

**Glukose-konjugierte Hemmstoffe als Strategie der gezielten Hemmung des
DNA-Reparaturproteins O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase in
Tumorzellen und der Einfluss von *ATP-binding cassette* Transportern**

**Dissertation
zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaft"**

**am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

**vorgelegt von
Karl-Heinz Tomaszowski**

Geb. am 20.08.1983 in Langen (Hessen)

Mainz, April 2014

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juli 2014

One sometimes finds what one is not looking for...

Sir Alexander Fleming

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	Seite 1
1.1. Tumorthherapie.....	Seite 1
1.1.1. Alkylantien als Chemotherapeutika.....	Seite 1
1.1.2. Methylierende Agenzien.....	Seite 2
1.1.2.1. Prozessierung und biologische Effekte der O ⁶ MeG-Läsion.....	Seite 4
1.1.3. Chlorethylierende Agenzien.....	Seite 9
1.1.3.1. Prozessierung und biologische Effekte der O ⁶ ClEtG-Läsion.....	Seite 9
1.2. DNA-Reparatur.....	Seite 12
1.2.1. Direkte DNA-Reparatur.....	Seite 12
1.2.1.1. Dioxygenasen.....	Seite 12
1.2.1.2. O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase.....	Seite 13
1.2.2. Basenexzisionsreparatur.....	Seite 15
1.2.3. Basenfehlpaarungsreparatur.....	Seite 16
1.2.4. Nukleotidexzisionsreparatur.....	Seite 16
1.2.5. Doppelstrang-Reparatur.....	Seite 17
1.2.5.1. Homologe Rekombination.....	Seite 18
1.2.5.2. Nicht-Homologe-Endverknüpfung.....	Seite 19
1.2.6. <i>Interstrand-Crosslink</i> -Reparatur.....	Seite 20
1.2.7. Transläsionssynthese.....	Seite 21
1.3. DNA-Reparaturhemmstoffe als therapeutisches Mittel von Tumoren.....	Seite 21
1.3.1. Potenzierung der Chemotherapie mit MGMT-Hemmstoffen.....	Seite 22
1.4. Transporter als gezielte Pharmakotherapie in der Krebstherapie.....	Seite 23
1.4.1. Glukosetransporter.....	Seite 25
1.4.2. <i>ATP-binding cassette</i> Transporter.....	Seite 26
1.5. Zielsetzung der Arbeit.....	Seite 28

2. Material und Methoden	Seite 30
2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	Seite 30
2.1.1. Geräte und Software.....	Seite 30
2.1.1.1. Geräte.....	Seite 30
2.1.1.2. Software.....	Seite 32
2.2. Zelllinien und Zellkultur.....	Seite 33
2.2.1. Zelllinien.....	Seite 33
2.2.2. Kultivierung von Zellen.....	Seite 33
2.3. Zytostatika, Hemmstoffe und Behandlung von Zellen.....	Seite 34
2.3.1. MGMT-Hemmstoffe.....	Seite 34
2.3.2. Zytostatika.....	Seite 35
2.3.3. Hemmstoffe für Transporter.....	Seite 35
2.4. Zellextrakte und Proteinbestimmung.....	Seite 36
2.4.1. Herstellung von Gesamtzellextrakten.....	Seite 36
2.4.1.1. Sonifizierung.....	Seite 36
2.4.1.2. SDS-PAGE-Probenpuffer.....	Seite 37
2.4.2. Proteinbestimmung nach Bradford.....	Seite 37
2.5. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	Seite 37
2.6. Western-Blot.....	Seite 38
2.6.1. Antikörper.....	Seite 39
2.7. MGMT-Assay.....	Seite 40
2.7.1. Herstellung der ³ H-DNA.....	Seite 40
2.7.2. Bestimmung der MGMT-Aktivität.....	Seite 40
2.8. Durchflusszytometrie.....	Seite 41
2.8.1. Bestimmung des Zelltods mittels Sub-G1-Fraktion.....	Seite 41
2.8.2. Bestimmung der Transportaktivität von ABC-Transportern.....	Seite 41
2.8.2.1. Akkumulations-Assay.....	Seite 42
2.8.2.2. Efflux-Assay.....	Seite 43
2.8.2.3. Fluoreszenzfarbstoffe, Inhibitoren und Testsubstanzen.....	Seite 45
2.9. Koloniebildungsassay.....	Seite 45
2.10. Humanes Xenograft-Mausmodell.....	Seite 46
2.10.1. Versuchstiere.....	Seite 46

2.10.2. Tumorwachstum und Applikation von MGMT-Hemmstoffen.....	Seite 46
2.10.3. Kombinationsbehandlungen mit alkylierenden Agenzien.....	Seite 47
2.10.4. Hemmstoffe und Zytostatika für die Maus-Modell-Experimente.....	Seite 48
2.11. Aufnahmestudien mit radioaktiv-markiertem Glukose-Konjugat.....	Seite 49
2.11.1. Zellbasiertes System.....	Seite 49
2.11.2. Multilamellare Vesikel.....	Seite 50
2.11.3. Radioaktive Stoffe und Transportpuffer der Aufnahmestudien.....	Seite 50
2.12. Partikelbildung der MGMT-Hemmstoffe.....	Seite 51
2.13. Statistik.....	Seite 51
3. Ergebnisse.....	Seite 52
3.1. Sensibilisierung gegenüber alkylierenden Agenzien.....	Seite 52
3.1.1. Wirksamkeit Glukose-konjugierter Hemmstoffe im zellbasiertem <i>in vitro</i> -System.....	Seite 53
3.1.2. Inaktivierung vom MGMT-Protein in verschiedenen Zelltypen.....	Seite 57
3.1.3. Sensibilisierung gegenüber methylierenden Agenzien.....	Seite 60
3.1.4. Sensibilisierung gegenüber chlorethylierenden Agenzien.....	Seite 65
3.1.5. Hemmung der MGMT-Aktivität im Mausmodell.....	Seite 67
3.1.6. Sensibilisierung gegenüber TMZ im Mausmodell.....	Seite 69
3.2. Aufnahmemechanismus der Glukose-Konjugate.....	Seite 71
3.2.1. Untersuchungen der Aufnahme für das Glukose-Konjugat O ⁶ BG-Glu.....	Seite 71
3.2.2. Transportuntersuchungen des radioaktiv-markierten Konjugats O ⁶ BTG-Glu.....	Seite 74
3.2.3. Partikelbildung der Glukose-Konjugate.....	Seite 81
3.3. Einfluss von ABC-Transportern auf die Effektivität der Wirkung von MGMT-Hemmstoffen.....	Seite 86
3.3.1. ABC-Transporter in Tumorzelllinien.....	Seite 87
3.3.2. MGMT-Hemmstoffe fungieren als Substrate von ABC-Transportern.....	Seite 88
3.3.3. Hemmung der ABC-Transporter zur Steigerung der Effektivität von MGMT-Inhibitoren.....	Seite 94

3.3.4. ABC-Transporter-Hemmung zur Steigerung des therapeutischen Effektes von O ⁶ BTG-Glu im A375-Xenograft-Modell.....	Seite 100
4. Diskussion	Seite 105
4.1. Targeting-Strategie mit Glukose-konjugierten MGMT-Hemmstoffen.....	Seite 105
4.2. Einfluss von ABC-Transportern auf Targeting-Strategien mit MGMT-Hemmstoffen.....	Seite 113
5. Zusammenfassung	Seite 123
Anhang	Seite 126
Literaturverzeichnis	Seite 130
Abkürzungsverzeichnis	Seite 143

1. Einleitung

Im Jahr 2012 wurden in Europa 3,45 Millionen neue Krebserkrankungen diagnostiziert und 1,75 Millionen Menschen starben an den Folgen der Krankheit ¹. Es existieren eine Vielzahl von Ursachen die zur Entstehung dieser Krankheit beitragen, u.a. genetische Veränderungen, Umweltfaktoren, Chemikalien, exzessive Sonnenlichtaussetzung, Strahlung oder Viren. Diese Faktoren führen zu Veränderungen der Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, [DNA]). Diese Anomalien sind irreversible Modifikationen der Sequenz und/oder Struktur der DNA oder reversible epigenetische Veränderung der Chromosomen. Betreffen diese Modifikationen eine bestimmte Gruppe von Genen (Protoonkogene, Tumorsuppressorgene) und führen zu deren Aktivierung oder Inhibition, können sich normale Zellen zu Krebszellen entwickeln, die ein unkontrolliertes Wachstum aufweisen ². Tumore werden in gutartig (benigne) - langsam wachsende Zellen, die nicht in umliegende Gewebe einfallen - oder bösartig (maligne) - schnell wachsende Zellen, die in umliegende Gewebe einfallen und häufig weit entfernte Organe besiedeln (metastasieren) - unterteilt. Die maligne Form wird als Krebs bezeichnet. Die Karzinogenese ist ein komplexer Prozess, indem die malignen Tumore eine Vielzahl von biologischen Fähigkeiten entwickeln, die als Voraussetzungen der Krebsentstehung charakterisiert sind ³. Tumore sind komplexe Gebilde, die aus mehreren Zelltypen bestehen, die miteinander in Wechselwirkung stehen. Das Wissen und die Erforschung der zugrunde liegenden Mechanismen der Pathogenese und Resistenzentwicklung ist ein wichtiger Aspekt in der Tumorforschung, um eine geeignete Therapie gegen den Primärtumor und die Metastasen zu entwickeln.

1.1. Tumorthherapie

Die Behandlungsstrategie von Krebs richtet sich nach der Art, Größe und Lokalisation des Tumors, sowie das Fehlen oder dem Vorhandensein von Metastasen. Es existieren die klassischen Therapieformen - Resektion, Bestrahlung oder Chemotherapie - und die zielgerichteten Therapieformen, wie Hormontherapie, Immuntherapie oder gezielte Therapie (*targeted therapy*).

1.1.1. Alkylantien als Chemotherapeutika

Alkylierende Agenzien sind chemische Verbindungen, die eine Alkylgruppe auf biologische Moleküle übertragen, wodurch ihre Struktur und/oder Funktion verändert wird. Alle Lebewesen sind diesen Verbindungen ständig ausgesetzt, da sie eine hohe Präsenz in der Umwelt aufweisen und als metabolische Stoffe in den Zellen vorkommen ⁴. Hauptquellen von

exogenen Alkylantien sind Nahrungsmittel und Schadstoffe (z.B. Tabakrauch) ^{5,6}. Alkylierende Agenzien besitzen aufgrund ihrer zytotoxischen und karzinogenen Eigenschaften eine schädigende Wirkung auf den menschlichen Organismus. Dennoch werden einige Alkylantien in der Tumorthherapie als systemische Chemotherapeutika (Zytostatika) verwendet ⁷. Alkylierende Agenzien werden abhängig von ihrer chemischen Reaktion (Nucleophile Substitution [S_N]) in zwei unterschiedliche Typen unterteilt: S_{N1} und S_{N2} . Beim S_{N1} -Typ reagiert das alkylierende Agens direkt mit dem biologischen Molekül, wobei beim S_{N2} -Typ erst ein Zwischenprodukt gebildet wird. Alkylantien reagieren mit den Stickstoff- oder Sauerstoffatomen der DNA und führen zur Bildung von kovalenten Addukten ⁸. Das Muster der DNA-Läsionen ist abhängig von der Anzahl der reaktiven Stellen des Alkylanz (monofunktionell, bifunktionell), des chemischen Reaktionsmechanismus (S_{N1} , S_{N2}), der angehängten Alkylgruppe (Methylgruppe, Chlorethylgruppe) und dem DNA-Typ (Doppelstrang, Einzelstrang). Die entstehenden DNA-Addukte üben diverse Effekte auf das Zellsystem aus. Einige Läsionen führen zu Mutationen in der DNA-Sequenz, was deren Integrität beeinträchtigt und die Entstehung von Tumoren fördert. DNA-Addukte sind ebenfalls in der Lage die Zelltodmechanismen der Zelle zu aktivieren; dies geschieht über eine Blockierung der Replikation und/oder Transkription, sowie durch Prozessierung in toxische Läsionen wie den DNA-Doppelstrangbruch (*DNA double strand break*, [DSB]). Obwohl die Bildung der DNA-Addukte durch alkylierende Agenzien die Hauptwirkung darstellen, werden weitere biologische Moleküle in der Zelle alkyliert und geschädigt, einschließlich Ribonukleinsäuren (*ribonucleic acid*, [RNA]), Proteine, Lipide und mitochondriale DNA.

Zytostatika, die als Chemotherapeutikum verwendet werden, sind häufig vom S_{N1} -Typ und mono- oder bifunktionell. S_{N1} -alkylierende Agenzien sind in der Lage die Sauerstoff- und Stickstoffatome der DNA zu modifizieren, wohingegen die S_{N2} -Alkylantien hauptsächlich nur die Stickstoffatome verändern. Zwei wichtige Klassen der Zytostatika sind die monofunktionellen methylierenden oder chlorethylierenden Agenzien. Insgesamt führen diese Zytostatika zu 13 verschiedene Basenmodifikationen: N_{1-} , N_{3-} , N^6- und N_7 -Alkyladenin, O^2- und N_3 -Alkylcytosin, N_{1-} , N_{3-} , O^6- und N_7 -Alkylguanin sowie N_3- und O^4 -Alkylthymidin ⁹.

1.1.2. Methylierende Agenzien

Monofunktionelle methylierende Agenzien führen zu Modifikationen an der DNA, wobei N_7 -Methylguanin [N_7MeG], N_3 -Methyladenin [N_3MeA] und O^6 -Methylguanin [O^6MeG] die primären Addukte darstellen ¹⁰. Die N_7MeG -Läsion ist die häufigste Methylierung der DNA (ca. 60-80 % der Alkylierungen), besitzt selbst aber keine mutagene oder toxische Eigenschaft. Nach spontaner Depurinierung entsteht jedoch eine apurinische Stelle, die

mutagen und toxisch wirkt. Die N₃MeA-Läsion, die 10-20 % der Alkylierungen repräsentiert, weist eine hohe zytotoxische Wirkung auf. Dieses Addukt blockt DNA-Polymerasen und inhibiert somit den Replikationszyklus¹¹. Beide Stickstoff-Modifikationen werden von der Basenexzisionsreparatur [BER] (1.2.2.) repariert. Unter den Sauerstoffatomen der DNA wird die O⁶-Position des Guanins am häufigsten methyliert und generiert das DNA-Addukt O⁶MeG. Die Bildung dieser Läsion, obwohl sie nur 6-8 % der Alkylierungen repräsentiert, ist aufgrund ihrer pleiotropen Effekte von enormer biologischer Relevanz (1.1.2.1.). Das DNA-Reparaturprotein O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase [MGMT] (1.2.1.2.) ist in der Lage dieses DNA-Addukt zu entfernen (Abbildung 1). Weitere Modifikationen der DNA, die mutagene und zytotoxische Eigenschaften besitzen, repräsentieren nur einen geringen Anteil an den DNA-Läsionen und werden von den Reparaturmechanismen der Zellen repariert.

S_N1-methylierende Agenzien finden Anwendung als systemische Chemotherapeutika. Die Zytostatika Dacarbazin, Procarbazin und Temozolomid [TMZ], aus der Stoffklasse der Triazine, sowie das Nitrosoharnstoff Streptozotocin [STZ] werden zur Behandlung von metastasierenden Melanomen, Sarkomen, Hodgkin-Lymphomas, Insulinomen oder malignen Gliomen verwendet⁷. Die Zytostatika Procarbazin und Dacarbazin benötigen zur Bildung ihrer reaktiven Metaboliten eine metabolische Aktivierung^{12,13}, wobei Streptozotocin die DNA direkt methyliert¹⁴. TMZ generiert sein aktives Metabolit Monomethyl-triazenoimidazol-carboxamid [MTIC] durch spontane Hydrolyse im physiologischen Milieu¹⁵ (Abbildung 1).

