alpha$ -Blockern aufweisen. Adrenerge  $\alpha$ 1-Blocker zeigen zwar auch eine signifikante Wirkung gegenüber MSS Zelllinien (Colo320, HT29, SW480), eine Blockade des adrenergen  $\alpha$ 2-Rezeptors ist jedoch MSS-unabhängig. Wir vermuten deswegen, dass die Sensitivität von KRK Zelllinien gegenüber  $\alpha$ -Blockern vom Mikrosatellitenstatus abhängen könnte. Denn wie wir zeigen konnten, ist bei MSI Zelllinien im Gegensatz zu einer  $\beta$ -Rezeptorblockade das Ansprechen auf eine  $\alpha$ -Rezeptorblockade geschlossen signifikant.

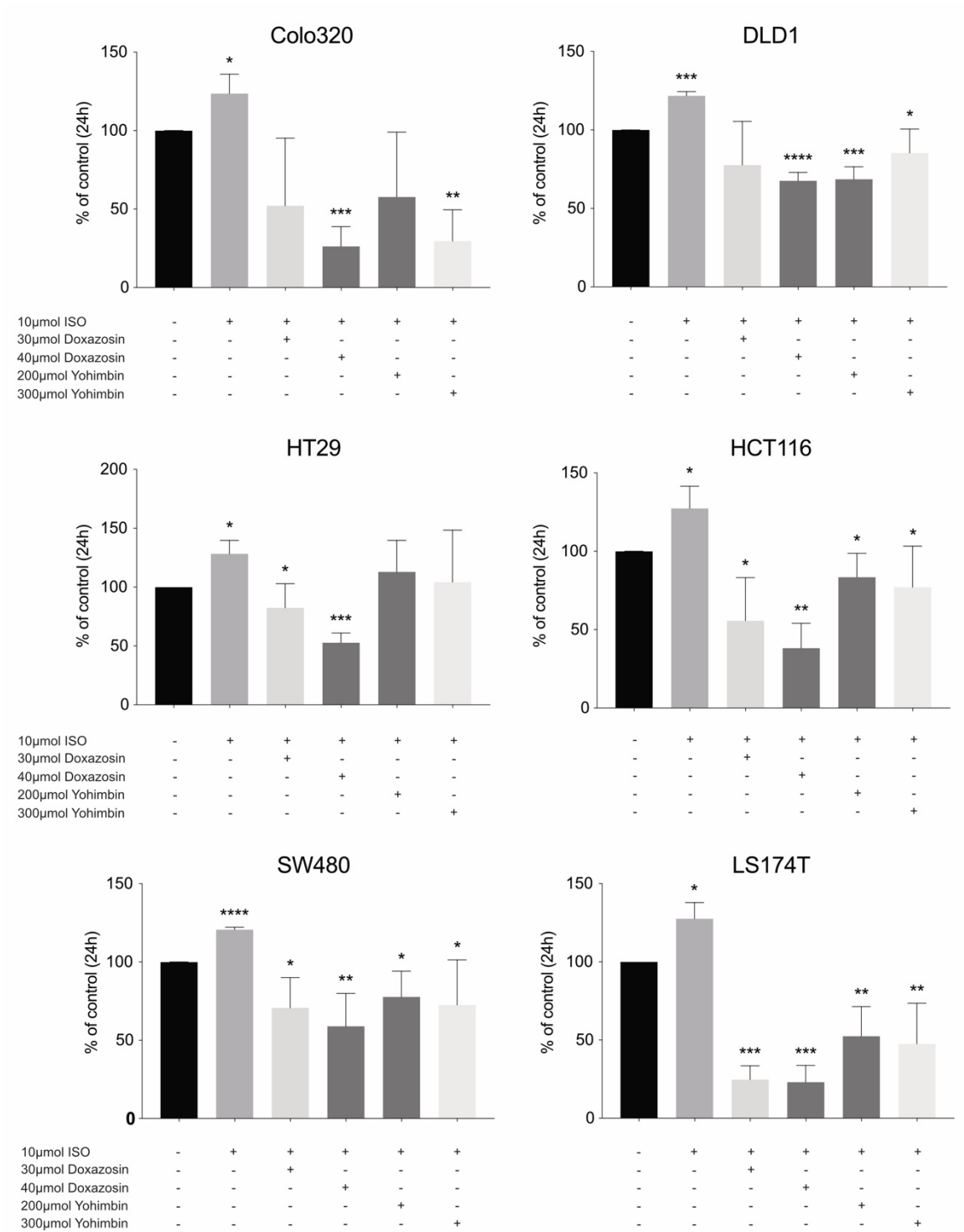
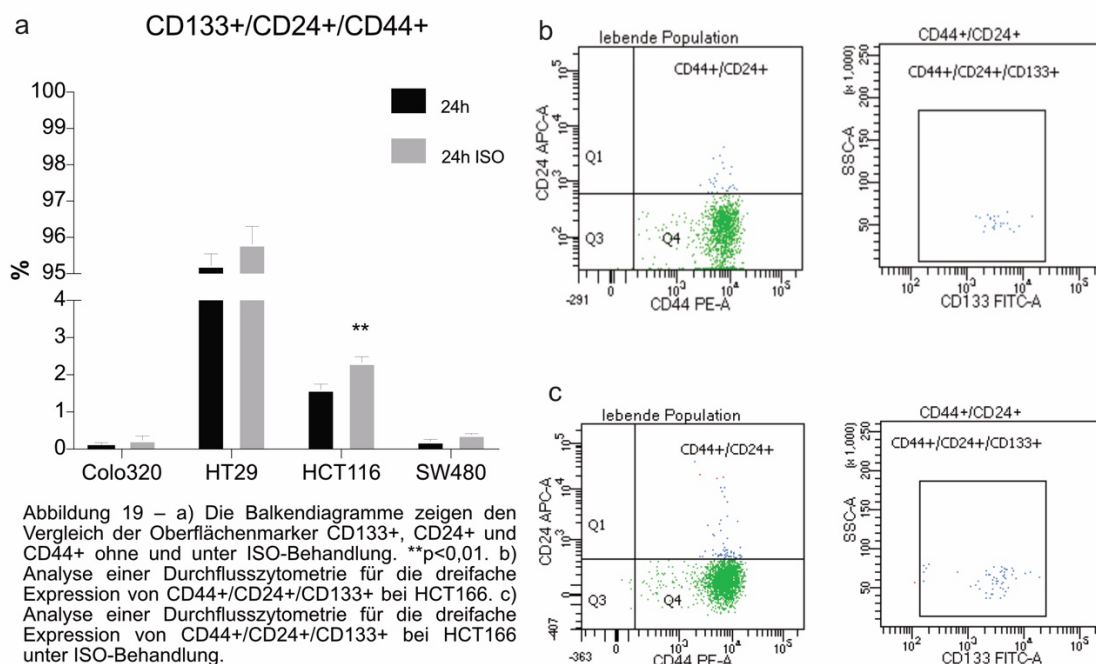


Abbildung 18 - Die Balkendiagramme zeigen den Einfluss einer selektiven alpha-Blocker-Hemmung auf die Proliferation kolorektaler Karzinomzelllinien unter 10µmol-ISO über 24h, normiert auf den 10µmol-ISO-Wert (links: MSS; rechts: MSI). Der 10µmol-ISO-Wert wurde auf den Wert ohne Behandlung normiert. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

#### 4.7. Signifikante Zunahme der Krebsstammzellpopulation in MSI KRK Zelllinien unter ISO-Behandlung

In der Literatur werden CD133, CD24 und CD44 als klassische Marker für Krebsstammzellen (cancer stem cells; CSC) beschrieben, die unter anderem Tumorwachstum, Chemoresistenz oder das Auftreten von Rezidiven beeinflussen können [Liou et al., 2019; Merlos-Suarez et al., 2011; Dalerba et al., 2007]. In wieweit sich Krebsstammzellpopulationen durch adrenerge Signalwege beeinflussen lassen, sollte im folgenden Versuch untersucht werden. Die Eigenschaften eines Tumors könnten dadurch ebenfalls moduliert werden.

Die Population an dreifach positiven Zellen (CD133+/CD44+/CD24+) zeigte sich unter einer 10µmol ISO-Behandlung signifikant nur in der MSI Zelllinie HCT116. 1,61% ± 0,15% HCT116-Zellen waren nach 24h positiv, unter 10µmol ISO steigerte sich die Expression hingegen um fast die Hälfte auf 2,33% ± 0,15% (p<0,01). In dem MSS Zelllinien SW480, HT29 und Colo320 zeigte sich kein Unterschied.



Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Expression der Stammzellpopulation unter ISO-Behandlung in MSI Zelllinien signifikant zunimmt, bei MSS Zelllinien lässt sich dies nicht feststellen. Wir vermuten folglich, dass

adrenerges Signalling die Stammzellmarkerexpression im KRK abhängig vom Mikrosatellitenstatus beeinflussen könnte.