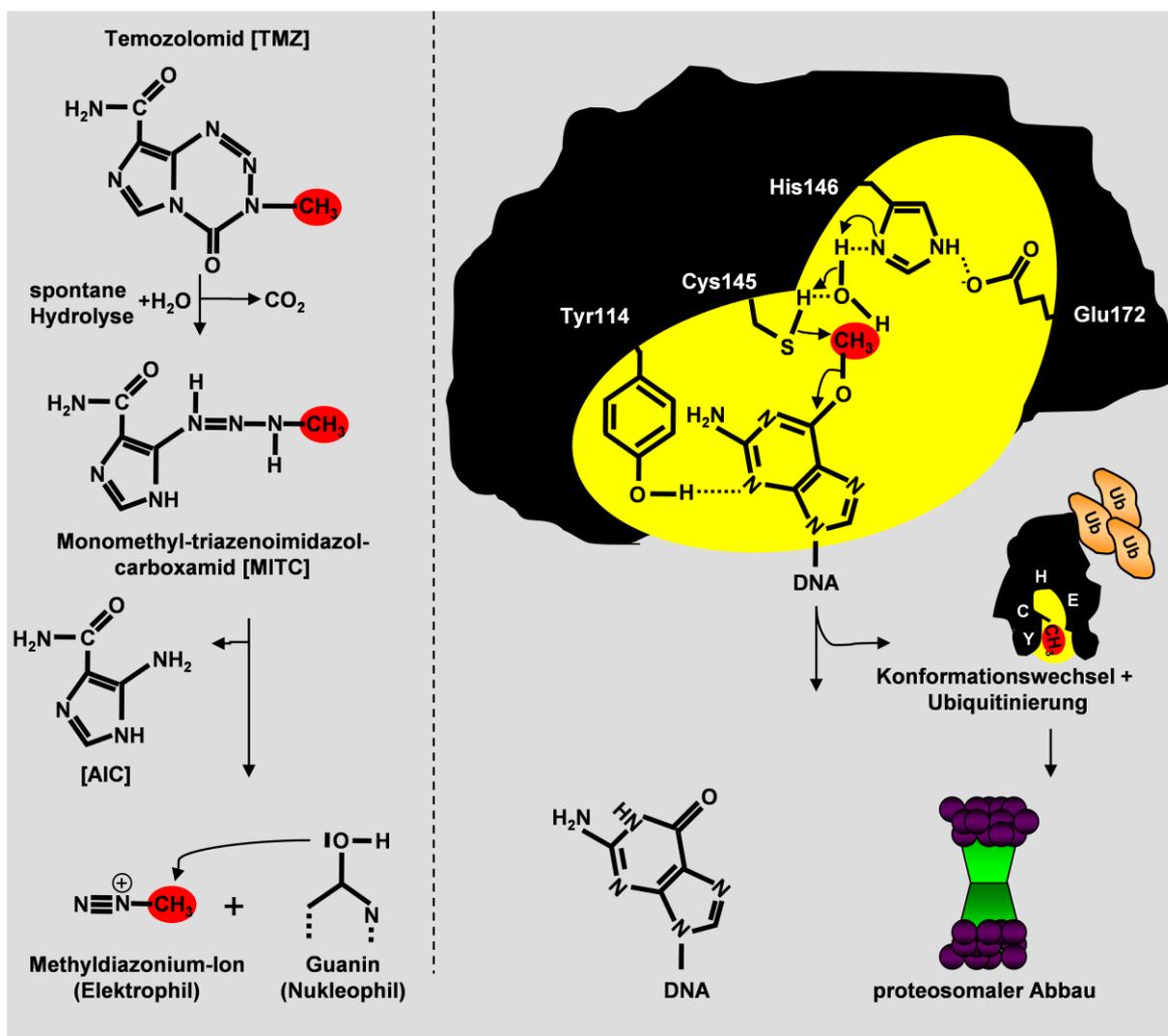


Abbildung 1: Übersicht der Bildung von O⁶MeG durch Temozolomid und die Reparatur durch MGMT. Details siehe im Text (1.1.2. und 1.2.1.2.). Modifiziert nach Kaina et al., (2007) und Pegg et al., (2011).

1.1.2.1. Prozessierung und biologische Effekte der O⁶MeG-Läsion

Die Alkylierung der O⁶-Position des Guanins führt abhängig vom Zelltyp und den zellulären Komponenten zu verschiedenen biologischen Effekten. Obwohl diese Läsion nur zu einem geringen Anteil durch S_N1-alkylierende Agenzien gebildet wird, ist sie für deren Hauptwirkung der mutagenen und zytotoxischen Effekten verantwortlich. Das MGMT-Protein ist in der Lage diese Läsionen zu entfernen. Deshalb bestimmt die Expression dieses Proteins in Tumoren sowie dessen pharmakologische Inaktivierung die Effektivität von Zytostatika (1.3.1.). Die kleine O⁶MeG-Läsion blockt nicht die DNA-Replikation und verbleibt aufgrund der hohen Stabilität kontinuierlich in der DNA, wenn sie nicht vom MGMT-Protein entfernt wird¹⁶. Diese Läsion übt abhängig vom zellulären Hintergrund mutagene, klastogene und zytotoxische Effekte aus⁹ (Abbildung 2).

Mutagene Eigenschaften besitzt O⁶MeG durch die Basenfehlpaarung mit Thymin ¹⁷. Beim Replikationszyklus fügen konventionelle DNA-Polymerasen oder Transläsions-Polymerasen ¹⁸ die falsche Base Thymin, mit einer Wahrscheinlichkeit von 1/3, in den gegenüberliegenden DNA-Strang ein, anstelle der korrekten Base Cytosin ¹⁹. Wird die O⁶MeG/Thymin-Fehlpaarung nicht vom MGMT-Protein entfernt und/oder über die Basenfehlpaarungsreparatur (*DNA mismatch repair*, [MMR]) weiter prozessiert, findet im anschließenden Replikationszyklus eine Transition von Guanin/Cytosin zu Adenin/Thymin statt. Der Einfluss beider Reparaturwege auf die Mutationsrate von S_N1-methylierenden Agenzien wurde vielfach experimentell untersucht und bestätigt. So weist schon eine geringe Expression des MGMT-Proteins einen erfolgreichen Schutz vor Mutationen und dem Zelltod auf. Demgegenüber induzieren MMR-profiziente Zellen in Anwesenheit von O⁶MeG den Zelltod (siehe unten) und MMR-defiziente Zellen tolerieren den Schaden, allerdings mit einer erhöhten Mutationsrate ²⁰⁻²². Die Präsenz von MGMT in proliferierenden Zellen, besonders Stammzellen, hat in der Krebstherapie eine wichtige Rolle. Dieses Protein verhindert die Induktion von Mutationen und somit die Bildung von Zweittumoren durch alkylierende Chemotherapeutika.

O⁶MeG wurde schon vor 30 Jahren als karzinogene Läsion identifiziert. Die ständige Präsenz dieser DNA-Läsion nach Gabe von alkylierenden Agenzien im Rattenhirn, verbunden mit einer geringen MGMT-Expression, korreliert mit der Bildung von Hirntumoren ^{23,24}. Die Karzinogenität von O⁶MeG wurde des Weiteren durch Studien mit transgenen Mäusen, die MGMT überexprimieren oder eine funktionsunfähige Variante des Proteins tragen (*knock-out*), bestätigt. Mäuse mit erhöhter MGMT-Expression weisen nach Behandlung mit alkylierenden Agenzien eine Reduktion in der Tumorbildung und Karzinogenese in verschiedenen Geweben auf ²⁵⁻²⁹. Übereinstimmend zeigen MGMT-defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine vermehrte Induktion von Tumoren nach Behandlung mit alkylierenden Agenzien ^{30,31}.

Die DNA-Läsion O⁶MeG führt ebenfalls zu Schwesterchromatidaustauschen (*sister chromatid exchange*, [SCE]) und Chromosomenaberrationen [CA] ³². Geringe Dosen von S_N1-methylierenden Agenzien, die nicht toxisch wirken, bewirken eine Induktion von SCE, wobei höhere Konzentrationen für die Entwicklung von CA erforderlich sind ³³. SCE und CA werden im zweiten Replikationszyklus der S-Phase gebildet und erfordern die Prozessierung über eine intakte MMR ³⁴. Zellen mit einer defizienten MMR weisen weniger CA auf ^{35,36}. Die Blockierung der Replikationsgabel und die Bildung von DSB durch MMR-Prozessierung werden als wahrscheinliches Modell zur Bildung von SCE und CA angesehen ⁹.

Schäden an der DNA führen zu verschiedenen Zelltodmechanismen; diese sind unter anderem Apoptose, Nekrose, Autophagie, Seneszenz oder mitotische Katastrophe^{37,38}. Die DNA-Läsion O⁶MeG löst vorwiegend Apoptose aus³⁹. Im Vergleich zu MGMT-defizienten Zellen führen S_N1-methylierende Agenzien in MGMT-profizienten Zelllinien zu einer verminderten Apoptoseinduktion^{34,40}. Identisch zur Mutagenität und Klastogenität, löst die O⁶MeG-Läsion nicht direkt die Apoptose aus, sondern erfordert eine Beteiligung der DNA-Replikation^{41,42} und die Prozessierung über die MMR^{43,44}.

Die bedeutende Rolle der MMR bei der Apoptoseinduktion und Klastogenität wird durch das *processing model* erklärt²². In diesem Modell führt die Reparatur der Fehlpaarung O⁶MeG/Thymidin durch die MMR zur erneuten Einsetzung der falschen Base Thymidin. Die wiederholte Erkennung und Prozessierung der Fehlpaarung führt zur ständigen Persistenz von Einzelstrangbrüchen⁴⁵ und in den darauffolgenden Replikationszyklen zum Blockieren und Zusammenbruch der Replikationsgabel, der Entstehung von DSB und der Induktion der Apoptose⁴⁶. Die Notwendigkeit von DSB zur Apoptoseinduktion, die im zweiten Zellzyklus entstehen, wurde in verschiedenen Zellsystemen bewiesen^{41,42,47} (Abbildung 2).

Die Serin/Threonin-Proteinkinasen *ataxia telangiectasia mutated* [ATM] und *ataxia telangiectasia and Rad3-related* [ATR], sowie das Tumorsuppressorprotein p53 besitzen eine entscheidende Rolle für die O⁶MeG-vermittelte Apoptose. Die Blockierung der Replikationsgabel und Entstehung von DSB aktivieren ATM und ATR⁴⁸. Diese beiden Proteine initiieren eine Kaskade von Proteinen die den Zellzyklus kontrollieren, an der DNA-Reparatur beteiligt sind oder die Apoptose auslösen⁴⁹. Übersteigt der induzierte Schaden an der DNA die Reparaturkapazität der Zelle, wird die Apoptose als Schutzmechanismus ausgelöst. Die O⁶MeG-Läsion aktiviert vorwiegend die Apoptose über den extrinsischen oder den intrinsischen Signalweg³⁹.

Beim extrinsischen Signalweg führt die Aktivierung des Rezeptors FAS zur Bildung eines Signalkomplexes (*death-inducing signaling complex*). In diesem Komplex kommt es zur Aktivierung der Caspase-8 und -10, die eine Kaskade von Caspasen initiieren. Diese Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6 und -7) führen zur proteolytischen Spaltung und Inaktivierung von zellulären Proteinen sowie zur Aktivierung der Caspasen-aktivierten DNasen, die am Abbau der DNA beteiligt sind. Der intrinsische Signalweg wird durch intrazellulären Stress (oxidativer Stress, DNA-Schäden) ausgelöst. Proapoptotische Faktoren der Bcl-2-Familie führen zur Freisetzung von Cytochrom C und anderen Proteinen aus dem mitochondrialen Intermembranraum ins Zytoplasma. Die Bildung des Apoptosoms, bestehend aus Pro-Caspase-9, apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1 [Apaf-1] und Cytochrom C,

initiiert ebenfalls die Kaskade an Caspasen, die anschließend die Zerschneidung der DNA und den Abbau intrazellulärer Proteine bewirken³⁸.

Welcher der beiden Signalwege ausgelöst wird hängt unter anderem vom p53 Status der Zelle ab⁹. Zellen mit einem mutierten p53-Protein aktivieren vorwiegend den mitochondrialen Apoptoseweg⁴⁶, wohingegen p53-Wildtyp Zellen die Apoptose über den FAS-Rezeptor bevorzugen^{41,47,50}. Neben den bereits erwähnten Proteinen, die für die Schadensantwort und Apoptosinduktion verantwortlich sind, existieren noch weitere Proteine, die einen Einfluss auf die O⁶MeG-vermittelte Antwort besitzen, u. a. der Transkriptionsfaktor *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* [NF-κB], die Serin/Threonin-Kinase AKT, die Phosphatase *Phosphatase and Tensin homolog* [PTEN], Caspase-2, das antiapoptotische Protein Survivin und die Kinasen *Jun N-terminal kinase* [JNK] sowie p38⁴⁹.

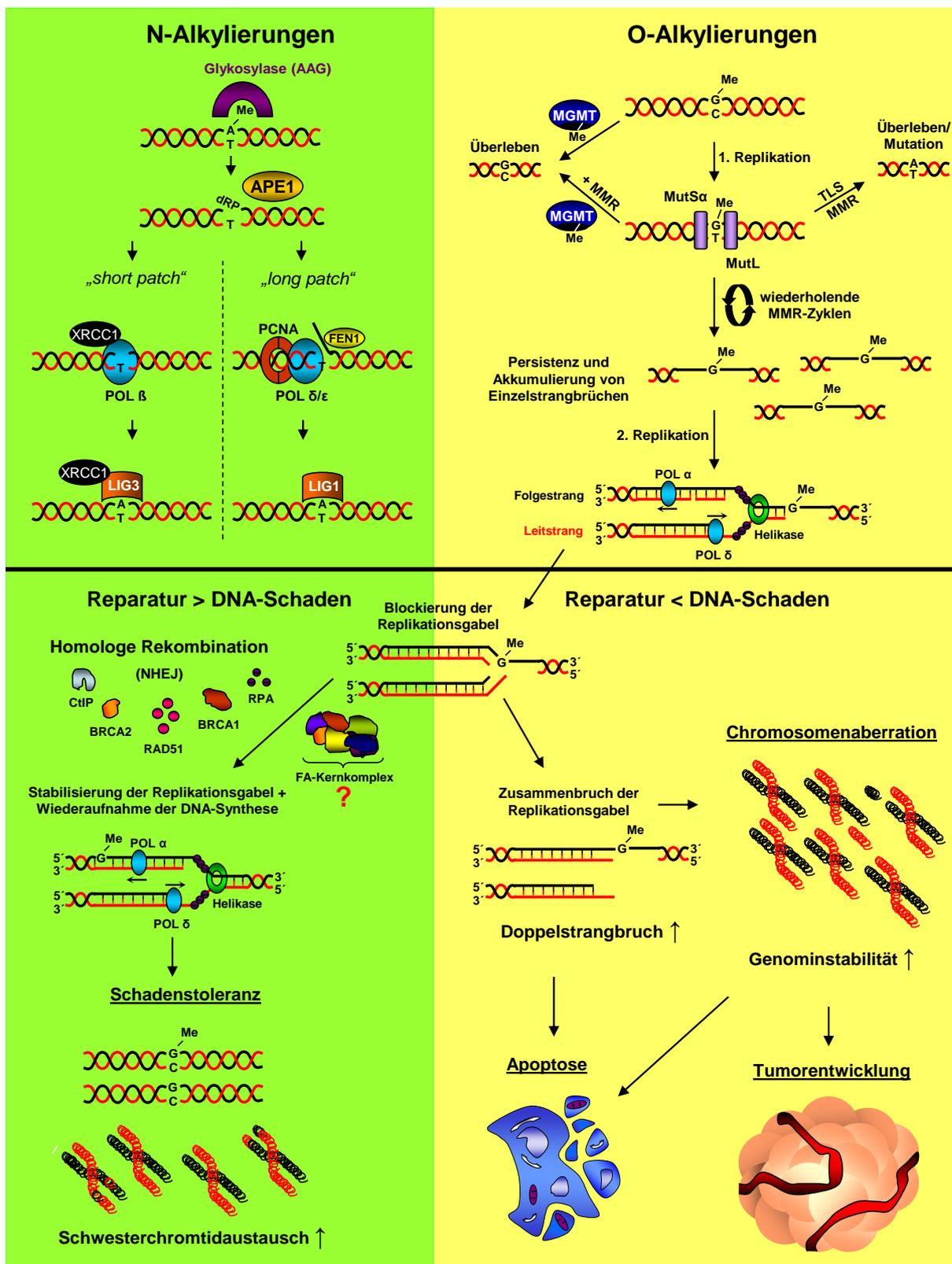


Abbildung 2: Übersicht der beteiligten Reparaturwege nach Behandlung mit methylierenden Agenzien (z.B. TMZ) und die biologischen Konsequenzen der O⁶MeG-Läsion. Details siehe im Text (1.1.2.1.; 1.2.). Modifiziert nach Kaina et al., (2007) und Fu et al., (2012).

1.1.3. Chlorethylierende Agenzien

Chlorethylierende Agenzien aus der Gruppe der Nitrosoharnstoffe werden ebenfalls in der Krebstherapie verwendet. Zu dieser Klasse der Zytostatika gehören Carmustin, Nimustin, Fotemustin und Lomustin [CCNU]. Diese S_N1 -chlorethylierenden Agenzien werden vorwiegend als *second-line*-Therapie zur Behandlung von Glioblastomen und metastasierenden Melanomen verwendet^{51,52}. Diese chlorethylierenden Agenzien benötigen keine metabolische Aktivierung. Bei physiologischen Bedingungen zerfallen die Nitrosoharnstoffe in das reaktive 2-Chlorethyldiazohydroxid, welches zur Alkylierung der DNA führt. Des Weiteren wird über die gebildete Isocyansäure eine Carbamoylisierung von Proteinen verursacht, die aber keinen großen Effekt auf die Zytotoxizität der Zelle ausübt⁵³. Die S_N1 -chlorethylierenden Agenzien reagieren ebenfalls mit den Stickstoff- und Sauerstoffatomen der DNA. Identisch zu den methylierenden Agenzien ist die Alkylierung der N_7 -Position des Guanins die primäre DNA-Läsion (ca. 95 % der Alkylierungen)⁵⁴. Das gebildete N_7 -(2-Chlorethyl)-guanin, sowie die entstehenden *Intrastrand-Crosslinks* mit einem benachbarten Guanin, werden effizient von der Nukleotidexzisionsreparatur [NER] repariert⁵⁵. Die Alkylierung der O^6 -Position des Guanins führt zur Bildung der DNA-Läsion O^6 -Chlorethylguanin [O^6 CIeTG]. Diese Basenmodifikation, obwohl sie nur 2-5 % der Gesamtalkylierungen beträgt⁵⁴, ist für die Hauptwirkung der Zytotoxizität von S_N1 -chlorethylierenden Agenzien verantwortlich⁵⁶. Die Expression des MGMT-Proteins bietet einen wirksamen Schutz gegenüber S_N1 -chlorethylierenden Agenzien, da es die O^6 CIeTG-Läsion erkennt und repariert⁵⁷.

1.1.3.1. Prozessierung und biologische Effekte der O^6 CIeTG-Läsion

Identisch zu O^6 MeG besitzt die O^6 CIeTG-Läsion mutagene, karzinogene, klastogene und zytotoxische Effekte^{32,57-60}. Wird die DNA-Läsion O^6 CIeTG nicht von MGMT repariert, bildet sich über intramolekulare Umlagerung zuerst das stabile intermediäre Zwischenprodukt N_1 - O^6 -Ethanoguanin und anschließend der N_1 -Guanin- N_3 -Cytosin *Interstrand-Crosslink* [ICL]⁶¹. Der gesamte Prozess der intramolekularen Umlagerung benötigt in den Zellen 6-12 Stunden⁵³. In diesem Zeitraum schützt das MGMT-Protein die Zelle vor der Bildung des ICL, indem es direkt die O^6 CIeTG-Läsion entfernt oder mit dem Zwischenprodukt N_1 - O^6 -Ethanoguanin reagiert und kovalent an der DNA verbleibt. Die biologische Auswirkung der kovalenten Bindung des MGMT-Proteins an der DNA ist nicht bekannt⁶². Die kovalente Verknüpfung der DNA-Stränge ist eine extrem toxische Läsion. Schon eine geringe Anzahl von 40 ICL im Genom reparatur-defizienter Zellen führt zum Zelltod⁶³. Die Reparatur der ICL ist komplex und erfordert die Beteiligung von mehreren DNA-Reparaturmechanismen der Zelle (siehe 1.2.6.) (Abbildung 3).

Der Mechanismus des Zelltods, der durch chlorethylierende Agenzien induziert wird, ist nicht komplett verstanden. Im Gegensatz zu methylierenden Agenzien induzieren chlorethylierende Agenzien den Zelltod durch Apoptose, Nekrose und/oder mitotischer Katastrophe^{58,64,65}. Die kovalente Verknüpfung der DNA verhindert die Trennung der DNA-Stränge und blockiert somit die Replikation und Transkription der Zelle. Des Weiteren verändern ICL die Chromatinstruktur, dies könnte DNA-bindende Proteine beeinflussen und somit die Expression lebenswichtiger Proteine verhindern⁶⁵. Die Beeinflussung der Replikation wird jedoch als Hauptwirkung der Zytotoxizität der ICL angesehen. Die Blockierung des Replisoms am ICL führt in der S-Phase zum Zusammenbruch der Replikationsgabel, der Bildung von DSB und zum Zellzyklus-Arrest^{64,66}. Im Gegensatz zu methylierenden Agenzien werden die DSB in der ersten S-Phase des Behandlungszyklus gebildet und sind nicht von der Prozessierung der MMR abhängig⁴³. Die Entstehung der DSB und die Blockierung der Replikationsgabel führen zur Aktivierung von ATM und ATR, die simultan zu den methylierenden Agenzien einen entscheidenden Einfluss auf die Induktion von DNA-Reparatur, Zellzyklus-Arrest und dem Zelltod besitzen⁴⁹.

Der Transkriptionsfaktor p53 ist für chlorethylierende Agenzien ebenfalls von entscheidender Bedeutung. Neben der Stimulation der Apoptose, reguliert p53 die Expression von DNA-Reparaturproteinen⁴⁹. Die Hochregulation von NER-Proteinen, die bei der Reparatur der ICL beteiligt sind (nach Aussetzung gegenüber ICL-bildenden Agenzien), besitzt einen großen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber chlorethylierenden Chemotherapeutika^{64,67}. Dementsprechend führt p53 abhängig von alkylierenden Chemotherapeutika - methylierend oder chlorethylierend - zur Induktion der Apoptose oder Expression wichtiger DNA-Reparaturproteine und somit zur Resistenz.

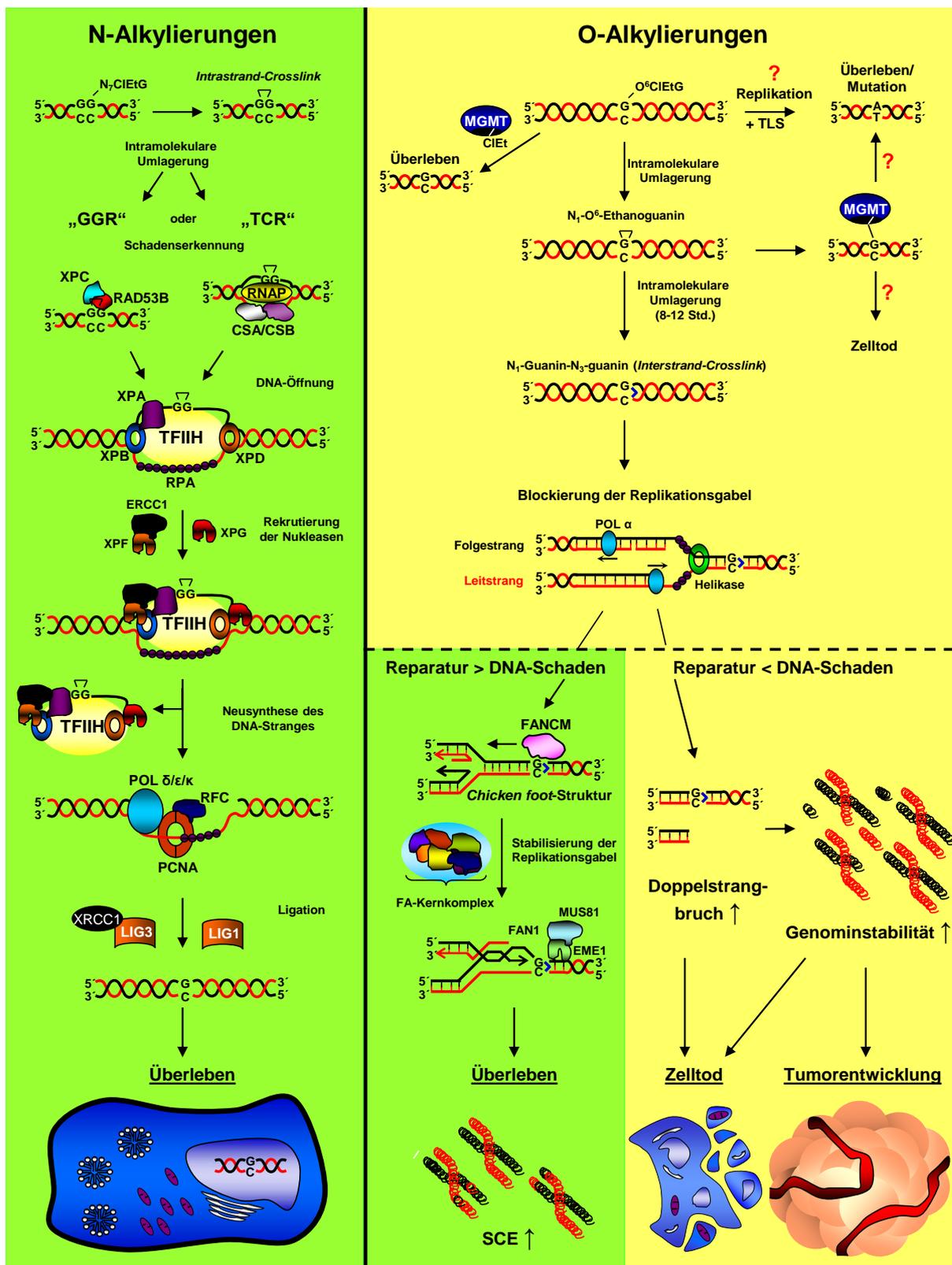


Abbildung 3: Übersicht der beteiligten Reparaturwege nach Behandlung mit chlorethylierenden Agenzien (z.B. CCNU) und die biologischen Konsequenzen der O⁶CIEtG-Läsion. Details siehe im Text (1.1.3.1.; 1.2.). Modifiziert nach Kaina et al., (2007); Fu et al., (2012) und Deans et al., (2011).

1.2. DNA-Reparatur

Die DNA - Träger der Erbinformation - ist das empfindlichste Biomolekül der Zelle, da es nicht ersetzt werden kann. Schäden an der DNA entstehen jeden Tag durch endogene und exogene Faktoren. Dementsprechend sind Zellen auf eine effektive Reparatur der DNA angewiesen, um die genomische Integrität aufrecht zu erhalten. Die besondere Stellung von DNA-Reparaturmechanismen wird über die Entwicklung von Krankheiten deutlich, die auf Mutationen und Defekten in DNA-Reparaturgenen zurückzuführen sind^{68,69}. In Tumoren ist die Präsenz der DNA-Schadensantwort (*DNA damage response*, [DDR]) kontraproduktiv; sie stellt einen wichtigen Resistenzfaktor gegenüber der Krebstherapie dar. S_N1-alkylierende Agenzien verursachen verschiedene Basenmodifikation, die auf unterschiedliche Weise prozessiert und repariert werden. Dementsprechend sind mehrere DNA-Reparaturmechanismen, die miteinander oder unabhängig voneinander interagieren, für die Sensitivität gegenüber alkylierenden Chemotherapeutika verantwortlich. Bei den methylierenden Agenzien ist die Entfernung der primären Läsionen über MGMT und BER, die Prozessierung über MMR und/oder Transläsionssynthese [TLS] sowie die Reparatur der DSB über homologe Rekombination [HR] von entscheidender Bedeutung (Abbildung 2). Bei den chlorethylierenden Agenzien bestimmen die Reparaturmechanismen MGMT, NER und ICL-Reparatur die induzierte Toxizität (Abbildung 3).

Im nächsten Abschnitt werden die oben erwähnten menschlichen Reparaturmechanismen kurz beschrieben. Auf die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (1.2.1.2.) wird aufgrund der besonderen Stellung in dieser Arbeit detailliert eingegangen.

1.2.1. Direkte DNA-Reparatur

Bei der direkten DNA-Reparatur vermittelt ein einzelnes Protein eine fehlerfreie Entfernung von wenigen spezifischen Läsionen. Die Reparatur benötigt keine Einschnidung in das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA oder die Entfernung der geschädigten Base⁷⁰.

1.2.1.1. Dioxygenasen

Die beiden Proteine *AlkB homolog 2* und *3* [ABH2 und ABH3] gehören zur Familie der α -Ketoglutarat- und Eisen(II)-abhängigen Dioxygenasen. Sie sind an der Reparatur von den N-Alkylierungen N₁-Methyladenin, N₃-Methylcytosin, N₃-Methylthymidin und

N₁-Methylguanin beteiligt. Die Reparatur erfolgt über Hydroxylierung der Methylgruppe und einer anschließenden spontanen Deformylierung⁹.

1.2.1.2. O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase

Die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase [MGMT] (alias O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase [AGT]) ist ein wichtiges Reparaturprotein in Bakterien, Pilzen, Archaeen und Eukaryoten. Dieses Protein wurde zuerst im Bakterium *Escherichia coli* [*E. coli*] gefunden. Das Bakterium besitzt eine induzierbare Form (Ada) und eine nicht-induzierbare Form (Ogt) des Reparaturproteins^{71,72}. Das menschliche MGMT-Gen ist auf dem Chromosom 10q26 lokalisiert und dessen Transkription führt zu einem Protein, bestehend aus 207 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 21,645 Dalton. MGMT ist im Zytoplasma lokalisiert und transloziert vermutlich nach Alkylierung der DNA in den Zellkern⁷³. Die Expression dieses Proteins ist nicht essentiell, jedoch nach Exposition der *knock-out*-Tiere gegenüber Alkylantien wurde eine erhöhte Toxizität, Mutagenität und Karzinogenität nachgewiesen (1.1.2.1. und 1.1.3.1.).