## 5. DISKUSSION

In dieser Arbeit konnte ein proliferationssteigernder Effekt von ISO, einem synthetisch racemischen Noradrenalin-Derivat, in etablierten KRK Zelllinien bestätigt werden. Durch Blockade der adrenergen  $\beta$ -Rezeptoren konnte der proliferative Effekt unter ISO-Stimulation wiederum aufgehoben werden. Dies erfolgte unabhängig des KRAS-Mutationsstatus. Meine Ausgangshypothese konnte ich somit nicht bestätigen. Ein Unterschied in der Sensitivität von  $\beta$ -Blockern abhängig vom KRAS-Status ist im KRK nicht erkennbar. Es zeigte sich jedoch, dass MSI KRK Zelllinien im Gegensatz zu MSS KRK Zelllinien durch eine Blockade der adrenergen  $\alpha$ -Rezeptoren und nicht durch eine adrenerge  $\beta_1$ -/ $\beta_2$ -Rezeptorblocker in ihrer Zellviabilität nach ISO-Stimulation signifikant inhibiert werden können. Zudem zeigte HCT116 als MSI KRK Zelllinie alleinig eine hochsignifikante Zunahme des Krebsstammzellkompartments unter ISO-Stimulation. Dieser Effekt ließ sich bei MSS Zellen nicht nachweisen und scheint einzigartig für MSI Zellen zu sein. Diese Daten legen nahe, dass MSI Zellen sensitiver gegenüber  $\alpha$ -adrenergen Signalwegen sind.

### 5.1. Sensitivität der KRK Zelllinien gegenüber $\beta$ -Blockern unabhängig des KRAS-Mutationsstatus

In allen sechs in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien wurde eine Zunahme der Zellviabilität nach Behandlung mit 10  $\mu$ mol ISO nachgewiesen. Bereits im Vorfeld zeigte Coelho et al. ein signifikantes Wachstum von HT29 nach Stimulation mit ISO [Coelho et al., 2015]. Wong et al. wies außerdem nach, dass Zellwachstum über adrenerge Signalwege nicht nur mittels ISO, sondern auch durch Adrenalin bei SW480 gesteigert werden konnte [Wong et al., 2011; Masur et al., 2001]. In dieser Arbeit nun wurde erstmals ein proliferativer Effekt von ISO in den KRK Zelllinien Colo320 und LS174T beschrieben.

Durch Chin et al., 2016. wurde berichtet, dass durch Blockade adrenerger  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Rezeptoren das Zellwachstum in KRK Zelllinien (u.a. DLD1, HCT116, HT29, SW480) abnehmen kann. Dieser Effekt wurde bei Chin et al., 2016. jedoch nicht für die Zelllinien Colo320 und LS174T untersucht. Erstmals bestätigten wir die Hemmung der Zellproliferation auch für die KRK Zelllinien Colo320 und LS174T durch eine Blockade adrenerger  $\beta$ -Rezeptoren.

Unter adrenerger  $\beta$ -Rezeptorblockade zeigte sich jedoch in der Zellviabilität kein Unterschied abhängig des KRAS-Mutationsstatus. Die Ausgangshypothese, dass KRK Zelllinien abhängig ihres KRAS-Mutationsstatus sensitiv auf eine  $\beta$ -Blockertherapie reagieren, muss konsequent verworfen werden. Sowohl in KRAS-WT, HT29 und Colo320, als auch in KRAS-MT Zelllinien, SW480 und LS174T, konnte die durch eine ISO induzierte Zellviabilitätszunahme durch  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Blocker signifikant gehemmt werden. DLD1 und HCT116 konnten diesen Effekt hingegen nicht nachweisen. Ähnliche Ergebnisse lieferte auch Chin et al., 2016. HCT116 ließ sich nach insgesamt 72h Inkubation weder durch Propranolol (0-120 $\mu$ mol), Atenolol (0-140 $\mu$ mol) noch ICI 118,551 (0-100 $\mu$ mol) signifikant hemmen [Chin et al., 2016]. Hier wurden die Zellen allerdings vorher nicht mit ISO behandelt. DLD1 ließ sich lediglich durch 120 $\mu$ mol Propranolol und ICI 118,551 (60-100 $\mu$ mol) signifikant inhibieren [Chin et al., 2016].

KRAS-MT Zelllinien können durch ihren KRAS-Codon-Mutationsstatus noch einmal weiter differenziert werden. Bereits De Roock et al. konnten 2010 nachweisen, dass die Aggressivität des KRK vom KRAS-Codon-Mutationsstatus abhängen kann. [De Roock et al., 2010]. KRK, die im Codon 13 mutiert waren, zeigten ein vermehrt malignes Potenzial und ein erhöhtes Bestreben zur Metastasierung im Vergleich zu KRK mit Codon-12-Mutationen [Modest et al., 2011; De Roock et al., 2010]. Modest et al. bestätigten diese Hypothese [Modest et al., 2011]. In der vorliegenden Arbeit sprachen KRAS-MT KRK Zelllinien unterschiedlich auf eine adrenerge  $\beta$ -Rezeptorblockade an. So konnten HCT116 und DLD1 im Vergleich zu SW480 und LS174T nicht inhibiert werden. HCT116 und DLD1 weisen wiederum eine Mutation im Codon G13D auf. Im Gegensatz dazu liegt bei LS174T eine Mutation im Codon G12D vor, bei SW480 im Codon G12V. Durch Variationen im KRAS-Codon zeigte sich bereits ein unterschiedliches Ansprechen des KRK im klinischen Setting. Für unsere Arbeit jedoch könnte es eine Erklärung dafür liefern, dass sich eine adrenerge  $\beta$ -Rezeptorblockade unterschiedlich auf KRAS-MT KRK Zelllinien auswirkt.

Interessanterweise unterscheiden sich die KRK Zelllinien im Ansprechen auf eine  $\beta$ -Blocker-Therapie in Abhängigkeit vom Mikrosatellitenstatus. MSS Zelllinien (Colo320, HT29, SW480) können durch jedweden  $\beta$ -Blocker signifikant gehemmt werden. Ein einheitliches Verhalten lässt sich bei MSI Zelllinien nicht darstellen.



MSI Zelllinien sind durch ein nicht-funktionierendes Mismatch-Repair-System gekennzeichnet [Buecher et al., 2012; Vilar et al., 2010]. Normalerweise wird eine fehlerhafte DNA-Replikation mittels Komplexbildung der Mismatch-Repair-Proteine erkannt und behoben [Vilar et al., 2010; Oki et al., 1999]. Weisen diese Proteine Mutationen auf, ist eine Komplexbildung nicht mehr möglich und fehlerhafte Replikationen akkumulieren in Mikrosatelliten [Vilar et al., 2010]. Dies hat eine Instabilität jener kurzen, repetitiven DNA-Sequenzen zur Folge [Buecher et al., 2012]. Die Tumorentstehung kann somit begünstigt werden. MSI Tumore können demnach eine hohe Gesamtmutationslast und eine gesteigerte Expression von Neoantigenen vorweisen [Kawakami et al., 2015; Schumacher et al., 2015]. Neoantigene bezeichnen Proteine, die von der Krebszelle sezerniert und auf der Zelloberfläche dem körpereigenen Immunsystem präsentiert werden [Lu et al., 2015; Schuhmacher et al., 2015]. Es scheint, dass dadurch MSI Tumore gegenüber Immuntherapien, insbesondere Immun-Checkpoint-Inhibitoren, sensitiver werden und eine MSI möglicherweise als prädiktiver Biomarker fungiert [Lee et al., 2016].

Als MSI Zelllinie konnte LS174T ebenfalls durch alle  $\beta$ -Blocker signifikant gehemmt werden, bei den weiteren MSI Zelllinien DLD1 und HCT116 war eine Inhibition nicht möglich. Der Mikrosatellitenstatus alleine kann das Verhalten von DLD1 und HCT116 nur partiell erklären.

Dies muss man als Ausdruck der Tumorheterogenität interpretieren. Dieser kann nur durch eine personalisierte bzw. stratifizierte Therapie begegnet werden. Unter einer personalisierten Therapie ist eine auf den/die Patient\*in individuell zugeschnittene Therapie zu verstehen, u.a. unter Nutzung von Tumorbiomarkern [McAlpine et al., 2019]. Die Biomarkerdiagnostik umfasst nicht nur das Auslesen des genetischen Codes, sondern alle Möglichkeiten zur Charakterisierung individueller Besonderheiten. Auf molekularer Ebene sind dies die diagnostischen Analysen der genomischen DNA, der mRNA und der Proteine. In den meisten Fällen fehlen allerdings nach wie vor klinisch geeignete Biomarker. Denn die Biologie vieler Tumore ist heterogen und komplex. Aufgrund zahlreicher genetischer Unterschiede kann die Ansprechrate von Tumorthérapien stark beim einzelnen Patienten variieren [McDermott et al., 2011]. Die genetische Komplexität spiegelt sich auch in unseren Versuchen und den unterschiedlichen Ansprechraten der einzelnen KRK Zelllinien auf eine  $\beta$ -Blockertherapie wider.

## 5.2. MSI Zelllinien sind gegenüber adrenerger $\alpha$ -Rezeptorblockade sensitiv

In der Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass KRK Zelllinien nicht nur adrenerge  $\beta$ -Rezeptoren, sondern auch adrenerge  $\alpha$ -Rezeptoren exprimieren. Nach Blockade der adrenergen  $\alpha$ -Rezeptoren durch die selektiven Blocker Doxazosin ( $\alpha_1$ ) und Yohimbin ( $\alpha_2$ ) zeigte sich, dass MSI KRK Zelllinien nach ISO-Behandlung im Vergleich zu MSS KRK Zelllinien durch eine  $\alpha$ -Rezeptorblockade signifikant in ihrer Proliferation inhibiert wurden.

Bei einer Konzentration von 40  $\mu$ mol Doxazosin fällt auf, dass sowohl MSS als auch MSI signifikant gehemmt werden ( $p < 0,05$ ). Teilweise sind die Werte extrem niedrig, beispielsweise wird die Viabilität von LS174T um 75% reduziert. In unserer Arbeit konnte bei MSI KRK Zelllinien jedoch keine Expression adrenerger  $\alpha_1$ -Rezeptoren nachgewiesen werden. Lediglich Colo320 und SW480 als MSS KRK Zelllinien exprimierten  $\alpha_{1b}$ -Rezeptoren. Das lässt vermuten, dass insbesondere eine Konzentration von 40  $\mu$ mol Doxazosin mehr toxisch und folglich apoptotisch wirkt, als dass ein Zellwachstum gehemmt werden könne. Denn Doxazosin selbst aktiviert vor allem proapoptotische Kaskaden wie Bax- oder Caspasen-regulierte Signalwege [Garrison et al., 2006]. Bereits bei einer Dosis von 25  $\mu$ mol wurde im Prostatakarzinom eine Apoptoserate von 21,5%  $\pm$  1,3% nach 24h mittels MTT-Assay angegeben [Garrison et al., 2006]. Ähnliche Angaben werden auch für das KRK gemachtl. Für Doxazosin liegt bei HT29 die  $IC_{20}$ -Konzentration bei 23  $\mu$ mol [de Marcondes et al., 2016]. Zum exakteren Einschätzen einer toxischen Wirkung, vor allem im Hinblick auf die Zelllinien Colo320 und SW840, hätten weitere Versuchsreihen mit unterschiedlichen Doxazosin-Konzentrationen und zusätzlich die Ermittlung der  $IC_{50}$ -Konzentration erfolgen sollen.

Auch Yohimbin als selektiv adrenerger  $\alpha_2$ -Rezeptor-Antagonist kann das Zellwachstums unterdrücken, indem der intrazelluläre cAMP-Spiegel durch eine Hemmung der Adenylylcyclase absinkt [Shen et al., 2008]. MSI KRK Zelllinien exprimieren entweder  $\alpha_{2a}$ - oder  $\alpha_{2b}$ -Rezeptoren, die inhibierende Wirkung von Yohimbin kann demnach über diese Rezeptoren vermittelt werden. Colo320 als MSS Zelllinie konnte ebenfalls signifikant mit 300  $\mu$ mol Yohimbin gehemmt werden ( $p < 0,05$ ). Eine Expression der adrenergen  $\alpha_{2a}$ - und  $\alpha_{2b}$ -Rezeptoren konnte aber bei dieser Zelllinie nicht belegt werden. Weiter möglich wäre eine

Expression des adrenergen  $\alpha 2c$ -Rezeptors. Jedoch wird insbesondere dieser im zentralen Nervensystem exprimiert, im gastrointestinalen Trakt erfolgte noch kein Nachweis [Giovannitti et al., 2015]. Doxey et al. beschreibt eine zusätzliche, antagonistische Wirkung von Yohimbin auf die adrenergen  $\alpha 1$ -Rezeptoren [Doxey et al., 1984]. Damit könnte die signifikante Hemmung von Colo320 Zellen, welche den adrenergen  $\alpha 1b$ -Rezeptor exprimieren, erklärt werden.

Adrenerges Signalling erfolgt bei KRK Zelllinien auch über adrenerge  $\alpha$ -Rezeptoren. Im Speziellen wird dies bei MSI KRK Zelllinien über  $\alpha 2$ -Rezeptoren gesteuert, eine Expression von adrenergen  $\alpha 1$ -Rezeptoren konnten wir bei einer MSI nicht nachweisen. Über eine gezielte  $\alpha 2$ -Blockade mittels Yohimbin ist eine signifikante Hemmung der Zellproliferation bei MSI KRK Zelllinien möglich. Diese Zelllinien verhalten sich demnach gegenüber einer adrenergen  $\alpha 2$ -Rezeptorblockade sensitiv. Durch eine  $\alpha 2$ -Rezeptorblockade kann somit die ISO induzierte Viabilitätssteigerung bei MSI KRK Zelllinien inhibiert werden. Dieses Erkenntnis konnten wir erstmalig in dieser Arbeit aufzeigen, bis dato wurden keine weiteren Daten zu  $\alpha$ -adrenergem Signalling bei MSI KRK Zelllinien in der Grundlagenforschung überliefert.

Interessant wäre es nun in translationaler Hinsicht, ob sich eine  $\alpha$ -Blockertherapie insbesondere beim MSI KRK auf das Überleben auswirkt. In Anlehnung an die Studie von Jansen et al., 2014., die ein signifikant besseres Outcome von KRK-Patient\*innen im UICC-Stadium IV durch eine  $\beta$ -Blockertherapie nachweisen konnte, könnte eine ähnliche, retrospektive Analyse mit  $\alpha$ -Blockern durchgeführt werden. Somit ließe sich ein klinischer Bezug unserer Arbeit herstellen.

### 5.3. Signifikante Zunahme der Krebsstammzellpopulation in MSI KRK Zelllinien unter ISO-Behandlung

Stammzellen besitzen die Fähigkeiten, sich dauerhaft selbst zu erneuern und zu Vorläuferzellen verschiedenster Gewebsarten auszudifferenzieren [Reya et al., 2001]. Auch bei malignen Erkrankungen finden sich Stammzellen, sogenannte Cancer Stem Cells (CSC). CSC können unter anderem Tumorwachstum, Chemoresistenz oder das Auftreten von Rezidiven beeinflussen [Liou et al., 2019; Merlos-Suarez et al., 2011; Dalerba et al., 2007]. In der Vergangenheit

konnten im KRK durch Oberflächenproteine (CD133+/CD44+/CD24+) Populationen charakterisiert werden, die CSC Eigenschaften besitzen. CSC mit den Markern CD133 und CD44 scheinen u.a. durch Modulation der TME den Tumor so zu beeinflussen, dass er gegenüber etablierten Therapien widerstandsfähiger wird und mit einer schlechteren Prognose einhergeht [Yadav et al., 2020; Kim et al., 2018]. CD24+ CSC fördern zudem die Zelladhäsion und somit die Kanzerogenese [Zhou et al., 2018; Abel et al., 2013].

Wir konnten zeigen, dass die Expression der Stammzellpopulation unter ISO-Behandlung nur in der MSI Zelllinie signifikant zunimmt. Bei MSS Zelllinien lässt sich dieser Effekt nicht nachweisen. Wir vermuten demnach, dass adrenerges Signalling die Stammzellpopulation im KRK abhängig des Mikrosatellitenstatus beeinflussen könnte. Es ist jedoch nötig, dieses Experiment bei weiteren MSI KRK Zelllinien wie DLD1 oder LS174T durchzuführen. Dies ist in unserer Arbeit noch nicht erfolgt. Wenn Zelllinien wie DLD1 und LS174T ebenfalls ein erhöhte Stammzellpopulation unter ISO-Behandlung zeigen, würde das unsere Vermutung bekräftigen, dass die Krebsstammzellpopulation im KRK vom Mikrosatellitenstatus abhängen könnte. Es würde zum einen interessant erscheinen, ob unter einer adrenergen  $\alpha$ -Rezeptorblockade die Stammzellpopulation bei den MSI KRK Zelllinien zu unterdrücken wäre. Somit könnten  $\alpha$ -Blocker nicht nur die Viabilität der KRK Zelllinien senken. Zum anderen könnte über weitere FACS- und PCR-Experimente die Expression adrenerger  $\alpha$ -Rezeptoren auf CD133+/CD44+/CD24+ CSC, auch im Vergleich unter ISO-Behandlung, analysiert werden. Durch erneute Kultivierung im Speziellen der dreifach positiven CSC unter Hinzunahme verschiedener Chemotherapeutika könnte z.B. in weiteren Zellzyklus-/Viabilitätsversuchen eine potenzielle Chemoresistenz untersucht werden, Transwell- und Invasionsassays könnten zudem Informationen über eine mögliche Zellmigration dieser Zellen liefern.