Kristallstrukturen sind vom Ada-Protein aus *E. coli* und dem humanen MGMT vorhanden⁷⁴. Das Protein besteht aus einer C-terminalen Domäne, welche das aktive Zentrum und die DNA-Bindungsstelle beinhaltet, und einer N-terminalen Domäne, die für die strukturellen Eigenschaften verantwortlich ist⁷⁵. Alkyltransferasen aller Spezies weisen eine konservierte Aminosäuresequenz um das aktive Zentrum auf, das PCHR-Motiv (Prolin-Cystein-Histidin-Arginin). Das hochreaktive Cystein an der Position 145 ist für den Transfer der Alkylgruppe von der O⁶-Position des Guanins verantwortlich. Die anderen konservierten Aminosäuren des Proteins unterstützen die Reaktivität des Cysteins und sind am korrekten Ablauf der Reparatur beteiligt (Abbildung 1). Die Reparatur wird über die Bindung des MGMT-Proteins in der kleinen Furche der DNA initiiert. Die Bindung führt zur Biegung der DNA um 15°, Aufweitung der kleinen Furche und zum positionieren der geschädigten Base in die aktive Tasche des Proteins. Nach Entfernung des Alkylrestes wird die Base wieder freigelassen⁷⁶. Unbeschädigte Basen werden nur transient in die aktive Tasche positioniert und sofort wieder freigelassen, da keine Reaktion des Cysteins mit einer Alkylgruppe stattfindet. Das Überprüfen der DNA erfordert keine Kofaktoren oder Energie aus der Hydrolyse des Adenosintriphosphat [ATP]. Sie läuft bevorzugt in 5' zu 3' Richtung der DNA ab und beteiligt eventuell Komplexe von MGMT-Molekülen⁷⁷. Der Transfer der Alkylgruppe auf das reaktive Cystein inaktiviert das Protein und bewirkt eine Konformationsänderung, die eine Ubiquitinierung induziert. Die Ubiquitinierung von MGMT reduziert die DNA-Bindung und fungiert als Signal des proteosomalen Abbaus⁷⁸. Die beteiligte Ubiquitin-Ligase sowie die Erkennungssequenz der Ubiquitinierung sind beim Menschen noch unbekannt. Aufgrund

der Inaktivierung repariert jedes MGMT-Protein nur eine DNA-Läsion. Deshalb ist die Reparaturkapazität der Zelle von der Menge der initialen Moleküle sowie der Dauer der Resynthese des MGMT-Proteins abhängig. MGMT besitzt nur eine geringe Sequenzspezifität für die O⁶-Alkylguanin-Läsionen. Die O⁶MeG-Läsion wird unabhängig von der gepaarten Base (Cytosin oder Thymin) effizient entfernt⁷⁹. Die Reparatur von doppelsträngiger DNA (*double stranded DNA*, [dsDNA]) und einzelsträngiger DNA (*single stranded DNA*, [ssDNA]) ist sehr effektiv, wobei die Affinität für die RNA gering ausfällt⁸⁰. Die Alkyladdukte an der O⁶-Position des Guanins werden nicht mit gleicher Effektivität repariert. Die relativen Raten der Reparatur sind: benzyl > methyl > ethyl > n-propyl > n-butyl⁸¹. Das humane MGMT-Protein repariert ebenfalls die Addukte O⁴-Methylthymidin sowie größere Addukte, einschließlich das O⁶-(4-oxo-4-(3-pyridyl)butyl]guanin, welches aus dem karzinogenen Tabakrauchprodukt 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon [NNK] hervorgeht⁸².

Es existieren unterschiedliche Polymorphismen des MGMT-Gens. Diese Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, [SNP]) treten im Promotor oder dem aktiven Gen auf und beeinflussen womöglich die Expression des Proteins, sowie seine Stabilität oder Aktivität. Es existiert jedoch keine eindeutige Korrelation zwischen den verschiedenen Polymorphismen und der Krebsinzidenz oder dem Therapieerfolg⁸³. Die Expression von MGMT im Normalgewebe und Tumoren ist variabel. In den meisten Spezies ist die höchste Expression in der Leber zu finden, gefolgt von der Lunge und Niere. Das Gehirn und die CD34-positiven Knochenmarkszellen weisen nur eine sehr geringe Expression auf^{84,85}. Die MGMT-Aktivität wurde in allen Tumortypen nachgewiesen und besitzt innerhalb des Tumors ein heterogenes Expressionsmuster. Insgesamt weisen Tumore eine höhere Expression des MGMT-Proteins auf als das umliegende Normalgewebe⁸⁶. Der Regulationsmechanismus und die Auswirkungen von therapierelevanten Komponenten (Strahlung, alkylierende Agenzien) auf die Expression des MGMT-Proteins sind bisher nicht vollständig erforscht. Eine speziesspezifische Regulation erschwert diesen Sachverhalt. In Nagern induziert ionisierende Bestrahlung sowie Alkylantien eine transkriptionelle Aktivierung des Promotors und eine höhere Reparaturkapazität. Diese Induktion wurde jedoch nie für das humane System bestätigt^{87,88}. Der Transkriptionsfaktor p53 besitzt einen Effekt auf den humanen Regulationsmechanismus des Proteins. Obwohl keine Bindungsstellen im humanen MGMT-Promotor nachgewiesen wurden, wird die basale Expression durch diesen Transkriptionsfaktor beeinflusst⁸⁹. Die epigenetische Prägung des MGMT-Gens übt einen großen Einfluss auf die Expression des Proteins aus. Methylierungen in den CpG-Inseln des Promotors führen zum Verlust der transkriptionellen Expression⁹⁰. Dieses Methylierungsmuster existiert in diversen Tumorzelllinien sowie im Tumormaterial und weist eine Korrelation mit dem Therapieerfolg gegenüber alkylierenden Chemotherapeutika auf^{91,92}. In der Therapie des Glioblastoms dient der Methylierungsstatus des MGMT-Promotors als prognostischer Faktor⁹³.

1.2.2. Basenexzisionsreparatur

Die Basenexzisionsreparatur [BER] ist der primäre Reparaturmechanismus für kleine Basenmodifikationen, die nicht die Helixstruktur des DNA-Stranges deformieren. Diese Modifikationen entstehen durch Alkylierung, Oxidation oder Desaminierung von DNA-Basen. Die BER wird in „*short-patch*“ und „*long-patch*“ Reparatur unterteilt (Abbildung 2).

Der initiale Schritt wird über spezielle DNA-Glykosylasen eingeleitet, im Menschen sind derzeit elf verschiedene DNA-Glykosylasen identifiziert. Diese Proteine erkennen und entfernen die geschädigte Base durch Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung, daraufhin entsteht eine apurinische/apyrimidinische Stelle [AP] in der DNA. Die Stickstoffmodifikation N₃MeA, N₇MeG und N₃-Methylguanin, die durch S_N1-methylierende Agenzien entstehen, werden von der N-Methylpurin-DNA-Glykosylase [MPG] (alias 3-Alkyladenin-DNA-Glykosylase [AAG]) repariert⁹⁴. Die AP ist ein Substrat für die AP-Endonukleasen. Diese Proteine hydrolysieren die Phosphodiesterbindung und erzeugen einen DNA-Einzelstrangbruch (*DNA single strand break*, [SSB]), mit einer 3'Hydroxylgruppe und einem 5'desoxyribose-Phosphat [dRP]. Die wichtigste humane AP-Endonuklease ist die *apurinic Endonulcease I* [APE1] (alias Ref-1). Die anschließende Reparatur des SSB erfolgt entweder über die „*short-patch*“ oder „*long-patch*“ BER. In der „*short-patch*“ BER entfernt die DNA-Polymerase β [Pol β] den 5'dRP-Teil und hängt ein oder zwei Nukleotide an. Die Reparatur wird durch die Ligation des DNA-Stranges über die DNA-Ligase III [LIG3] abgeschlossen. In der „*long patch*“ BER werden 2-8 Nukleotide um die AP synthetisiert. Dieser Prozess wird von den DNA-Polymerasen δ [POL δ] oder ε [POL ε], in Abhängigkeit der Faktoren *proliferating cell nuclear antigen* [PCNA] und dem 9-1-1-Komplex (Rad9, Rad1 und Hus1), durchgeführt. Zum Schluss entfernt die *Flap endonuclease I* [FEN1] den überhängenden 5'dRP-Basenteil und die DNA-Ligase I [LIG1] stellt die Phosphodiesterbindung wieder her⁹⁵⁻⁹⁷.

Proteine wie *X-ray repair cross-complementing protein 1* [XRCC1] und die Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 [PARP1] besitzen ebenfalls wichtige Funktionen in der BER. XRCC1 interagiert mit vielen BER-Faktoren und aktiviert oder hemmt ihre enzymatische Aktivität. Die Bindung an POL β und LIG3 ist funktionell relevant⁹⁸. PARP1 wird über die Bindung an den SSB aktiviert und stimuliert die BER. Die Hauptfunktion besteht in der Erleichterung des Zuganges der BER-Enzyme zum DNA-Schaden⁹⁹ und der Rekrutierung von XRCC1 und POL β durch direkte Interaktionen¹⁰⁰.

1.2.3. Basenfehlpaarungsreparatur

Die Basenfehlpaarungsreparatur [MMR] ist ein konservierter Reparaturweg, der vorwiegend die Korrektur von Fehlpaarungen während und nach der Replikation bewerkstelligt. Bei diesem Reparaturmechanismus werden bis zu 1000 Basen des Tochterstranges mit der Fehlpaarung entfernt und die Neusynthese erfolgt anhand der Sequenz des Elternstranges. Die Beeinträchtigung dieses Reparaturweges steigert die Mutationsrate der Zelle um das 10 bis 100-fache. Die MMR repariert ebenfalls DNA-Läsionen die durch spontane oder induzierte Desaminierung, Oxidation und Methylierung entstehen^{101,102} (Abbildung 2).

Der exakte Mechanismus der MMR ist noch unklar, jedoch wird derzeit das „*molecular switch model*“ befürwortet¹⁰³. Die Fehlpaarungen in der DNA werden über den heterodimeren MutS α -Komplex detektiert, dies führt zur Rekrutierung des heterodimeren MutL-Komplexes. Für die Prozessierung der O⁶MeG-Läsion besteht der MutS α -Komplex aus den Proteinen *MutS homolog 2* [MSH2] und *MutS homolog 6* [MSH6] sowie der MutL-Komplex aus *MutL homolog 1* [MLH1] und *postmeiotic segregation increased 2* [PMS2]. Über einen ATP-getriebenen Konformationswechsel bildet sich eine Ringklemmen-Struktur, bestehend aus MutS α und MutL, die sich entlang der DNA bewegt. Die Diskriminierung der DNA-Stränge und somit der Abbau des Tochterstranges erfolgt im Folgestrang anhand der SSB zwischen den Okazaki-Fragmenten. Im Leitstrang ist das Signal noch unbekannt. Trifft der MutS α /MutL-Komplex auf einen SSB in der DNA-Sequenz, der die akzessorischen Proteine PCNA und Replikationsfaktor C [RFC] bindet, wird die Exonuklease I [EXO1] an die Struktur rekrutiert. Diese Nuklease besitzt eine 5' zu 3' Endonuklease-Aktivität und entfernt den Tochterstrang vor und hinter der Fehlpaarung. Ein 3' zu 5' Abbau hängt zusätzlich von den Proteinen PCNA und RCF ab. Diese Proteine aktivieren die Endonuklease-Aktivität von MLH1, das einen 5'-Einschnitt in die DNA durchführt. Die Aktivität von EXO1 wird letzten Endes vom MutL-Komplex beendet. Der Reparaturprozess wird über die Neusynthese und Ligation des DNA-Stranges durch die Proteine POL δ und LIG1 vervollständigt¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

1.2.4. Nukleotidexzisionsreparatur

Die Nukleotidexzisionsreparatur [NER] repariert große DNA-Läsionen, die eine Deformation der Helixstruktur verursachen. An diesem Prozess sind mehr als 30 Proteine beteiligt. Die NER wird in die *global genome repair* [GGR] - repariert den Schaden im ganzen Genom - und die *transcription coupled repair* [TCR] – repariert vorwiegend die kodierenden Stränge in aktiven Genen - unterteilt. Die NER besteht aus drei essentiellen Schritten: (1) Erkennung

der Läsion, (2) Einschneidung in die DNA und Heraustrennung des geschädigten Oligonukleotid und (3) der Neusynthese eines intakten DNA-Stranges (Abbildung 3).

Der initiale Schritt, die Erkennung des Schadens, findet in der TCR über eine Blockierung der RNA-Polymerase II [RNAP] am DNA-Schaden statt. Die Proteine *Cockayne syndrome A* und *B* [CSA und CSB] besitzen für die TCR bedeutende Funktionen, wobei ihre vollständige Beteiligung in diesem Prozess sowie deren Aktivierungssignale noch unbekannt sind. Vermutlich erleichtern diese Proteine die Entfernung der Läsion und sind bei der Wiederaufnahme der Transkription beteiligt. In der GGR wird die DNA-Läsion durch den heterodimeren Protein-Komplex *Xeroderma pigmentosum protein C* [XPC] und *RAD23 homolog B* [RAD23B] erkannt. Die nächsten Schritte der Reparatur erfordern für die GGR und TCR die Beteiligung identischer Proteine. Nach Erkennung des Schadens wird der Transkriptionsfaktor II H [TFIIH]-Komplex rekrutiert. Dieser Komplex besteht aus 10 Untereinheiten, einschließlich den beiden Helikasen *Xeroderma pigmentosum protein B* [XPB] und *Xeroderma pigmentosum protein D* [XPD]. Diese Helikasen bewirken eine Öffnung der DNA um den Schaden herum, dies dient als Rekrutierungssignal der Proteine *Xeroderma pigmentosum protein A* [XPA] und Replikationsprotein A [RPA]. XPA veranlasst die Dissoziation von Komponenten des TFIIH-Komplexes, dies erleichtert die Rekrutierung der Endonukleasen *Xeroderma pigmentosum protein F/Excision repair cross complementation group 1* [XPF-ERCC1] (3'-5') und *Xeroderma pigmentosum protein G* [XPG] (5'-3'), sowie die Freisetzung von XPC-RAD23B aus dem Proteinkomplex. Die Rekrutierung von XPF-ERCC1 wird durch Interaktion mit XPA erleichtert, wobei für XPG weitere Interaktionen mit dem TFIIH-Komplex bedeutend sind. Im Anschluss führen die Endonukleasen zur Einschneidung in die DNA und das Oligonukleotid mit der Läsion wird entfernt. Im letzten Schritt der NER bewerkstelligen die DNA-Polymerase κ [POL κ], POL δ oder POL ϵ , in Kooperation mit den Proteinen PCNA und RFC, die Neusynthese des DNA-Stranges. Die Ligation des Stranges wird durch einen Komplex aus XRCC1 und LIG3 oder FEN1 und LIG1 ausgeführt.

1.2.5. Doppelstrang-Reparatur

DNA-Doppelstrangbrüche [DSB] sind eine der schädlichsten Form von DNA-Schäden. Werden sie nicht korrekt repariert, so führen sie zu Mutationen, Deletionen, Translokationen oder Amplifikationen im Genom¹⁰⁷. DSB entstehen durch endogene Prozesse - reaktive Metaboliten, Fehler in der Replikation oder Reparatur, V(D)J Rekombination – oder werden durch exogene Quellen – Strahlung, Chemotherapeutika – erzeugt. Die Doppelstrangbruch-Reparatur [DSBR] wird in die homologe Rekombination [HR] und Nicht-Homologe-Endverknüpfung (*Non-homologous end joining* [NHEJ]) unterteilt. Die HR agiert vorwiegend

in der S- und G2-Phase von replizierenden Zellen und benötigt homologe Schwesterchromatiden zur Durchführung des Prozesses. Die NHEJ repariert den DSB unabhängig vom Zellzyklus, ist aber fehleranfällig.

1.2.5.1. Homologe Rekombination

Der komplexe Prozess der homologen Rekombination [HR] ist noch nicht komplett erforscht. Grundsätzlich besteht die Reparatur aus den folgenden Phasen: (1) Prozessierung der DNA zu 3'-Einzelsträngen, (2) Bildung der RAD51-Filamente, (3) Stranginvasion und Formierung von Holliday-Strukturen (*holliday junction*, [HJ]), (4) Auflösung der HJ (Abbildung 2 und 3).

Die HR wird über die Rekrutierung des MRN-Komplexes (*meiotic recombination 11 homolog 1* [MRE11], *RAD50 homolog* [RAD50], Nijmegen-Breakage-Syndrom [NBS]) an den DSB initiiert. Der MRN-Komplex dient als Schadenssensor und rekrutiert ATM zum DSB, woraufhin die Proteinkinase ihre pleiotropen Funktionen ausübt. Die Nukleaseaktivität von MRE11, in Kooperation mit den Nukleasen *CtBP-interacting protein* [CtIP] und EXO1 sowie weiteren Proteinen, führen zur 5'-3'-Entfernung des DNA-Stranges am DSB und somit zur Entstehung von langen 3'-Einzelsträngen. Das Protein RPA bindet an diese 3'-Einzelstrang-Überhänge. Diese Strukturbildung, aus ssDNA und RPA, verhindert die Bindung von *RAD51 homolog* [RAD51] an den Einzelstrang und rekrutiert den Protein-Komplex, bestehend aus den beiden Proteinen ATR und *ATR-interacting protein* [ATRIP]. Dieser Komplex stimuliert identisch zu ATM die Reparatur durch Interaktion mit diversen Proteinen. Die Bildung von RAD51-Filamenten ist ein wichtiger Schritt in der HR. In diesem Prozess besitzt das Protein *breast cancer 2* [BRCA2] bedeutende Funktionen; unter anderem vermittelt es den korrekten Austausch von RPA zu RAD51 an die 3'-Überhänge. Zusätzlich interagiert BRCA2 mit weiteren Proteinen, einschließlich *breast cancer 1* [BRCA1] und *partner and localizer of BRCA2* [PALB2], die für den korrekten Ablauf der HR unersetzbar sind. RAD51-Filamente ermöglichen den einzelsträngigen DNA-Überhängen die Suche nach Sequenzhomologie in den Schwesterchromatiden. Ist eine komplementäre Sequenz vorhanden, ersetzt der RAD51-Einzelstrang den DNA-Strang am Schwesterchromatid und eine D-Schleifen-Struktur wird innerhalb der DNA erzeugt. Aufgrund dieser Strukturbildung synthetisiert eine DNA-Polymerase den neuen Strang in 3'-5'-Richtung. Abhängig von den beteiligten Proteinen erfolgt die weitere Reparatur auf unterschiedliche Art und Weise. Beim Prozess *synthesis-dependent strand annealing* [SDSA] dissoziiert der synthetisierte DNA-Strang vom Leitstrang ab und bindet an die gegenüberliegende ssDNA vom DSB. Es findet keine Erzeugung von chromosomalen Rekombinationen statt. Alternativ entsteht beim Prozess der Doppelstrangbruch-Reparatur durch die Neusynthese des DNA-Stranges und der Migration der D-Schleife eine zweite HJ.

Abhängig vom Auflösungsprozess der HJ werden chromosomale Rekombinationen im Genom integriert. Die Auflösung der HJ über den Helikasen-Komplex *Bloom syndrome protein* [BLM] und DNA-Topoisomerase III [TOPO3] verhindert die Erzeugung von chromosomalen Rekombinationsprodukten. Die Alternative besteht in der Prozessierung über die Endonuklease *Flap endonuclease GEN homolog 1* [GEN1] und/oder die *structure-specific endonuclease subunit 1 and 4* [SLX1 und SLX4]. Abhängig vom Einschnitt in die HJ finden Integrationen von chromosomalen Rekombinationen im Genom statt oder werden verhindert¹⁰⁸⁻¹¹¹.

1.2.5.2. Nicht-Homologe-Endverknüpfung

Die Nicht-Homologe-Endverknüpfung [NHEJ] vereinigt die DSB ohne Rücksicht auf Sequenzhomologie. Dementsprechend führt diese Reparatur zum Verlust von Nukleotiden. Dieser Reparaturprozess tritt in jeder Phase des Zellzyklus auf und ist verantwortlich für die Reparatur von 85 % der induzierten DSB nach ionisierender Bestrahlung¹¹². Des Weiteren ist dieser Prozess bei der Prozessierung von endogenen DSB, die bei Entwicklung der B- und T-Zellen in der V(D)J-Rekombination auftreten, beteiligt. Immundefiziente (*severe combined immunodeficiency* [SCID]) Mäuse sind Träger von mutierten NHEJ-Proteinen^{113,114}. Die Reparatur der NHEJ findet in 3 Schritten statt: (1) Detektion des DSB und Stabilisierung der DNA-Enden, (2) Prozessieren und Entfernen der Überhänge, (3) Ligation des DNA-Stranges.

Ionisierende Strahlung führt zu DSB mit nicht-ligierbaren DNA-Enden. Diese DSB werden von den Kernproteinen *X-ray repair cross complementing protein 6* (*XRCC6*) [Ku70] und *X-ray repair cross complementing protein 5* (*XRCC5*) [Ku80] als Dimer erkannt und gebunden. Die Ku-Proteine translozieren entlang der DNA und führen somit zur Rekrutierung und Stimulation der Serin-Threonin Proteinkinase *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit* [DNA-PKcs]. Die DNA-PKcs an den gegenüberliegenden DNA-Strängen interagieren miteinander und formen einen synaptischen Komplex. Im Anschluss werden die Proteine Polynukleotid-Kinase/Phosphatase [PNKP], *XRCC4* (*X-ray repair cross complementing protein 4*)-like factor [XLF], Artemis, und der *XRCC4-DNA-Ligase IV*-Komplex rekrutiert. Die DNA-PKcs vollziehen eine Autophosphorylierung, die zum Konformationswechsel und der Dissoziation vom DSB führt. Die Prozessierung der DNA-Enden erfolgt über PNKP, Artemis sowie weiteren Proteinen und ist weitgehend vom produzierten Schaden abhängig. Zum Schluss ligiert der *XRCC4-DNA-Ligase IV*-Komplex die Enden zu einem durchgehenden DNA-Strang^{115,116}.

Backup-NHEJ ist ein weiterer Reparaturmechanismus für DSB. Dieser Prozess findet in Zellen statt, denen Proteine des klassischen NHEJ fehlen. Bei dieser Reparatur sind die Proteine PARP1, LIG3 und XRCC1 beteiligt ¹¹⁷.

1.2.6. *Interstrand-Crosslink-Reparatur*

Wichtige Erkenntnisse zur Reparatur der *Interstrand-Crosslinks* [ICL] wurden über Studien der *Fanconi anaemia* [FA] erhalten; eine genetische Krankheit die eine Sensitivität gegenüber ICL aufweist. Die Entfernung von ICL erfordert die Beteiligung verschiedener DNA-Reparaturmechanismen, wobei die Gene der FANC-Familie essentiell sind. Diese Proteine sind an der Koordination der Reparaturwege HR, NER und TLS beteiligt (Abbildung 3).

Die Reparatur von ICL in der G1-Phase findet nur ineffizient statt oder fehlt vollständig. Läsionen, die eine Deformation der Helixstruktur bewirken, werden teilweise von den Endonukleasen ERCC1 und XPF im Rahmen der NER und in Kooperationen mit TLS-Polymerasen entfernt. Die Hauptreparatur findet jedoch in der S-Phase des Zellzyklus statt. Die teilweise prozessierten Läsionen der G1-Phase sowie Vorgänge an der Replikationsgabel am ICL führen zur Entstehung von DSB - in der Form von *one-ended* DSB oder freien dsDNA-Enden, infolge einer *chicken foot*-Struktur. Diese Generation von DSB ist essentiell für die Beteiligung der HR. Das Protein FANCM erkennt den DNA-Schaden (den ICL) und verhindert den Zusammenbruch der Replikationsgabel durch deren Regression. Zusätzlich vermittelt dieses Protein einen *ATR-checkpoint kinase 1* [CHK1] vermittelten Zellzyklus-Arrest. Die Stabilisierung der Replikationsgabel wird über die Rekrutierung des FA-Kernkomplexes, bestehend aus wenigstens 7 FA-Proteinen, und durch weitere Proteine der HR bewirkt. Dieser stabilisierte Proteinkomplex erlaubt die Synthese des DNA-Leitstrangs, nachdem der ICL teilweise entfernt wurde. Vorerst werden bei der ICL-Reparatur Nukleasen und Polymerasen zum FA-Kernkomplex rekrutiert, dies wird über die Monoubiquitinierung der DNA-assoziierten Faktoren FANCD2 und FANCI sichergestellt. In der S-Phase agiert die Nuklease *FANCD2/FANCI-associated nuclease 1* [FAN1] zusammen mit dem heterodimeren Nukleasen-Komplex *Mus81 structure-specific endonuclease subunit* (SLX3) [MUS81] / *essential meiotic structure-specific endonuclease 1* [EME1] und vermittelt einen 5' und 3'-Einschnitt um den ICL. Nach dem *unhooking* der Läsion leiten TLS-Polymerasen (POL κ (alias REV1), DNA-Polymerase ν [POL ν], DNA-Polymerase ζ [POL ζ]) die Resynthese des DNA-Stranges ein. Die anschließende Entfernung des ICL vom gegenüberliegenden Strang, durch Beteiligung der NER oder aufgrund spontaner Hydrolyse, bewirkt eine Fortsetzung der HR-Reparatur zur korrekten Synthese des DNA-Stranges. In der späten S-Phase besteht die Möglichkeit, dass zwei

Replikationsgabeln an beiden Seiten des ICL blockiert werden. Die Reparatur des FA-Kernkomplexes führt in diesem Fall nach dem Prozess des *unhooking* zur Bildung einer doppelten HJ. Diese Struktur wird letzten Endes durch einen Komplex, der die Helikase BLM beinhaltet, oder über struktur-spezifische Nukleasen der HR wieder gelöst^{65,118,119}.

1.2.7. Transläsionssynthese

Die Transläsionssynthese [TLS] ist kein Reparaturmechanismus, sondern ein alternativer Weg zur Toleranz von DNA-Schäden. Einige DNA-Läsionen führen zur Blockierung der normalen DNA-Polymerasen an der Replikationsgabel. Der TLS-Signalweg erlaubt den Zellen eine alternative fehleranfällige Polymerase zu rekrutieren, um die Läsion zu überbrücken und die Synthese fortzusetzen. Das menschliche Genom besitzt wenigstens sieben TLS-Polymerasen, die keine Korrekturlesefunktion besitzen und an verschiedenen Reparaturwegen beteiligt sind. Die TLS-Polymerasen POL η , POL κ , POL ν und POL ζ sind an der Überbrückung der O⁶MeG-Läsion sowie an der ICL-Reparatur beteiligt und ihre Depletion besitzt einen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber S_N1-alkylierenden Agenzien^{18,120,121}.

1.3. DNA-Reparaturhemmstoffe als therapeutisches Mittel von Tumoren

Chemotherapeutika und ionisierende Strahlung schädigen die DNA oder beeinflussen fundamentale Prozesse der Zellen, wie die Replikation. Normale Zellen und Tumore reagieren auf diese Behandlungen mit dem Prozess der DDR. Diese komplexen Signalwege beeinflussen den Zellzyklus, verstärken die DNA-Reparatur und leiten gegebenenfalls den Zelltod ein. Einige Tumorzellen weisen größere Defizite in der DDR auf als normale Zellen¹²². Somit bietet die Beeinflussung der DDR in Tumorzellen eine Möglichkeit die Krebstherapie zu verbessern. Hemmstoffe der DDR agieren als Monotherapie und in Kombination mit DNA-schädigenden Chemotherapeutika. Die Verwendung von Hemmstoffen als Monotherapie nutzt einen Defekt der DDR in Krebszellen aus, um eine synthetische Letalität zu erreichen. Das Konzept der synthetischen Letalität beruht auf der Tatsache, dass zwei Mutationen in zwei separaten Genen letal sind, wohingegen jede Mutation alleine lebensfähig bleibt. In der Tumorthherapie führt die Behandlung von BRCA-mutierten¹²³ oder HR-defizienten¹²⁴ Tumorzellen mit einem PARP1-Inhibitor zur selektiven Schädigung des Tumorgewebes. In der Kombinationsbehandlung sensibilisieren die DDR-Hemmstoffe die Tumorzellen gegenüber bestimmten Chemotherapeutika, indem sie bestimmte Reparaturwege ausschalten. Unterschiede in der DDR und der Reaktion auf DNA-Schäden zwischen Tumoren und Normalgewebe ermöglichen einen positiven Effekt dieser Therapieform.

Es existieren eine Vielzahl von DDR-Hemmstoffen, die verschiedene DNA-Reparaturwege oder den Zellzyklus beeinflussen. Die wichtigsten Zielproteine dieser Hemmstoffe sind die Proteine der Zellzyklus-Kontrolle CHK1, *checkpoint kinase 2* [CHK2], ATM, ATR sowie Inhibitoren für die DNA-Reparaturproteine MGMT, PARP1, RAD51 und DNA-PKcs. Viele dieser Hemmstoffe befinden sich in klinischen Studien oder finden schon derzeit Verwendung in der Krebstherapie¹²⁵⁻¹²⁷.

1.3.1. Potenzierung der Chemotherapie mit MGMT-Hemmstoffen

Das MGMT-Protein repariert die O⁶-Alkylguanin-Läsionen der DNA und ist somit ein wichtiger Resistenzfaktor gegenüber methylierenden und chlorethylierenden Chemotherapeutika (siehe 1.1.2. und 1.1.3.). Aus diesem Grund wurde bereits ab 1980 experimentelle Versuche unternommen die MGMT-Aktivität zu senken, um so die Toxizität gegenüber alkylierenden Zytostatika zu steigern; u.a. durch Vorbehandlung mit O⁶-Methylguanin oder methylierenden Agenzien^{128,129}. Jedoch erst die Einführung von irreversiblen Inhibitoren verstärkte die therapeutische Effizienz von Zytostatika gegenüber MGMT-exprimierenden Tumorzellen. Seit 1990 wurden eine Vielzahl von Hemmstoffen entwickelt¹³⁰. Dennoch weisen nur die beiden Inhibitoren O⁶-Benzylguanin [O⁶BG] und das noch effektivere und oral verabreichbare O⁶-(4-Bromothienyl)-guanin [O⁶BTG] eine effiziente MGMT-Inhibition in Tumorzellen auf, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Die IC₅₀-Werte für O⁶BG und O⁶BTG betragen jeweils 180 nM und 3,4 nM¹³¹. Experimente mit humanen Tumor-Xenograft-Modellen zeigten für beide Substanzen eine komplette Hemmung der MGMT-Aktivität in Tumorgewebe, sowie eine Reduzierung des Tumorwachstums nach Kombinationsbehandlungen mit alkylierenden Agenzien. Kombinationsbehandlungen dieser MGMT-Hemmstoffe mit alkylierenden Chemotherapeutika wurden in Phase I und II Studien durchgeführt, die unter anderem Hirntumore, Melanome, Lymphome und weitere Tumorarten im fortgeschrittenen Stadium beinhalteten; sie führten allerdings trotz Hemmung des MGMT-Proteins im Tumor nicht zur Steigerung der therapeutischen Effizienz. Die Ursache liegt in der kompletten Hemmung von MGMT in allen Geweben, was zur Zunahme der systemischen Toxizität, insbesondere der Myelosuppression, führt. Daher war in den Studien eine drastische Reduktion der zu verabreichenden Dosis der Chemotherapeutika nötig, um die systemischen Nebenwirkungen zu reduzieren - auf ca. 1/5 der üblichen Zytostatika-Dosis. Unter diesen Bedingungen ist die therapeutische Effizienz einer Alkylantien-Therapie drastisch reduziert¹³²⁻¹³⁴.