Nachdem Horst et al., 2008. nachweisen konnte, dass Stammzellen des KRK durch die Expression von CD133+ Zellen charakterisiert sind, wären die oben genannten Experimente besonders wichtig und ausschlaggebend für weitere, potenzielle therapeutische Strategien. Denn KRK Stammzellen spielen in der Tumorprogression und Rezidivwahrscheinlichkeit eine tragende Rolle [Abel et al., 2013]. Das würde für unsere Arbeit wiederum bedeuten, dass eine Stimulation

adrenerger Signalwege die Population von CSC in MSI Zelllinien ansteigen lässt und der Tumor an Aggressivität gewinnt. Der Effekt könnte jedoch durch eine adrenerge  $\alpha$ -Rezeptorblockade revidiert werden. Eine Einflussnahme auf Tumorprogression, Chemoresistenz und das Auftreten von Rezidiven wäre somit möglich.

#### 5.4. Ansätze zu weiteren grundwissenschaftlichen und klinischen Studien

Mit unseren Erkenntnissen, dass adrenerges Signalling KRK Zelllinien unabhängig des KRAS-Mutationsstatus beeinflusst, jedoch MSI KRK Zelllinien signifikant auf eine  $\alpha$ -Blockertherapie ansprechen, konnte unsere Ausgangshypothese nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse von Renz et al. beim PDAC sind nicht auf das KRK übertragbar. Das KRK ist ein biologisch anderer Tumor als das PDAC. Verschiedene Signalwege, neben der RAS-Kaskade im Speziellen auch der WNT-Signalweg, steuern den Tumorprozess des KRK und beeinflussen die Metastasierung. Um weitere Aufschlüsse über das adrenerge Signalling beim KRK zu erhalten, sollten die Ergebnisse aus den Monolayer-Zellkulturen auch auf 3D-Organoid- und in-vivo-Mausmodelle transferriert werden. Damit wäre es möglich, sowohl Auswirkungen einer Stimulation adrenerger Signalwege als auch einer Blockade adrenerger  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren im Organoid- und Tiermodell zu untersuchen.

Jansen et al. zeigten, dass  $\beta$ -Blocker die KRK Mortalität im UICC-Stadium IV signifikant reduzieren können [Jansen et al., 2014]. Eine Erklärung dafür könnte u.a. die Arbeit von Cole et al., 2015. liefern. Das adrenerge Nervensystem ist an zahlreichen Prozessen, die die Metastasierung des Tumores beeinflussen, beteiligt [Cole et al., 2015]. Die Migration maligner Zellen wird sowohl durch Aktivierung von Onkogenen als auch Stimulation der Angiogenese gefördert [Cole et al., 2015; Chakroborty et al., 2009]. Das adrenerge Signalling unterstützt zudem die TME [Cole et al., 2015].  $\beta$ -Blocker wiederum können durch eine Rezeptorblockade adrenerger Signalwege und deren Einflüsse, im Speziellen auf die Tumormetastasierung, blockieren. Dies könnte eine mögliche molekulargenetische Erklärung für die Ergebnisse aus Jansen et al., 2014. sein.

Ingesamt zeigt sich jedoch eine klinisch dünne, nicht einheitliche Datenlage der Auswirkung einer  $\beta$ -Rezeptorblockade. So beschreibt zwar neben Jansen et al., 2014 auch Giamperi et al. 2015 ein verbessertes Outcome von KRK-

Patient\*innen unter  $\beta$ -Blockertherapie im metastasierten Stadium, eine Evidenz war hingegen bei Hicks et al., 2013. nicht zu finden [Giamperi et al. 2015; Jansen et al., 2014; Hicks et al., 2013]. Eine  $\beta$ -Blockertherapie bei Hicks et al., 2013. wurde jedoch erst nach der Krebsdiagnose begonnen [Hicks et al., 2013]. Ein ähnliches Ergebnis zeigte Jansen et al., 2017. Auch bei dieser Studie konnte kein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit beim KRK durch eine  $\beta$ -Blockertherapie mit Start vor oder nach der Krebsdiagnose nachgewiesen werden [Jansen et al., 2017]. Möglicherweise könnten Cofounder im UICC-Stadium IV eine Rolle spielen [Jansen et al., 2014]. Dennoch konnte auch beim Prostatakarzinom im fortgeschrittenen bzw. metastasierten Tumorstadium die Mortalität unter einer  $\beta$ -Blockertherapie reduziert werden [Grytli et al., 2013].

Dasselbe Bild stellt sich dar, wenn zwischen einer Therapie mit nicht-selektiven und selektiven ( $\beta_1$ )  $\beta$ -Blockern differenziert wird. Jansen et al., 2014. weist für beide Therapie ein signifikant verlängertes Überleben nach. Diese Erkenntnis bestätigt sich jedoch in Anschlussstudien (Jansen et al., 2017') nicht. Mit Beginn einer  $\beta$ -Blockertherapie vor der Tumordiagnose im UICC-Stadium 4 zeigte sich bei nicht-selektiven  $\beta$ -Blockern keine Signifikanz, bei selektiven  $\beta_1$ -Blockern sogar eine leichte, signifikante Zunahme der Mortalität [Jansen et al., 2017]. Durch weitere grundlagenwissenschaftliche und klinische Analysen sollte ein einheitlicheres Bild dazu geschaffen werden.

Immunonkologika gehören neben der klassischen systemischen Chemotherapie zum Therapiestandard des kolorektalen Karzinoms. In molekularen Tumorboards werden aufwendig fortgeschrittene onkologische Erkrankungen anhand ihrer Molekularpathologie analysiert, um eine möglichst individuelle Therapie zu ermöglichen. Dennoch, Immunonkologika gehören bekanntlich zu den teuersten Medikamenten und sind nicht nur in ihrer Herstellung aufwendig, sondern auch langwierig in Forschung und Zulassung.  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blocker gehören dagegen zu den am meisten verwendeten und erforschten Medikamenten. Sie zeichnen sich nicht nur durch eine gute Verträglichkeit in Nutzen und einer preiswertigen Anschaffung aus, sondern ein Großteil der Mediziner ist ebenso in deren Einsatz geübt. Weitere Studien hinsichtlich der Effektivität einer adrenergen Rezeptorblockade sollen erfolgen, sodass stratifizierte Therapiekonzepte womöglich von einer zusätzlichen Anwendung von  $\alpha$ -/ $\beta$ -Blockern profitieren können.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Stress gilt als Risikofaktor für die Entstehung einer Vielzahl von Erkrankungen. Nicht nur kardiologische und psychiatrische Morbiditäten sind unter diesem Gesichtspunkt im wissenschaftlichen Fokus. Auch onkologische Erkrankungen können durch diesen Faktor getriggert werden. Ein Einfluss von Stress auf die Kanzerogenese des Pankreas- oder Ovarialkarzinoms wurde bereits zahlreich beschrieben [Renz et al., 2018; Thaker et al., 2006].

Auch das kolorektale Karzinom rückt in diesem Bezug in den Vordergrund [Coelho et al., 2015]. Unsere Arbeitshypothese gründete sich u.a. auf Jansen et al., 2014. Mit der retrospektiv durchgeführten Studie konnte ein signifikant besseres Überleben im UICC-Stadium IV unter  $\beta$ -Blocker-Therapie beim KRK nachgewiesen werden. Die Hypothese dieser Arbeit lautete wie folgt: die KRAS-induzierte kolorektale Tumorgenese reagiert sensitiv auf eine adrenerge  $\beta$ -Blockertherapie.

Die Hypothese konnte nicht bestätigt werden. Der proliferative Effekt unter ISO-Behandlung konnte zwar durch  $\beta$ -Blocker aufgehoben werden, dies erfolgte jedoch unabhängig des KRAS-Mutationsstatus. Im KRK ist somit die Sensitivität von  $\beta$ -Blockern nicht vom KRAS-Status abhängig. Es ließ sich jedoch in der Blockade von adrenergen  $\alpha$ -Rezeptoren ein Unterschied im Mikrosatellitenstatus darstellen. So konnten MSI KRK Zelllinien durch eine Blockade der adrenergen  $\alpha$ -Rezeptoren in ihrer Zellviabilität signifikant gehemmt werden. Zudem fiel auf, dass einzig HCT116 als MSI Zelllinie eine signifikante Zunahme der Krebsstammzellpopulation unter adrenerger Behandlung aufweist. Bei MSS Zellen konnte dieses Verhalten nicht nachgewiesen werden. Somit vermuten wir, dass die Tumorbilogie durch adrenerges Signalling insbesondere in MSI Tumoren beeinflusst werden könnte. Es gilt nachzuweisen, ob dieses Verhalten auch bei weiteren MSI Zelllinien auftritt und die Krebsstammzellpopulation wiederum durch eine adrenerge  $\alpha$ -Rezeptorblockade abnehmen kann. Dies hätte womöglich Einfluss auf Progression und Rezidivaufreten.

Diese Erkenntnisse sollten dafür genutzt werden, weitere Grundlagenexperimente zu dieser Thematik durchzuführen und diese ebenso translational ins klinische Setting zu übertragen. Ein möglicherweise besseres Outcome von Krebspatient\*innen mit einfachen, vielfach getesteten und

nebenwirkungsarmen Medikamenten, wie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Blockern, gilt es zu etablieren.



## 7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

g	Gramm
°C	Grad Celsius
µl	Mirkoliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
1l VE-H <sub>2</sub> O	Voll entsalztes Wasser
7AAD	7-Aminoactinomycin
ADRA1b	Adrenergic receptor alpha 1d
ADRA2a	Adrenergic receptor alpha 2a
ADRA2b	Adrenergic receptor alpha 2b
ADRB1	Adrenergic receptor beta 1
ADRB2	Adrenergic receptor beta 2
ADRB3	Adrenergic receptor alpha 1b
AEC	Aminoethylcarbazol
AKT	Protein Kinase B
APC	Adenomatous-polyposis-coli-Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Taxia-telangiectasia mutated and Rad3-related
BAD	Bcl-2-associated death promoter
BARK	Beta adrenergic receptor kinase
BCA	Bic
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BSA	Bovines Serum Antigen
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD133	Cluster of differeration 133
CD24	Cluster of differeration 24
CD44	Cluster of differeration 44
cDNA	Complementary desoxyribonucleic acid
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Kubikzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CREB	cAMP response element-binding protein

CSC	Cancer Stem Cells
DAG	Diacylglycerol
ddH2O	Double Distilled Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EPAC	Exchange protein activated by cAMP
ERRB2	Epidermal growth factor receptor 2 = Her2 = neu
FACS	Fluorescence-activated cell scanning
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FBS	Fetales bovines Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMO	Fluorescence minus one
G	Einheit für Beschleunigungskraft
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCPR	G-Protein gekoppelte Rezeptor
gDNA	Genomic DNA
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GUSB	$\beta$ -Glucuronidase
h	Stunde
H2O2	Wasserstoffperoxid
Her2neu	Epidermal growth factor receptor 2 = Her2 = neu
HNPCC	Hereditäres nicht-Polyposis-assoziiertes kolorektales Karzinom
IgG1	Immunglobulin G1
IgG2a	Immunglobulin G2a
IgG2b	Immunglobulin G2b
IL6	Interleukin 6
IL8	Interleukin 8
IP3	Inositol-1,4,5-Triphosphat
ISO	Isoproterenol
KRas	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

KRK	Kolorektales Karzinom
M	Molare Masse
MAP	MUTYH-assoziierte Polyposis
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
min	Minute
ml	Milliliter
MLH1	MutL homolog 1
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MMR	Mismatch-Repair
MSH2	MutS homolog 2
MSH6	MutS homolog 6
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatellitenstabilität
MTT-Assay	Dimethylthiazol-Assay
Myc	Myelocytomatosis oncogene
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
p21	Cyclin-dependent-kinase-Inhibitor 1
P53	Protein 53
PC	Personal Computer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDAC	Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
pH	pH-Wert
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-Biphosphat
PKA	Proteinkinase A
PLC- $\beta$	Phospholipase C Typ $\beta$
PMS2	Mismatch repair endonuclease PMS2
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma oder rat fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma viral oncogene
RNA	Ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Medium

RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumlaurylsulfat
STAT3	Signal Transducers and Activators of Transcription 3
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TP53	Tumorprotein 53
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vs	Versus
WNT	Wingless-int1-Signalweg

## 8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Krebs in Deutschland	9
Abbildung 2: Sterbefälle Dickdarmkrebs seit 1998	10
Abbildung 3: Biosynthese der Katecholamine	14
Abbildung 4: Regulation der Tumormikroumgebung	16
Abbildung 5: Molekulare Mechanismen der Regulation des Tumorwachstums	17
Abbildung 6: Gesamtüberleben KRK nach UICC-Stadium	19
Abbildung 7: KRK-Zelllinien	24
Abbildung 8: Systemeinstellung der RT-PCR-Temperaturkurve	30
Abbildung 9: Material für Westerblot	33
Abbildung 10: Viabilitätszunahme unter ISO bei Colo320/SW480	38
Abbildung 11: Viabilitätszunahme unter ISO bei HCT116/HT29	39
Abbildung 12: Zellzyklusanalyse	40
Abbildung 13: Adrenerge beta-Rezeptoren auf Protein- und RNA-Ebene	41
Abbildung 14: Adrenerge beta-Rezeptoren in IHC	42
Abbildung 15: Adrenerge beta Rezeptoren unter ISO	43
Abbildung 16: Adrenerge alpha-Rezeptoren auf RNA-Ebene	44
Abbildung 17: Adrenerge beta-Rezeptorblockade	46
Abbildung 18: Adrenerge alpa-Rezeptorblockade	48
Abbildung 19: Stammzellmarkerexpression	49

## **9. TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Charakterisierung KRK-Zelllinien	23
Tabelle 2: Primersequenzen	29
Tabelle 3: Verdünnungsreihen zur BCA-Bestimmung	31
Tabelle 4: Antikörperfärbung zur Stammzellmarkeranalyse	35

## 10. QUELLENVERZEICHNIS

Abel et al., 2103. "Biology and clinical applications of pancreatic cancer stem cells". *Gastroenterology*.144(6):1241-8.

Ahmed, D., et al. (2013). "Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines." *Oncogenesis* 2: e71.

Aleksandrova, K., et al. (2014). "Adiposity, mediating biomarkers and risk of colon cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition study." *Int J Cancer* 134(3): 612-621.

Andrieu, N., et al. (2004). "Estimation of the familial relative risk of cancer by site from a French population based family study on colorectal cancer (CCREF study)." *Gut* 53(9): 1322-1328.

Antoni, M. H., et al. (2006). "The influence of bio-behavioural factors on tumour biology: pathways and mechanisms." *Nat Rev Cancer* 6(3): 240-248.

Aretz, S. (2010). "The differential diagnosis and surveillance of hereditary gastrointestinal polyposis syndromes." *Dtsch Arztebl Int* 107(10): 163-173.

Barnes, B., et al. (2016). Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016, Robert Koch-Institut.

Biozol, EZ4U 4th Generation, Protocol.

Bouvard, V., et al. (2015). "Carcinogenicity of consumption of red and processed meat." *Lancet Oncol* 16(16): 1599-1600.

Brabletz, T., et al. (2005). "Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression." *Nat Rev Cancer* 5(9): 744-749.

Buecher, B., et al. (2013). "Role of microsatellite instability in the management of colorectal cancers." *Dig Liver Dis* 45(6): 441-449.

Calvani, M., et al. (2015). "Norepinephrine promotes tumor microenvironment reactivity through beta3-adrenoreceptors during melanoma progression." *Oncotarget* 6(7): 4615-4632.

Chakroborty, D., et al. (2009). "Catecholamines regulate tumor angiogenesis." *Cancer Res* 69(9): 3727-3730.

Chen, X., et al. (2014). "Combined PKC and MEK inhibition in uveal melanoma with GNAQ and GNA11 mutations." *Oncogene* 33(39): 4724-4734.

Chin, C. C., et al. (2016). "Selective  $\beta$ 2-AR Blockage Suppresses Colorectal Cancer Growth Through Regulation of EGFR-Akt/ERK1/2 Signaling, G1-Phase Arrest, and Apoptosis." *J Cell Physiol* 231(2): 459-472.

Coelho, M., et al. (2015). "Antiproliferative effects of beta-blockers on human colorectal cancer cells." *Oncol Rep* 33(5): 2513-2520.

Cole, S. W., et al. (2015). "Sympathetic nervous system regulation of the tumour microenvironment." *Nat Rev Cancer* 15(9): 563-572.

Cole, S. W. and A. K. Sood (2012). "Molecular pathways: beta-adrenergic signaling in cancer." *Clin Cancer Res* 18(5): 1201-1206.

Collado, M. and M. Serrano (2010). "Senescence in tumours: evidence from mice and humans." *Nat Rev Cancer* 10(1): 51-57.