Derzeit werden verschiedene Strategien verfolgt, um eine Verringerung der systemischen Toxizität bei Verwendung der üblichen Zytostatika-Dosis zu erreichen. Die lokale Verabreichung des MGMT-Hemmstoffes oder Chemotherapeutikums direkt in das

Tumorgewebe bietet eine Alternative. Die Verabreichung erfolgt mittels eines Trägers oder Ommaya-Reservoirs. Diese Behandlungsart ist jedoch nicht für metastasierende Tumore geeignet¹³⁵. Eine weitere Strategie bedient sich der Verwendung einer mutierten MGMT-Form (P140K). Diese MGMT-Variante weist eine hohe Resistenz gegenüber der Inhibition durch O⁶BG auf (der IC₅₀-Wert beträgt über 2 mM), ohne die Fähigkeit zur Reparatur der Alkylantien-induzierten DNA-Schäden zu verlieren¹³⁶. Der retrovirale Gentransfer der resistenten MGMT-Variante in hämatopoetische Stammzellen bietet einen wirksamen Schutz vor der Myelosuppression bei der Kombinationsbehandlung¹³⁷. Die Limitierungen einer Gentherapie sind jedoch in dem Risiko der Insertionsmutagenese durch die retroviralen Vektoren begründet.

Die selektive Inaktivierung des Reparaturproteins MGMT in Krebszellen – gezielte Pharmakotherapie – würde eine Reduzierung der Zytostatika-Dosis vermeiden und auf diese Weise zu einer Verbesserung der Chemotherapie beitragen. Einige Strategien verfolgen exakt diesen Ansatz. Folatrezeptoren weisen eine erhöhte Expression im Tumorgewebe auf. Eine selektive Aufnahme über diese Rezeptoren schützt das Normalgewebe und führt zu einer Anreicherung des Hemmstoffes im Tumor. Aus diesem Grund wurden Folat-Konjugate synthetisiert, die eine effektive MGMT-Hemmung aufweisen und Tumorzellen gegenüber alkylierenden Agenzien sensibilisieren¹³⁸. Tumore sind komplexe Strukturen, die veränderte Bedingungen und Eigenschaften im Vergleich zum Normalgewebe aufweisen. Die Ausnutzung dieser Gegebenheit, bei Verwendung bestimmter physiochemischer Eigenschaften des Hemmstoffes, ermöglicht ebenfalls eine selektive Akkumulierung im Tumorgewebe (*physical targeting*). Zu diesem Zweck wurde eine O⁶BG-Variante synthetisiert, die im physiologischen Milieu eine geringe Hemmung des MGMT besitzt. Unter den hypoxischen Bedingungen des Tumors wird dieser Hemmstoff zum effektiven Inhibitor O⁶BG reduziert und soll somit MGMT vorwiegend im Bereich des Tumors inhibieren¹³⁹.

1.4. Transporter als gezielte Pharmakotherapie in der Krebstherapie

Die Therapieformen Resektion und Bestrahlung sind auf einen bestimmten Bereich des Tumors beschränkt. Die Chemotherapie ist somit essentiell für die Behandlung von Metastasen, die Hauptursache des Todes bei Krebs. Antiproliferative Medikamente, die in der Krebstherapie verwendet werden, sind normalerweise nicht selektiv für den Tumor. Deshalb benötigen sie eine Verabreichung von hohen Dosen und verursachen somit eine hohe Toxizität im Normalgewebe¹⁴⁰. Die gezielte Pharmakotherapie (*drug targeting*) ermöglicht eine selektive Anreicherung des Arzneistoffes im Tumorgewebe; dies reduziert die auftretenden Nebenwirkungen und bewirkt eine Steigerung des therapeutischen Index. Eine Akkumulation

des Arzneistoffes wird aufgrund spezifischer Charakteristika des Zielgewebes erreicht. Diese beinhalten eine spezielle Bedingung des Gewebes (z.B. Hypoxie), dem Vorhandensein bestimmter Zelltypen oder der erhöhten Expression von Komponenten (Antigenen) ¹⁴¹. Neben der direkten Applikation des Arzneistoffes in das Zielgewebe (Ommaya-Reservoir), die ebenfalls als Strategie des *drug targeting* angesehen wird, bietet das Konzept des aktiven und passiven Targeting die Möglichkeit der selektiven Anreicherung im Zielgewebe. Beim passiven Targeting wird das Medikament in oder an einen Carrier gebunden; dies ist ein großes Molekül oder ein Nanopartikel. Die löchrigen Blutgefäße des Tumors ermöglichen eine selektive Anreicherung des Carriers aufgrund der erhöhten Permeabilität und Retention [EPR-Effekt] im Tumorgewebe ¹⁴². Beim aktiven Targeting wird der Arzneistoff an einen Antikörper oder Liganden gekoppelt. Die Anreicherung im Tumorgewebe entsteht aufgrund der erhöhten Expression von bestimmten Antigenen (Rezeptoren, Transporter) auf der Zelloberfläche der Krebszellen. Monoklonale Antikörper wurden aufgrund ihrer hohen Affinität für die Antigene schon früh als aktive Targeting-Strategie verwendet. In der Krebstherapie finden sie Anwendung als Single-Agens, als Antikörper-Enzym-Konjugat oder Antikörper-Arzneistoff-Konjugat ^{143,144}.

Eine zweite Klasse von Antigen die zur gezielten Pharmakotherapie verwendet wird, sind Transporter. Im menschlichen Genom kodieren ca. 4 % der Gene für Transporterproteine ¹⁴⁵. Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Aufnahme von Nährstoffen und dem Efflux von xenobiotischen Toxinen. Transporterproteine werden in zwei Hauptfamilien eingeteilt: die *solute carrier* [SLC] und *ATP-binding cassette* [ABC] Transporter. Die SLC-Familie beinhaltet Transporterproteine, die Substanzen entlang (*facilitated transporter*) oder entgegen (*secondary active transporter*) ihrem Konzentrationsgradienten transportieren. Die *secondary active* Transporter nutzen den Austausch (antiport) oder Kotransport (symport) von intrazellulären und/oder extrazellulären Ionen als Energiequelle zur Beförderung der Substanzen. Die ABC-Transporter verwenden die Hydrolyse von ATP zum Transport von Molekülen entgegen ihrem Konzentrationsgradienten ¹⁴⁶. Diese Transportproteine werden gewebespezifisch exprimiert und besitzen zusammen mit den *drug-metabolizing enzymes* – beinhalten Enzyme des Cytochrom P450-Systems – wichtige Funktionen in der Adsorption, Verteilung und Exkretion von Arzneistoffen ¹⁴⁷.

Viele Transporter weisen eine erhöhte Expression in Krebszelllinien und Tumorgeweben auf, u.a. Nukleosidtransporter, Peptidtransporter, Aminosäuretransporter, Transporter für organische Anionen und Kationen sowie Glukosetransporter ¹⁴⁸. Der Expressionsunterschied zwischen Normal- und Tumorgewebe erlaubt ein gezieltes Wirkstoffdesign - Konjugation von Nährstoffen an Arzneimitteln – um ein aktives Targeting über Transporter zu erreichen.

1.4.1. Glukosetransporter

Zucker, insbesondere Glukose und Fruktose, sind die hauptsächlichen Energiequellen für Zellen. Diese hydrophilen Substanzen benötigen für die Aufnahme ins Zellinnere die Beteiligung von speziellen Transportproteinen. Es existieren zwei Typen von Glukosetransportern: (1) Die Familie der Natrium-abhängigen Glukosetransporter (*sodium dependent glucose transporter* [SGLT]) beinhaltet sechs verschiedene Transporterproteine (SGLT1-6), deren Sekundärstruktur aus 14 transmembranen Helices besteht. SGLT1 und SGLT2 befördern Glukose und Galaktose entgegen ihres Konzentrationsgradienten in die Zelle. Dafür wird die Energie eines Natriumgradienten verwendet, der über die Natrium-Kalium-Pumpe generiert wird. Diese Proteine sind hauptsächlich für die Aufnahme von Zuckern in den Darm- und Nierenepithelien verantwortlich. (2) Die Glukosetransporter der Familie *facilitative glucose transporter* (GLUT) befördern verschiedene Zuckerarten entlang ihres Konzentrationsgradienten in die Zelle, ohne dass eine Energiequelle erforderlich ist. Es existieren 14 GLUT, die abhängig von ihrer Struktur und Sequenz in 3 Klassen gruppiert werden. Die GLUT werden gewebespezifisch exprimiert und weisen für die jeweiligen Zuckerarten unterschiedliche Affinitäten auf ^{149,150}.

Tumorzellen weisen häufig eine erhöhte glykolytische Aktivität auf (Warburg-Effekt) ¹⁵¹; dies wird als ein Hauptmerkmal von Krebs angesehen ³. Glykolytische Enzyme und Glukosetransporter sind in einer Vielzahl von menschlichen Tumoren überexprimiert ^{152,153}. Des Weiteren korreliert eine erhöhte Expression von GLUT1 mit einer schlechten Prognose in einigen Tumorarten ^{154,155}. Diese Abhängigkeit des Tumorgewebes – hohe Zuckeraufnahme und gesteigerte glykolytische Aktivität zur ATP-Generierung – ermöglicht der gezielten Pharmakotherapie eine aktive Targeting-Strategie zu entwickeln. Diese beinhaltet zu einem die pharmakologische Inhibition des Zuckertransportes und/oder der Funktion glykolytischer Enzyme. Diese Therapieform bewirkt eine präferentielle Schädigung von Krebszellen ^{156,157}. Ein weiterer Ansatz besteht in der Konjugation von Zuckern (vorwiegend Glukose) an einen Arzneistoff. Dies ermöglicht eine selektive Anreicherung des konjugierten Moleküls im Tumorgewebe, wobei das parentale Molekül keine Selektivität aufweist. Das Prinzip der Synthese von Zucker-konjugierten Krebsmedikamenten wird schon seit 1995 verfolgt. Einige Konjugate (Glufosfamid, Streptozotocin) finden bei der Behandlung von bestimmten Tumortypen Anwendung. Das Insulinom, das aus den β -Zellen der Bauchspeicheldrüse entsteht, wird mit dem methylierenden Agens Streptozotocin behandelt. Streptozotocin ist ein Glukose-Konjugat des Nitrosoharnstoffs, welches vermehrt über den Glukosetransporter GLUT2 aufgenommen wird, der in den β -Zellen der Pankreas überexprimiert wird ¹⁵⁸. Des Weiteren wird die gesteigerte Glukoseaufnahme erfolgreich in der Diagnose - insbesondere bei Hirntumoren und Metastasen - ausgenutzt. Das radioaktive Glukoseanalogon 18-Fluor-Desoxyglukose (FDG) wird über einige GLUT in die Zelle aufgenommen, phosphoryliert und

in der Zelle zurückgehalten (*metabolic trapping*). Es wird per Positronen-Emissions-Tomographie (PET) detektiert und dient zur Bildgebung von Tumorgeweben ¹⁵⁹.

1.4.2. *ATP-binding cassette* Transporter

Die ABC-Transporter-Familie beinhaltet 49 Gene, die auf der Basis ihrer Sequenzhomologie und Domänenorganisation in 7 Unterfamilien unterteilt werden (ABCA-ABCG) ¹⁶⁰. ABC-Transporter werden in menschlichen Zellen in der Plasma- und den Organellenmembranen exprimiert und fungieren als Exporter von endogenen und exogenen Molekülen, u.a. Lipide, Gallensäure, Xenobiotika oder Peptiden ¹⁶¹. Diese Proteine verwenden die Energie aus der ATP-Hydrolyse, um Substanzen entgegen ihrem Konzentrationsgradienten (unidirektional) über Membranen zu transportieren. Der Transport besteht aus zwei Zyklen, die miteinander verbunden sind: (1) Der katalytische Zyklus der ATP-Hydrolyse, der den Transport antreibt. (2) Der Substrat-Transport-Zyklus, welcher der Beförderung des Moleküls über die Membran dient ¹⁶². ABC-Transporter sind in vielen zellulären Prozessen beteiligt, wobei eine wichtige Funktion der Schutz des Organismus vor schädlichen Molekülen ist. Ihre gewebespezifische Expression, zelluläre Lokalisation (apikal oder basal) sowie die Substratspezifität der einzelnen ABC-Transporter beeinflusst die Toxizität von Organen und Geweben gegenüber Toxinen. Die Expression in der Blut-Hirn-Schranke, Blut-Liquor-Schranke und der Placenta verhindert eine Adsorption von schädlichen Komponenten in den sensitiven Organen wie dem zentralen Nervensystem oder dem Fötus. ABC-Transporter in der Leber, Niere und dem Gastrointestinaltrakt schützen den Organismus, indem sie die Toxine aus dem Organismus entfernen (Exkretion) oder die direkte Adsorption aus dem Lumen verhindern.

Zusätzlich sind ABC-Transporter an der Adsorption, Verteilung und Exkretion von Medikamenten beteiligt ¹⁶³. Daher nehmen sie Einfluss auf die Wirksamkeit von therapeutischen Substanzen, indem sie die effektive Dosis im Zielorgan kontrollieren. Die Expression dieser Transporter im Zielorgan wird mit einer Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Arzneimitteln (HIV-Mittel, Antivirale-Mittel, Immunsuppressiva, usw.) assoziiert. In der Krebstherapie sind diese Transporterproteine von großer Bedeutung. ABC-Transporter werden in vielen Tumorarten exprimiert und bewerkstelligen den aktiven Efflux von Krebsmedikamenten ¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. Ihre Redundanz in den Tumorgeweben stellt einen wichtigen zellulären Faktor der Resistenz gegenüber einer Vielzahl von unterschiedlichen wirksamen Chemotherapeutika dar; ein Phänomen das als *multidrug resistance* (MDR) bekannt ist ¹⁶⁷. Bisher wurden 15 ABC-Transporter mit einer Resistenzentwicklung gegen Chemotherapeutika in Zusammenhang gebracht. Drei der ABC-Transporterproteine weisen den größten Effekt auf die MDR auf und wurden in vielen Studien genauer untersucht ¹⁶⁸.

Das ABCB1 Protein (*multidrug resistance protein 1*, [MDR1]) (alias P-Glykoprotein [P-gp]) besteht aus 12 hydrophoben Transmembranendomänen (α -Helices) und 2 hydrophilen Nukleotid-Bindungsdomänen [NBD]. Dieser Proteinaufbau ist als ABC-Transporter-Kernstruktur bekannt. Das P-gp ist an der apikalen Seite der Plasmamembran lokalisiert und exportiert eine Reihe amphipathischer und hydrophober Arzneimittel. Das bevorzugte und akzeptierte Modell dieses Transporters für hydrophobe Moleküle ist das „*vacuum cleaner model*“¹⁶⁹.

Das ABCC1 Protein (*multi resistance protein 1*, [MRP1]) besitzt zusätzlich zu den beiden Transmembranendomänen und den NBD eine N-terminale membrangebundene Region, die über einen zytoplasmatischen Linker mit der Kernstruktur verbunden ist. Im Gegensatz zum P-gp wird MRP1 auf der basolateralen Seite der Zellen exprimiert und ermöglicht den Efflux von Glutathion [GSH], GSH-Konjugaten und hydrophilen Phase II-metabolisierten Produkten.

Das ABCG2 Protein (*breast cancer resistance protein* [BCRP]) exportiert identisch zu MDR1 eine Vielzahl von hydrophoben Substanzen, Konjugaten und geladenen Molekülen. Dieses Protein ist ein Halbtransporter, bestehend aus 6 transmembranen Segmenten und einer NBD. In der Plasmamembran bildet der Transporter ein Homodimer und ist vorwiegend an der apikalen Seite lokalisiert¹⁶¹.

Die MDR, aufgrund der Expression der ABC-Transporter, vermindert den therapeutischen Erfolg einer Krebstherapie mit Chemotherapeutika. Ein Ansatz zur Überwindung dieser Resistenz ist die simultane Applikation von Hemmstoffen für die ABC-Transporter. Diese Strategie wird seit mehreren Jahren verfolgt und die ersten prä-klinischen Experimente waren auch erfolgreich: die Inhibition der Efflux-Transporter war in der Lage Tumorzellen wieder gegenüber Chemotherapeutika zu sensibilisieren. Jedoch war die Entwicklung von spezifischen, nicht toxischen und effektiven Hemmstoffen für den Einsatz in klinischen Studien schwieriger als erwartet; die meisten klinischen Studien zeigten keinen zusätzlichen Vorteil durch die Modulation der ABC-Transporter. Einer der Hauptgründe liegt wohl in der veränderten Pharmokinetik der Chemotherapeutika; die Verringerung des systemischen Abbaus führt zu einer Steigerung der Toxizität im normalen Gewebe. Weitere Ursachen für den geringen Erfolg der Inhibitoren sind in der funktionellen Redundanz zwischen ABC-Transporterfamilien und der Expression mehrerer Efflux-Transporter in den Tumoren begründet. Die Limitierung in den klinischen Studien wird aber teilweise auch auf das falsche Design der Studien zurückgeführt¹⁷⁰. Zusätzlich zur Verwendung von Hemmstoffen existieren weitere Strategien, um den Einfluss von ABC-Transportern auf die MDR zu minimieren bzw. sie therapeutisch auszunutzen¹⁶⁷.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Das DNA-Reparaturprotein O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) ist ein wichtiger Resistenzfaktor gegenüber Zytostatika in der Tumorthherapie. Die Verwendung von klassischen MGMT-Hemmstoffen führte bislang zu keiner Steigerung der therapeutischen Effizienz, aufgrund der fehlenden Selektivität zum Tumor und der damit verbundenen Reduktion in der Zytostatika-Dosis. In dieser Arbeit soll die Glukosekonjugation von MGMT-Hemmstoffen als Targeting-Strategie untersucht werden. Ausgangspunkt ist die Hypothese, dass eine selektive Hemmung von MGMT in Tumorzellen bzw. Tumoren (aufgrund der Überexpression von Glukosetransportern) erreicht wird, was eine Reduzierung der therapeutischen Konzentration alkylierender Agenzien vermeidet. In vorherigen Arbeiten wurden verschiedene Glukose-konjugierte MGMT-Hemmstoffe synthetisiert, die nicht toxisch auf Zellen wirken und effektiv das MGMT-Protein inhibieren. Zwei von diesen Glukose-konjugierten MGMT-Hemmstoffe, O⁶BG-Glu und O⁶BTG-Glu, werden in dieser Arbeit hinsichtlich der Verwendung als Targeting-Strategie untersucht.

Zielsetzung der Arbeit ist die Untersuchung folgender Fragestellungen:

- Werden verschiedene Tumorzelllinien durch die Glukose-Konjugate im gleichen AusmaÙe gegenüber den Zytostatika TMZ und CCNU sensibilisiert?
- Wirken die Glukose-Konjugate im Xenograft-Mausmodell und sind sie effektiver in der Reduktion des Tumorwachstums als die nicht-konjugierten Inhibitoren O⁶BG und O⁶BTG? Ist eine Reduktion der Zytostatika-Dosis erforderlich?
- Wie werden die Glukose-Konjugate in die Zellen aufgenommen? Sind die Glukosetransporter GLUT und SGLT in die Aufnahme involviert? Existiert eine tumorspezifische Aufnahme der Konjugate?

Im Laufe dieser Arbeit wurde ein neuer Faktor identifiziert, der einen wichtigen Einfluss auf die Effektivität der Glukose-Konjugate hinsichtlich der Sensibilisierung gegenüber Zytostatika ausübt: die ABC-Transporter. Diese Klasse der Transporterproteine ist schon lange als Ursache der *multidrug resistance* (MDR) in der Tumortherapie bekannt, da sie aktiv eine Vielzahl von Chemotherapeutika aus der Zelle heraustransportiert. ABC-Transporter sind bisher nicht mit MGMT-Hemmstoffen in Zusammenhang gebracht worden.

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die folgenden Fragen untersucht:

- Welchen Einfluss besitzen ABC-Transporter auf die Effektivität der Glukose-Konjugate und den Inhibitoren O⁶BG und O⁶BTG? Fungieren diese MGMT-Hemmstoffe als Substrate für einen oder mehrere ABC-Transporter?
- Ist durch die simultane Verwendung von Inhibitoren für ABC-Transporter eine Steigerung der Effektivität von MGMT-Hemmstoffen zu erwarten (*in vitro* und *in vivo*)?

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Chemikalien, die in dieser Arbeit routinemäßig Anwendung fanden, wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) und Kodak (Rochester, NY, USA) bezogen.

Verbrauchsmaterialien, die in dieser Arbeit routinemäßig Anwendung fanden, wurden von den Firmen Greiner Bio-One (Frickenhäuser, Deutschland), GE Healthcare (München, Deutschland), B.Braun (Melsungen, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland) und Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

2.1.1. Geräte und Software

2.1.1.1. Geräte

Beschreibung	Handelsname	Quelle
Analysewaagen	TE 64-OCE	Sartorius, Göttingen, Deutschland
	XP105 DR Delta Range	Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland
Brutschrank	Heracell 150	Heraeus, Hanau, Deutschland
Dispergiergerät	Ultra Thorrax T8	IKA, Staufen, Deutschland
Durchflusszytometer	FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
	FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Einfrierbox	Cryo 1°C "Mr. Frosty"	Nalgene, Rochester, NY, USA
Elektrophorese Netzteil	Power Pac 200/300	Bio-Rad, München, Deutschland
Elektrophorese Transferkammer	Mini Protean II	Bio-Rad, München, Deutschland

Entwicklungskassette		Appligene, Heidelberg, Deutschland
Flüssigszintillationszähler	Tri-Carb 2100TR	Canberra Packard, Dreieich, Deutschland
Gefrierschrank	Forma 900	Thermo FisherScientific, Waltham, Massachusetts, USA
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	TM 130-6	HLC, Bovenden, Deutschland
<i>High Particle Performance Sizer</i> [HPPS]	Zetasizer Nano S	Malvern Instruments GmbH, Herrenberg, Deutschland
Horizontale Gelkammer	Mini-Protean Tetra System	Bio-Rad, München, Deutschland
Inverses Mikroskop	Axiovert 40C	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Kipproller	Roller Mixer SRT9	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kühlschrank	Premium No Frost	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Multipipette	Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten	Pipet-Lite XLS (L-10XLS, L-20XLS, L-200XLS, L-1000XLS)	Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland
pH-Messgerät	pH525	WTW, Weilheim, Deutschland
Photometer	Multiscan EX	Thermo FisherScientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	IBS, Fernwald, Deutschland
Sterilbank	Hera Safe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Ultraschallgerät	Sonifier Cell Disruptor B15	Branson Ultraschall, Dietzenbach, Deutschland
Ultraschallreiniger	Sonorex Super RK 103H	Bandelin, Berlin, Deutschland
Vakuumpumpe	N816.1.2 KN18	KNF, Freiburg, Deutschland
		Köttermann, Hänigsen,

Wasserbad	3044	Deutschland
	JB1	Grant, Cambridgeshire, Großbritannien
Zählkammer	Neubauer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zellschaber		Deutsch & Neumann, Berlin, Deutschland
Zelltank (N2)	Locator 6 plus	Thermo FisherScientific, Waltham, Massachusetts, USA
Zentrifugen	Centrifuge 5424R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo FisherScientific, Waltham, Massachusetts, USA

2.1.1.2. Software

Handelsüblicher Softwarename	Quelle
Ascent Software Version 2.6	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
BD FACSDiva Version 6	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CellQuest Pro	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
EndNote Version X6	Thomson Reuters, New York City, NY, USA
GraphPad Prism Version 6	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
MS Office Version 2007	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
Odyssey Version 3.0	LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland
WinMDI Version 2.9	Joeph Trotter; Scripps Research Institut, La Jolla, CA, USA

2.2. Zelllinien und Zellkultur

2.2.1. Zelllinien

Name	Beschreibung	Nährmedien
T98G ¹	Humane Glioblastomzelllinie	DMEM
GBP61 ²	Humane Glioblastomzelllinie	DMEM
D05 ^{3,4}	Humane maligne Melanomzelllinie	RPMI-1640
A375 ¹	Humane maligne Melanomzelllinie	DMEM
HT29 ⁵	Humane Kolon-Adenokarzinomzelllinie	RPMI-1640
Caco-2 ⁵	Humane Kolon-Adenokarzinomzelllinie	DMEM
VH10-tert ⁶	Humane Vorhaut-Fibroblastenzelllinie, immortalisiert durch stabile Transfektion mit Telomerase-Gen (TERT)	DMEM
NIH-3T3 ¹	Maus-Fibroblastenzelllinie	DMEM

¹ Zellen wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen

² Zellen wurden von Prof. Hopf (Institut für Neurochirurgie, Mainz) zur Verfügung gestellt

³ Zellen wurden von Prof. T. Wölfel (Institut für Hämatologie/Onkologie; Mainz) zur Verfügung gestellt

⁴ Zellen wurden von Prof. C.W. Schmidt (*Institute of Medical Research*, Australien) zur Verfügung gestellt

⁵ Zellen wurden von der Firma „Cell Lines Service“ in Heidelberg bezogen

⁶ Zellen wurden von Prof. Mullenders (Institut für Toxikogenetik, Leiden) zur Verfügung gestellt

2.2.2. Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der Zellen, mit Ausnahme der Zelllinie Caco-2, fand unter wassergesättigter atmosphärischen Bedingungen mit 7 % CO₂ bei 37°C statt. Die humane Kolon-Adenokarzinomzelllinie Caco-2 wurde in einem speziellen Brutschrank unter reduzierten Sauerstoffbedingungen (5 % O₂, 7 % CO₂, 37°C) kultiviert. Die verwendeten Nährmedien (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) sind in 2.2.1. aufgelistet. Allen Medien wurde 10 %

Fetales Kälberserum (*fetal calf serum*, [FCS]) (PAA, Pasching, Österreich) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) zugesetzt. Bevor die Zellen ein konfluentes Stadium erreichten, wurden sie mindestens zweimal in der Woche zu angemessenen Verdünnungen passagiert. Die adhärennten Zellen wurden mit 0,5 mg/ml Trypsin – 0,22 mg/ml Ethylendiamintetraacetat [EDTA] in phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, [PBS]) (137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 12 mM Gesamt-Phosphat ($\text{HPO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{PO}_4^-$)) (PAA, Pasching, Österreich) abgelöst und in frischem Medium aufgenommen.

Zur dauerhaften Lagerung der Zellen wurden exponentiell wachsende Zellen verwendet. Die Zellen wurden geerntet und anschließend bei 4°C und 1000 Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*) [rpm] für 5 Minuten pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Einfriermedium (Kultivierungsmedium + 10 % Dimethylsulfoxid [DMSO]) aufgenommen, in Kryoröhrchen aliquotiert und über Nacht in einer speziellen Einfrierkammer bei -80°C eingefroren. Nach 24 Stunden erfolgte die Überführung in flüssigen Stickstoff.

Die Zellen der Stockkultur wurden zur Kultivierung bei 37°C aufgetaut, mit PBS gewaschen und anschließend in frischem Medium aufgenommen. Bevor die Zellen in die Experimente eingesetzt wurden, fand eine einwöchige Kultivierungsphase statt. Alle Zelllinien wurden routinemäßig nach Mykoplasmen (Venor®GeM *Classic Mycoplasma PCR Detection Kit*, Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland) getestet und nur kontaminationsfreie Zellen wurden für die Experimente verwendet.

Für die Experimente, wenn nicht anders beschrieben, wurde die Zelldichte der jeweiligen Zelllinie mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen 48 Stunden vor der Behandlung ausgesät. Die Zellzahl wurde so ausgewählt, dass die Zellen am Ende des Experiments kein konfluentes Stadium erreicht haben.

2.3. Zytostatika, Hemmstoffe und Behandlung von Zellen

2.3.1. MGMT-Hemmstoffe

O⁶-Benzylguanin [O⁶BG]: Zur Herstellung einer 10 mM Stocklösung wurde O⁶BG (Sigma, München, Deutschland) in DMSO gelöst und die Aliquots bei -20°C gelagert.

O⁶-(4-Bromophenyl)-guanin [O⁶BTG]: Der MGMT-Hemmstoff O⁶BTG wurde von Dr. Geoff Margison (*Paterson Institute for Cancer Research*, Großbritannien) zur Verfügung gestellt. Aliquots mit einer Konzentration von 5 mM wurden in DMSO gelöst und bei -20°C gelagert.

2-amino-6-(benzyloxy)-9-(octyl-β-D-glycosyl)-purine [O⁶BG-Glu]: Das Zuckerkonjugat, auf Basis von O⁶BG, wurde von Prof. Schirmacher (*Montreal Neurological Hospital and Institute*, Montreal, Kanada) synthetisiert. Stocklösungen von 25 mM wurden in DMSO hergestellt und bei -20°C gelagert.

2-amino-6-(4-bromotiophen-2-yl-methoxy)-9-(octyl-β-D-glycosyl)-purine [O⁶BTG-Glu]: Das Zuckerkonjugat, auf Basis von O⁶BTG, wurde von der Firma "Haoyuan Chemexpress Co., Limited" (Shanghai, China) bezogen. 5 mM Stocklösungen wurden in DMSO hergestellt und bei -20°C gelagert.

Die Behandlung der Zellen erfolgte durch Zugabe der jeweiligen Stammlösung ins Zellkulturmedium, wobei der DMSO-Anteil maximal 0,25 % betrug. Zur Hemmung des MGMT-Proteins wurde mit allen Inhibitoren eine vierstündige Vorbehandlung durchgeführt.

2.3.2. Zytostatika

Temozolomid [TMZ]: Zur Herstellung einer 35 mM Stocklösung wurde TMZ (Schering-Plough, Kenilworth, NJ, USA) in DMSO und sterilem Wasser (1:3) gelöst. Die Aliquots wurden bei -80°C gelagert.