Collado-Hidalgo, A., et al. (2006). "Adrenergic inhibition of innate anti-viral response: PKA blockade of Type I interferon gene transcription mediates catecholamine support for HIV-1 replication." *Brain Behav Immun* 20(6): 552-563..

Dalerba, P., et al. (2007). "Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(24): 10158-10163.

Damm, R. (2011). "Personalisierte Medizin und Patientenrechte – Medizinische Optionen und medizinrechtliche Bewertung." *Medizinrecht* 29(1): 7-17.

De Marcondes, PG, et al. (2016). "EphA4-mediated signaling regulates the aggressive phenotype of irradiation survivor colorectal cancer cells". *Tumour Biol.* 37(9):12411-12422.

De Roock, W., et al. (2010). "Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab." *JAMA* 304(16): 1812-1820.

Dorsam, R. T. and J. S. Gutkind (2007). "G-protein-coupled receptors and cancer." *Nat Rev Cancer* 7(2): 79-94.

Doxey, J. C., et al. (1984). "Comparison of the alpha-adrenoceptor antagonist profiles of idazoxan (RX 781094), yohimbine, rauwolscine and corynanthine." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 325(2): 136-144.

Ekbom, A., et al. (1990). "Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study." *N Engl J Med* 323(18): 1228-1233.

Ellegren, H. (2004). "Microsatellites: simple sequences with complex evolution." *Nat Rev Genet* 5(6): 435-445.

Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicol Pathol* 35(4): 495-516.

Fedirko, V., et al. (2011). "Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies." *Ann Oncol* 22(9): 1958-



1972.

Frattini, M., et al. (2007). "PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients." *Br J Cancer* 97(8): 1139-1145.

Fuchs, C. S., et al. (1994). "A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer." *N Engl J Med* 331(25): 1669-1674.

Gao, X. Q., et al. (2017). "beta3-Adrenoceptor activation upregulates apolipoprotein A-I expression in HepG2 cells, which might further promote cholesterol efflux from macrophage foam cells." *Drug Des Devel Ther* 11: 617-627.

Garrison, J. B. and N. Kyprianou (2006). "Doxazosin induces apoptosis of benign and malignant prostate cells via a death receptor-mediated pathway." *Cancer Res* 66(1): 464-472.

Giampieri, R., et al. (2015). "Prognostic Value for Incidental Antihypertensive Therapy With  $\beta$ -Blockers in Metastatic Colorectal Cancer." *Medicine (Baltimore)* 94(24): e719.

Gilman, A. G. (1987). "G PROTEINS: TRANSDUCERS OF RECEPTOR-GENERATED SIGNALS." *Annual Review of Biochemistry* 56(1): 615-649.

Giovannitti, J. A., Jr., et al. (2015). "Alpha-2 adrenergic receptor agonists: a review of current clinical applications." *Anesth Prog* 62(1): 31-39.

Greenstein, A. J., et al. (1981). "A comparison of cancer risk in Crohn's disease and ulcerative colitis." *Cancer* 48(12): 2742-2745.

Grytli, H. H., et al. (2014). "Association between use of  $\beta$ -blockers and prostate cancer-specific survival: a cohort study of 3561 prostate cancer patients with high-risk or metastatic disease." *Eur Urol* 65(3): 635-641.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* 100(1): 57-70.

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

Hara, M. R., et al. (2011). "A stress response pathway regulates DNA damage through beta2-adrenoreceptors and beta-arrestin-1." *Nature* 477(7364): 349-353.

Hassan, S., et al. (2013). "Behavioral stress accelerates prostate cancer development in mice." *J Clin Invest* 123(2): 874-886.

Hicks, B. M., et al. (2013). " $\beta$ -Blocker usage and colorectal cancer mortality: a nested case-control study in the UK Clinical Practice Research Datalink cohort." *Ann Oncol* 24(12): 3100-3106.

Hingorani, S.R., Wang, L., Multani, A.S., Combs, C., Deramaudt, T.B., Hruban, R.H., Rustgi, A.K., Chang, S., and Tuveson, D.A. (2005). "Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice". *Cancer Cell* 7, 469–483.

Horst, D., et al. (2008). "CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer." *Br J Cancer* 99(8): 1285-1289.

Inbar, S., et al. (2011). "Do stress responses promote leukemia progression? An animal study suggesting a role for epinephrine and prostaglandin-E2 through reduced NK activity." *PLoS One* 6(4): e19246.

Irwin, M. R. and S. W. Cole (2011). "Reciprocal regulation of the neural and innate immune systems." *Nat Rev Immunol* 11(9): 625-632.

Jablonska-Trypuc, A., et al. (2016). "Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs." *J Enzyme Inhib Med Chem* 31(sup1): 177-183.

Jansen, L., et al. (2014). "Stage-specific associations between beta blocker use and prognosis after colorectal cancer." *Cancer* 120(8): 1178-1186.

Jansen, L., et al. (2017). "Pre- and post-diagnostic beta-blocker use and prognosis after colorectal cancer: Results from a population-based study." *Int J Cancer* 141(1): 62-71.

Jaspersen, K. W., et al. (2010). "Hereditary and familial colon cancer." *Gastroenterology* 138(6): 2044-2058.

Kawakami, H., et al (2015). "Microsatellite instability testing and its role in the management of colorectal cancer". *Curr Treat Options Oncol.* 16(7):30.

Kim, Y. S., et al. (2016). "Molecular markers of cancer stem cells verified in vivo." *Biomed Khim* 62(3): 228-238.

Kim-Fuchs, C., et al. (2014). "Chronic stress accelerates pancreatic cancer growth and invasion: a critical role for beta-adrenergic signaling in the pancreatic microenvironment." *Brain Behav Immun* 40: 40-47.

Kirshner, N. (1959). "Biosynthesis of adrenaline and noradrenaline." *Pharmacol Rev* 11(2, Part 2): 350-357.

Koch-Institut, R. (2010). *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes.* RKI, Berlin

Koch-Institut, R. (2017). *Krebs in Deutschland für 2013/2014*, Robert Koch-Institut.

Larsen, M., et al. (2007). "Survival after colorectal cancer in patients with Crohn's disease: A nationwide population-based Danish follow-up study." *Am J Gastroenterol* 102(1): 163-167.

Larsen, R. (2018). Kapitel 9 - Kardiovaskuläre Medikamente. Anästhesie (Elfte Ausgabe). R. Larsen. Munich, Urban & Fischer: 149-165.

Lee, V., et al (2016). "Mismatch Repair Deficiency and Response to Immune Checkpoint Blockade". *Oncologist*. 21(10):1200-1211.

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1, 2019, AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/> [abgerufen am: 01.05.2019]

Liou, G. Y. (2019). "CD133 as a regulator of cancer metastasis through the cancer stem cells." *Int J Biochem Cell Biol* 106: 1-7.

Lowe, S. W., et al. (2004). "Intrinsic tumour suppression." *Nature* 432(7015): 307-315.

Lu, Y. C., et al. (2015). "Cancer immunotherapy targeting neoantigens". *Semin Immunol*. 28(1):22-7.

Majewski, I. J. and R. Bernards (2011). "Taming the dragon: genomic biomarkers to individualize the treatment of cancer." *Nat Med* 17(3): 304-312.

Masur, K., et al. (2001). "Norepinephrine-induced migration of SW 480 colon carcinoma cells is inhibited by beta-blockers." *Cancer Res* 61(7): 2866-2869.

McAlpine JN, Gilks CB. Precision medicine in endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2019 Sep;154(3):451-453.

McCormick, F. (2015). "KRAS as a Therapeutic Target." *Clin Cancer Res* 21(8): 1797-1801.

McDermott, U., et al. (2011). "Genomics and the continuum of cancer care." *N Engl J Med* 364(4): 340-350.

McEwen, B. S. (2002). "Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process." *Neurobiol Aging* 23(5): 921-939.

Merlos-Suarez, A., et al. (2011). "The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse." *Cell Stem Cell* 8(5): 511-524.

Miller, P. E., et al. (2010). "Dietary patterns and colorectal adenoma and cancer risk: a review of the epidemiological evidence." *Nutr Cancer* 62(4): 413-424.

Modest, D. P., et al. (2011). "Clinical characterization of patients with metastatic colorectal cancer depending on the KRAS status." *Anticancer Drugs* 22(9): 913-918.

Nilsson, M. B., et al. (2007). "Stress hormones regulate interleukin-6 expression by human ovarian carcinoma cells through a Src-dependent mechanism." *J Biol Chem* 282(41): 29919-29926.

Oki, E., et al. (1999). "Mutated gene-specific phenotypes of dinucleotide repeat instability in human colorectal carcinoma cell lines deficient in DNA mismatch repair." *Oncogene*. 1999 Mar 25;18(12):2143-7.

PanRean AppliChem, Datasheet Trypanblau.

Perez, D. M. (2020). " $\alpha$ (1)-Adrenergic Receptors in Neurotransmission, Synaptic Plasticity, and Cognition." *Front Pharmacol* 11: 581098.

Philipson, L. H. (2002). "beta-Agonists and metabolism." *J Allergy Clin Immunol* 110(6 Suppl): S313-317.

Polette, M., et al. (2004). "Tumour invasion and matrix metalloproteinases." *Crit Rev Oncol Hematol* 49(3): 179-186.

Pu, J., et al. (2012). "Adrenaline promotes cell proliferation and increases chemoresistance in colon cancer HT29 cells through induction of miR-155." *Biochem Biophys Res Commun* 428(2): 210-215.

Qiagen, RNeasy Mini Kit, Quick-StartProtocol 2011.

Radisky, E. S. and D. C. Radisky (2010). "Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15(2): 201-212.

Rassow J, Hauser K, Deutzmann R et al., Hrsg. *Duale Reihe Biochemie*. 4. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2016.

Renz, B. W., et al. (2013). "Clinical outcome of IBD-associated versus sporadic colorectal cancer: a matched-pair analysis." *J Gastrointest Surg* 17(5): 981-990.

Renz, B. W., et al. (2018). "Cholinergic Signalling via Muscarinic Receptors Directly and Indirectly Suppresses Pancreatic Tumorigenesis and Cancer Stemness." *Cancer Discov* 8(11): 1458-1473.

Renz, B. W., et al. (2018). "beta2 Adrenergic-Neutropenic Feedforward Loop Promotes Pancreatic Cancer." *Cancer Cell* 33(1): 75-90 e77.

Reya, T., et al. (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." *Nature* 414(6859): 105-111.

Sastry, K. S., et al. (2007). "Epinephrine protects cancer cells from apoptosis via activation of cAMP-dependent protein kinase and BAD phosphorylation." *J Biol Chem* 282(19): 14094-14100.

Schuller, H. M., et al. (2012). "Regulation of pancreatic cancer by neuropsychological stress responses: a novel target for intervention." *Carcinogenesis* 33(1): 191-196.

Schumacher, T. N., et al (2015). "Neoantigens in cancer immunotherapy". *Science*. 3;348(6230):69-74.

Shen, S. G., et al. (2008). "Effects of alpha-adrenoreceptor antagonists on apoptosis and proliferation of pancreatic cancer cells in vitro." *World J Gastroenterol* 14(15): 2358-2363.

Statistisches Bundesamt, Sterbefälle Darmkrebs seit 1998, Gesundheitsberichterstattung des Bundes. [https://www.gbe-bund.de/gbe/!pkg\\_olap\\_tables.prc\\_set\\_linie?p\\_uid=gastd&p\\_aid=88231631&p\\_sprachs=D&p\\_help=2&p\\_indnr=6&p\\_ansnr=82961890&p\\_version=5&D.946\\_down\\_dim=15271&D.946\\_down\\_dim=12433&D.946\\_down\\_dim=14689&D.946\\_down\\_dim=15508&D.994\\_down\\_dim=12431&D.946\\_down\\_dim=110631&D.946\\_down\\_dim=12439&D.946\\_dow\\_dim=12432&p\\_basisjahr=2018#SVG](https://www.gbe-bund.de/gbe/!pkg_olap_tables.prc_set_linie?p_uid=gastd&p_aid=88231631&p_sprachs=D&p_help=2&p_indnr=6&p_ansnr=82961890&p_version=5&D.946_down_dim=15271&D.946_down_dim=12433&D.946_down_dim=14689&D.946_down_dim=15508&D.994_down_dim=12431&D.946_down_dim=110631&D.946_down_dim=12439&D.946_dow_dim=12432&p_basisjahr=2018#SVG). Aufgerufen am 30.01.2021.

Thaker, P. H., et al. (2006). "Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma." *Nat Med* 12(8): 939-944.

Todd, R. and D. T. Wong (1999). "Oncogenes." *Anticancer Res* 19(6a): 4729-4746.

Vigil, D., et al. (2010). "Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy?" *Nat Rev Cancer* 10(12): 842-857.

Vilar, E. and S. B. Gruber (2010). "Microsatellite instability in colorectal cancer- the stable evidence." *Nat Rev Clin Oncol* 7(3): 153-162.

Wang, W., et al. (2020). "Nerves in the Tumor Microenvironment: Origin and Effects." *Front Cell Dev Biol* 8: 601738.

Waters, A. M. and C. J. Der (2018). "KRAS: The Critical Driver and Therapeutic Target for Pancreatic Cancer." *Cold Spring Harb Perspect Med* 8(9).

Wong, H. P., et al. (2011). "Effects of adrenaline in human colon adenocarcinoma HT-29 cells." *Life Sci* 88(25-26): 1108-1112.

Yadav, U. P., et al. (2020). "Metabolic Adaptations in Cancer Stem Cells." *Front Oncol* 10: 1010.

Zahalka, A. H., et al. (2017). "Adrenergic nerves activate an angio-metabolic switch in prostate cancer." *Science* 358(6361): 321-326.

Zhou, Y., et al. (2018). "Cancer stem cells in progression of colorectal cancer." *Oncotarget* 9(70): 33403-33415.

## 11. MATERIAL

### 11.1. Labormaterial

6-Well-Plat	Thermo Scientific, US	#140675
96-Well-Platte	Sarstedt, D	#82.1581.001
Cryotube 1ml	Thermo Scientific, US	#5011-0012
Deckglas	Thermo Scientific, US	#7411275
Eisgerät - Modell B100	KBS, D	#4340100
Einfrierbox für Zellkultur	Nalgene, US	#330821
Eppendorf Research 8-Lanal 0,5-10µl	Eppendorf, D	#3125000010
Eppendorf Research Einkanal 0,5-10µl	Eppendorf, D	#3123000098
Eppendorf Research Einkanal 10-100µl	Eppendorf, D	#3123000047
Eppendorf Research Einkanal 100-1000µl	Eppendorf, D	#3123000063
Eppendorf Research Einkanal 2- 20µl	Eppendorf, D	#3123000039
Eppendorf Research Einkanal 20-200µl	Eppendorf, D	#3123000055
epT.I.P.S. 50-1000µl	Eppendorf, D	#0030000919
epT.I.P.S. 0,1-10l	Eppendorf, D	#0030000811
epT.I.P.S. 2-200µl	Eppendorf, D	#0030000870
Erlenmeyerkolben 1000ml	SchottDuran, D	#2121636
Erlenmeyerkolben 250ml	SchottDuran, D	#2121654
Ethanol 100%	CLN, D	
Ethanol 96%	CLN, D	
Falcon 15ml	Fisher Scientific, US	#91015
Falcon 50ml	Fisher Scientific, US	#10788561
Falcon-Halteständer	TPP, D	
Gefrierschrank -20°C	Siemens, D	
Gefrierschrank -80°C	Thermo Scientific, US	
Gigasept	Schülke, D	#107411

Handschuhe	ecoshield, D	#625123
Inkubationsschrank - Modell CB 170	Binder, D	#9040-0131
Kühlschrank 4°C - LKUexv 1610 MediLine	Liebherr, D	
Laminar Flow System	Gelaire, AU	
Laminar Flow System - HeraSafe	Thermo Scientific, US	#51022482
Laminar Flow System - Safe 2020	Thermo Scientific, US	#51026637
Lichtmikroskop - Laborlux S	Leitz, D	
Lichtmikroskop - OlympusX50	Olympus, Jp	
Lichtmikroskop - Optic Axiovert 40CFL	Zeiss, D	
Neubauer-Zellkammer	Brand, D	#7178 05
Nunc EasYFlask T175	Thermo Scientific, US	#159910
Nunc EasYFlask T25	Thermo Scientific, US	#156367
Nunc EasYFlask T75	Thermo Scientific, US	#156472
Objektträger	Marienfeld, D	#1000000
Pipettierhelfer - Accu-jet pro	Brand, D	#26301
Stripetten 10ml	Costar, D	#4488
Stripetten 25ml	Costar, D	#4489
Stripetten 50ml	Costar, D	#4490
Stripetten 5ml	Costar, D	#4487
Tischzentrifuge - MCF-2360	LMS, US	
Trypanblau (Zellzählen)	Sigma, US	#72-57-1
Tube 0,5ml	Eppendorf, D	#0030121023
Tube 1,5ml	Eppendorf, D	#0030130086
Tube 2ml	Eppendorf, D	#0030120094
Vortex-Mixer - JK MS2 Minishaker	IKA, D	
Vortex-Mixer - Vortex Genie	Scientific Industries, US	
Vortex-Mixer - VX100	Labnet, US	



VWR Aqua Resist	VWR, US	#462-7000
Wasserbad	Memmert, D	
Zentrifuge - D 380R	Hettich Rotina	
Zentrifuge - D 420R	Hettich Rotina	

### 11.2. Zellkultur

Colo320	DSMZ, D	#ACC 114
DLD1	DSMZ, D	#ACC 278
DMSO	CarlRoth, D	#67-68-5
DPBS	Pan Biotech, D	#P04-53500
FBS	Pan Biotech, D	#P04-96650
HCT116	DSMZ, D	#ACC 581
HT29	DSMZ, D	#ACC 299
LS147T	DSMZ, D	#ACC 759
RPMI-1640	Lonza, CH	#BE12-702F
SW480	ATCC, US	#CCL-228
Trypsin/EDTA Bovine Pancreas	Merck, D	#D47933

### 11.3. EZ4U-Viabilitätstest

Atenolol	Supelco, US	#PHR1909
Doxazosin mesylate	Sigma-Aldrich, US	#D9815
ELISA-Auswertung-Software, SoftMax Pro 6.5.1.	Molecular Devices, US	
ELISA-Reader Versa Max	Molecular Devices, US	
EZ4U Substrat	Biomedica, A	#BI-5000
ICI 118,551	Sigma-Aldrich, US	#I127
Isoproterenol	Sigma-Aldrich, US	#1351005
Propranolol hydrochlorid	Supelco, US	#40543
SR59230A	Sigma-Aldrich, US	#S8688
Wärmeschrank 37°C	Memmert, D	
Yohimbin hydrochlorid	Sigma, Aldrich, US	#Y3125

#### 11.4. Real-Time-PCR

70% Ethanol	CarlRoth, D	#T868.3
DNA-Workstation	UniEquip, D	
Mastercycler gradient	Eppendorf, D	#5331
Laptop	Dell, US	
NanoDrop 2000	Thermo Scientific, US	#ND-2000
Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, US	#4311971
PCR-Platte	Applied Biosystems, US	#N8010560
Primer ADRA1b	Bio-Rad, D	#qHsaCIP0030605
Primer ADRA1d	Bio-Rad, D	#qHsaCEP0025841
Primer ADRA2a	Bio-Rad, D	#qHsaCEP0052744
Primer ADRA2b	Bio-Rad, D	#qHsaCEP0055942
Primer ADRB1	Bio-Rad, D	#qHsaCED0019217
Primer ADRB2	Bio-Rad, D	#qHsaCEP0032222
Primer ADRB3	Bio-Rad, D	#qHsaCEP0055256
Primer GAPDH	Bio-Rad, D	#qHsaCEP0041396
QuantiTect Reverse Transkriptase Kit	Qiagen, NL	#205310
RNeasy Mini Kit Qiagen	Qiagen, NL	#74104
StepOne Software v2.3	Applied Biosystems, US	
Sso-Fast Eva Green Mix	Bio-Rad, D	#1725200
StepOnePlus RTPCRSystem	Applied Biosystems, US	#4376600
Zentrifuge - 5417R	Eppendorf, D	#5409000210

#### 11.5. Westernblot

ADRB1-Antikörper	Abcam, GB	#ab3442
ADRB2-Antikörper	Abcam, GB	#ab61778
ADRB3-Antikörper	Abcam, GB	#ab94506

Aluminiumfolie	DM, D	
APS 10%	Carl Roth	#9592.2
XCell SureLock Mini-Cell	Invitrogen, US	#ZA10001
Xcell II Blot Module	Invitrogen, US	#EI9051
ddH2O		
GAPDH-Antikörper	Abcam, GB	#ab8245
Glycin	Merck, D	#1042010100
Vortex-Mixer - JK VF2 Minishaker	IKA, D	
Shaker WT16	Biometra, D	
Laemmli S Buffer 4x	Bio-Rad	#1610737
Nitrocellulose Filter	Invitrogen, US	#LC2000
Methanol	CarlRoth, D	#T169.1
Milchpulver	CarlRoth, D	#T145.1
NaCl 500g	Merck, D	#1064040500
Odyssey CLx	Li-Cor, US	
Petri-Schale	Thermo Scientific, US	#150318
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, US	#23227
Rotiphorese Gel 30	CarlRoth, D	#3029.1
Precursor Plus Protein- Dual Xtra Standards	Bio-Rad, D	#161-0377
Proteinase Inhibitor 100x	Thermo Scientific, US	#78429
Ripa Lysis Puffer 10x	Merck, D	#20-188
SDS 10% - Rotiphorese	CarlRoth, D	#3060.1
TBST	CarlRoth, D	#1061.1
Temed	Sigma-Aldrich, US	#GE17-1312-01
Tris hydrochloride	CarlRoth, D	#9090.1
Tween 20	Sigma-Aldrich, US	#9416
VE-H2O	LMU Großhadern, D	
Thermomixer comfort	Eppendorf, D	
Wärmehalter	VWR, D	

### 11.6. Zellzyklus-Analyse

FACSDiva Software	BD, US	
Falcon 5ml	Corning, US	#352008
Hoechst 33342	Thermo Scientific, US	#H3570
LSR Fortessa	BD, US	#649225
Ribonuclease A	Sigma-Aldrich, US	#R4642
Rnase 100µg/ml	Sigma-Aldrich, US	#R6513

### 11.7. Stammzellmarker-Analyse

7-AAD	Biologend, US	#420403
APC - CD24-Antibody	Biologend, US	#311117
BSA	CarlRoth, D	#2330.1
FITC - CD44-Antibody	Biologend, US	#103021
Mouse IgG1-Antibody	Biologend, US	#406607
Mouse IgG2a-Antibody	BD Biosciences, US	#555576
Natriumazid 10%	Morphisto, D	#13553
PBS-Pulver	Applichem, US	#A0965
PE - CD133-Antibody	BD Biosciences, US	#566593
Rat IgG2b-Antibody	BD Biosciences, US	#553988

### 11.8. Immunhistochemie

AEC	Sigma-Aldrich, US	#152224
Aquatex	Merck	#108562
beta-2 Adenergetic Receptor Antibody	Abcam, US	#ab182136
Citronensäure-Monohydrat	Carl Roth, D	#3958.1
CM 1950 Microtome	Leica, D	#1491950C1EU
H2O2 30%	Carl Roth, D	#CP26.1
Hämalaun	Merck, D	#109249
ImmPRESS Reagent Anti-Rabbit Ig-Kit	Vector Laboratories, US	#MP-7401

N,N-Dimethylformamid	Carl Roth, D	#T921.1
Natriumacetat	Merck, D	#106268
PAP-Pen	abcam	#ab2601
p-Xylol	Carl Roth, D	#8817.3
tri Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth, D	#3580.1

## 12. DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich die letzten Jahre begleitet und unterstützt haben. Nur so konnte ich meine Doktorarbeit erfolgreich abschließen.

An erster Stelle möchte ich meinem Betreuer und Doktorvater, Herrn PD Dr. Bernhard Renz, für seine Geduld, Ausdauer und Motivation danken. Du hast mir nicht nur das Thema meiner Doktorarbeit überlassen, sondern hast mich über zahlreiche Stunden bei diesem Projekt begleitet, konnten gemeinsam Ideen ent- und weiterentwickeln und hast uns durch deine Verbesserungsvorschläge weitergebracht. Danke, Bernhard!

Ein besonderer Dank ergeht auch dem ganzem Laborteam der Experimentellen Chirurgie der LMU München. Herrn Prof. Sascha Bazhin als der Kopf des Teams, der immer ein offenes Ohr hatte; liebe Micha, lieber Tomi, liebe Nici, liebe Sevdije, liebe Karin, danke Euch, dass ihr mir stets mit Rat und Tat bei meinen Experimenten zur Seite gestanden seid; genauso aber auch meinen mitpromovierenden Kolleg\*innen im Labor, danke Euch, Kadda, Friedi und Rami!

Ebenso möchte ich meinen Münchnern danken. Liebe Marion, lieber David, lieber Kian, lieber Marcus, lieber Jona, liebe Amei und lieber Rick. Ihr habt mich nicht nur auf dem Weg zu dieser Arbeit immer begleitet, sondern seid seit Anfang des Studiums an meiner Seite gestanden und habt diese Zeit zu einer unvergesslichen gemacht! Danke lieber Alex und liebe Jana, nur durch Euch wurde ich zu diesem wunderbaren Studium gebracht.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und vor allem meinen Eltern danken! Danke Mama und Papa, ihr habt mir in meinem Leben alle Freiheiten ermöglicht und mich zugleich stets behütet. Ein großer Dank gebührt ebenso meinen Großeltern, Nana und Epi, und meinem Bruder, Hannes!

### 13. EIDESSTAATLICHE VERSICHERUNG

Amann, Niklas Josef

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**„Einfluss adrenergen Signallings auf die Tumorprogression des  
kolorektalen Karzinoms - eine grundwissenschaftliche Untersuchung“**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schriftum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Erlangen, den 05.02.2022

Niklas Amann