N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine [MNNG]: MNNG (Sigma, München, Deutschland) wurde in DMSO gelöst und anschließend mit sterilem Wasser auf eine Stocklösung von 10 mM verdünnt (1:100 Verdünnung). Die Aliquots wurden bei -80°C gelagert.

Lomustine [CCNU]: Eine 10 mM Stocklösung von CCNU (Sigma, München, Deutschland) wurde durch Lösen in Ethanol hergestellt und bei -20°C gelagert.

Die Behandlung der Zellen erfolgte nach Inhibition des MGMT-Proteins durch Zugabe der jeweiligen Stammlösung ins Zellkulturmedium.

2.3.3. Hemmstoffe für Transporter

Sergliflozin A [Sergli A]: Der SGLT-Inhibitor Sergliflozin A (Kissei Pharmaceutical, Japan) wurde in DMSO gelöst und die 100 mM Stammlösungen bei -20°C gelagert.

Phlorizin: Zur Herstellung einer 500 mM Stocklösung wurde der SGLT-Inhibitor Phlorizin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in DMSO gelöst und die Aliquots bei -20°C gelagert.

Phloretin: Eine 500 mM Stocklösung des GLUT-Inhibitors Phloretin (Sigma, München, Deutschland) wurde durch Lösen in DMSO hergestellt und bei -20°C gelagert.

Cytochalasin B [Cyt B]: Der GLUT-Inhibitor Cytochalasin B (Sigma, München, Deutschland) wurde in DMSO auf eine Stocklösung von 10 mM eingestellt. Die Aliquots wurden bei -20°C gelagert.

Verapamil: Zur Herstellung einer 10 mM Stocklösung wurde der P-gp-Inhibitor Verapamil (Sigma, München, Deutschland) in DMSO gelöst. Die Aliquots wurden bei -20°C gelagert.

MK571: Der MRP1-Inhibitor MK571 (Sigma, München, Deutschland) wurde in DMSO gelöst und die 10 mM Stammlösungen bei -20°C gelagert.

Ko143: Eine 5 mM Stocklösung des BCRP-Inhibitors Ko143 (Sigma, München, Deutschland) wurde durch Lösen in DMSO hergestellt und bei -20°C gelagert.

Die Behandlung der Zellen erfolgte durch Zugabe der jeweiligen Stammlösung ins Zellkulturmedium, wobei der DMSO-Anteil maximal 0,1 % pro Transporterinhibitor betrug. Zur Hemmung der Transporter fand eine 15 bis 30-minütige Vorbehandlung mit den jeweiligen Hemmstoffen statt, bevor die Zugabe der MGMT-Inhibitoren und Zytostatika erfolgte.

2.4. Zellextrakte und Proteinbestimmung

2.4.1. Herstellung von Gesamtzellextrakten

2.4.1.1. Sonifizierung

Am Ende der Inkubationszeit wurden die adhärennten Zellen mehrfach mit eiskalten PBS gewaschen und mit einem Zellschaber geerntet. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (4.000 rpm, 4 Minuten, 4°C) pelletiert und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Zellpellets fand bei -80°C statt. Die eingefrorenen Pellets wurden auf Eis aufgetaut und in einem Sonifizierungspuffer (20 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan [Tris] - HCl, 1 mM EDTA, 1 mM β -Mercaptoethanol, 5 % Glycerin, 100 μ M Phenylmethylsulfonylfluorid [PMSF], pH = 8,5) aufgenommen und unter angemessenen Bedingungen auf Eis sonifiziert (1 x 11 Impulse bei Ausgangsregler: 4 und Auslastungsgrad: 40 %). Die Suspension wurde

zentrifugiert (14.000 rpm, 10 Minuten, 4°C) und die unlöslichen Zellfragmente entfernt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Bradford-Methode (2.4.2.). Die Proben wurden für den darauffolgenden MGMT-Assay (2.7.) vorbereitet oder bei -20°C gelagert.

2.4.1.2. SDS-PAGE-Probenpuffer

Am Ende der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und die adhären Zellen mit PBS gewaschen. Der 95°C warme Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, [SDS-PAGE])-Probenpuffer (62,5 mM Tris-HCl, 10 % Glycerin, 2 % SDS, 5 % β -Mercaptoethanol, 0,01 % Bromphenolblau, pH = 6,8) wurde zur Lyse direkt auf die Zelle gegeben. Die Suspension wurde aliquotiert, sonifiziert und anschließend bei -20°C gelagert.

2.4.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Herstellung der Zellextrakte durch Sonifizierung (2.4.1.1.) erfolgte nach der Bradford-Methode¹⁷¹. Die Proteinextrakte (1-3 μ l) wurden auf eine 96-Well Mikrotiterplatte aufgetragen und mit 200 μ l Bradford-Reagenz (8,5 % Phosphorsäure, 4,75 % Ethanol, 1 % Coomassie-Brilliant-Blau G250) gemischt. Die Inkubation fand für 10-20 Minuten bei Raumtemperatur [RT] im Dunkeln statt. Die Adsorption der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch bestimmt und ihre Proteinkonzentration anhand der Standardgerade kalkuliert. Die Standardgerade wurde für jedes Experiment mittels *bovine serum albumin* [BSA] (0 bis 6 μ g/ μ l) erstellt.

2.5. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese [SDS-PAGE], basierend auf der Methode von Laemmli et al., (1970)¹⁷².

Die Proben wurden mit destilliertem Wasser und 4-fach SDS-PAGE-Ladepuffer (250 mM Tris-HCl, 40 % Glycerin, 8 % SDS, 20 % β -Mercaptoethanol, 0,04 % Bromphenolblau, pH = 6,8) aufgenommen, um ein angemessenes Volumen der Proben in einfach SDS-PAGE-Laufpuffer zu erhalten. Die Proteinextrakte wurden bei 95°C für 5 Minuten oder 37°C für 30 Minuten (für die Detektion der ABC-Transporter) erhitzt. Insgesamt wurden 30 μ g (nach Bradford-Bestimmung) oder 15-20 μ l pro Probe in das Sammelgel aufgetragen. Im letzteren Fall erfolgte eine Quantifizierung der Proteinmenge

mittels Detektion der Ladekontrollen (*extracellular signal-regulated kinase 2* [ERK2] oder *heat shock protein 90* [HSP90]) und anschließender Verdünnung der Extrakte relativ zur Bandenintensität der Probe. Die Proteinextrakte wurden für 15 Minuten bei 80 V im Sammelgel (5 % Polyacrylamid, 125 mM Tris-HCl, 0,1 % SDS, 0,05 % Ammoniumpersulfat [APS], 0,005 % Tetramethylethyldiamin [TEMED], pH = 6,8) konzentriert und bei 130 V im Trenngel (5-15 % Polyacrylamid, 375 mM Tris-HCl, 0,1 % SDS, 0,05 % APS, 0,005 % TEMED, pH = 8,8) aufgetrennt. Die Elektrophorese fand in einem SDS-PAGE Laufpuffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) statt und wurde in Abhängigkeit der analysierten Proteingrößen zu verschiedenen Zeiten gestoppt. Bei jedem Experiment wurde parallel ein Molekulargewichts-Standard aufgetragen.

2.6. Western-Blot

Die Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Whatmann, Dassel, Deutschland), basiert auf der Methode von Towbin et al., (1976)¹⁷³.

Der Proteintransfer erfolgte mit 300 mA für 1 Stunde bei RT oder mit 50 mA über Nacht bei 4°C im Transferpuffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 20 % Methanol). Das Blocken von unspezifische Bindungen erfolgte mittels Blocklösung (5 % Magermilch in *Tris-buffered saline* [TBS] (20 mM Tris, 137 mM NaCl) + 0,1 % Tween-20, pH = 7,6). Zur Detektion der Proteine wurde die Membran über Nacht bei 4°C im Primärantikörper inkubiert. Anschließend erfolgte eine zweistündige Inkubation bei RT mit dem Sekundärantikörper. Für die Detektion der Proteine mittels Chemielumineszenz-Detektionssystem (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) wurden Meerrettichperoxidase-gekoppelte Sekundärantikörper verwendet. Bei der Detektion der Proben mit der Odyssey-Infrarot-Abbildungsanlage erfolgte die Inkubation in Infrarot-Farbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpern. Zwischen jedem Schritt fand ein dreimaliges waschen der Membran mit 0,1 % Tween-20 in TBS statt. Die verwendeten Antikörper sind in 2.6.1. wiedergegeben.

2.6.1. Antikörper

Protein	Details	Verdünnung	Quelle
BCRP	70 kDa [Kilodalton], monoklonaler Maus-Antikörper	1 : 500	Millipore, Billerica, MA, USA
ERK2	42 kDa, polyklonaler Kaninchen-Antikörper	1 : 4.000	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg, Deutschland
HSP90	90 kDa, monoklonaler Maus-Antikörper	1 : 4.000	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg, Deutschland
MGMT	22 kDa, monoklonaler Maus-Antikörper	1 : 1.000	Millipore, Billerica, MA, USA
MRP1	190 kDa, monoklonaler Maus-Antikörper	1 : 250	Millipore, Billerica, MA, USA
P-gp	170 kDa, monoklonaler Maus-Antikörper	1 : 250	Millipore, Billerica, MA, USA
Goat-Anti-Maus IgG	Peroxidase-Konjugat	1: 2.000	Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA, USA
Goat-Anti-Kaninchen IgG	Peroxidase-Konjugat	1: 2.000	Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA, USA
Irdye 800CW <i>Donkey</i> Anti-Maus IgG	Infrarot-Farbstoff-Konjugat	1 : 10.000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland
Irdye 800CW <i>Donkey</i> Anti-Kaninchen IgG	Infrarot-Farbstoff-Konjugat	1 : 10.000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland

2.7. MGMT-Assay

Der MGMT-Assay beruht auf der Übertragung einer Tritium-markierten Methylgruppe, der Methylgruppe des Sauerstoffatoms des Guanins, auf das MGMT-Molekül. Die Methode von Myrnes et al., (1984) wurde unter Berücksichtigung einiger Modifikationen für die Quantifizierung der MGMT-Aktivität verwendet¹⁷⁴.

2.7.1. Herstellung der ³H-DNA

Zur Herstellung der Tritium-markierten DNA [³H-DNA] wurde 100 mg Kalbsthymus-DNA (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in Propandiol-Puffer (20 mM *2-amino-2-methyl-1,3-propanediol*, pH = 10) aufgenommen und mit Ethanol gefällt. Die Markierung der DNA mit 5 mCi ³H-Methylnitrosoharnstoff (Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland) fand für 30 Minuten bei 37°C und anschließender Überführung des Reaktionsgemisches für 30 Minuten bei RT statt. Die ³H-DNA wurde durch mehrfache Fällungen mit Ethanol gereinigt und in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH = 7,4) aufgenommen. Die Reaktivität wurde auf 80.000 *counts per minute* [cpm] pro 10 µl eingestellt.

2.7.2. Bestimmung der MGMT-Aktivität

Zur Bestimmung der MGMT-Aktivität wurden Proteinextrakte (Hergestellt durch die Methode 2.4.1.1.) mit 10 µl ³H-DNA (80.000 cpm) in Reaktionspuffer (70 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure [HEPES]-KOH, 1 mM Dithiothreitol [DTT], 5 mM EDTA, pH = 7,8) für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µg BSA und 13 % Trichloressigsäure zur Fällung der Proteine wurde die DNA durch Erhitzen auf 95°C für 45 Minuten hydrolysiert. Nach dreimaligem Waschen mit 5 % Trichloressigsäure wurde das Pellet in 0,2 M Natriumhydroxid [NaOH] resuspendiert und die Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler bestimmt. Die MGMT-Aktivität wurde als fmol (Übertragung der Radioaktivität von ³H-DNA auf Proteinmenge) pro Gesamtproteinmenge kalkuliert [fmol/mg Protein].

2.8. Durchflusszytometrie

2.8.1. Bestimmung des Zelltods mittels Sub-G1-Fraktion

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium, welches die abgelösten Zellen beinhaltet, zusammen mit den adhären Zellen im Reaktionsgefäß gesammelt. Die Zellen wurden bei 1.500 rpm für 4 Minuten pelletiert und in PBS aufgenommen. Die Fixierung fand mit 80 % Ethanol für mindestens 20 Minuten bei -20°C statt. Nach der Fixierung wurden die Zellen pelletiert (1.500 rpm, 4 Minuten, RT) und in PBS mit 30 µg/µl Ribonuklease A (zum RNA-Verdau) aufgenommen. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde die DNA mit 16,7 µg/ml Propidiumjodid [PI] angefärbt und die Proben mittels Durchflusszytometrie (FACS Calibur) analysiert. Für jede Probe wurden 10.000 Zellen analysiert und mit der Software CellQuest Pro aufgezeichnet. Der Anteil an Zellen mit geringem DNA-Gehalt (*sub-diploid DNA content*, [Sub-G1]) wurde mit der Software WinMDI Version 2.9 kalkuliert.

2.8.2. Bestimmung der Transportaktivität von ABC-Transportern

Die Fähigkeit von ABC-Transportern zum aktiven Transport von Fluoreszenzfarbstoffen entgegen ihrem Konzentrationsgradienten bietet die Möglichkeit zur Analyse der Transportfunktion sowie der Detektion von Substraten, Modulatoren oder Inhibitoren. Zwei funktionelle Experimente die häufig Anwendung finden, ist der Akkumulations-Assay (*accumulation assay*) und der Efflux-Assay (*retention assay*). Die Methoden von Homolya et al., (1993) und Hollo et al., (1994) wurden unter Berücksichtigung einiger Modifikationen für die Bestimmung der Transportaktivität der einzelnen ABC-Transporter verwendet^{175,176}.

In 2.8.2.3. sind die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, Hemmstoffe und Testsubstanzen mit ihren eingesetzten Endkonzentrationen dargestellt. Der DMSO-Anteil betrug für diese Experimente maximal 3 %.

2.8.2.1. Akkumulations-Assay

Exponentiell wachsende Zellen wurden mit einer Trypsin-EDTA-Lösung geerntet und in PBS gewaschen. Die Zellen wurden im Aufnahme-Medium (5 % FCS in Glukose-Transportpuffer (siehe 2.11.1.)) auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Akkumulations-Phase der Fluoreszenzfarbstoffe fand in Ab- oder Anwesenheit der jeweiligen Hemmstoffe oder Substanzen für 30 Minuten bei 37°C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 800 rpm statt. Nach der Inkubation wurden die Zellen auf Eis gehalten, pelletiert (4.000 rpm, 4 Minuten, 4°C) und dreimal mit eiskalten PBS gewaschen. Die Zellen wurden in eiskaltem PBS mit 20 µg/ml PI resuspendiert und sofort mittels Durchflusszytometrie (FACS Canto) gemessen. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit einem Argonlaser (488 nm) angeregt und unter Verwendung der Bandpass-Filter 530 nm (für Rhodamin 123 oder 5(6)-Carboxy-2',7'-Dichlorfluorescein-Diacetat [CFDA]) oder 670 nm (für Pheophorbid A) detektiert. Für jede Probe wurden 10.000 Zellen analysiert und die mediane Fluoreszenzintensität [MFI] mit der Software BD FACSDiva Version 6 kalkuliert. Tote Zellen wurden nicht in die Auswertung eingebracht. Die Berechnung der Akkumulation erfolgte anhand der folgenden Formel und wurde relativ zur Aufnahme mit nur dem Fluoreszenzfarbstoff dargestellt:

$$\text{Rel. Akkumulation} = \frac{\text{MFI}_{(\text{Farbstoff})} - \text{MFI}_{(\text{Kontrolle})}}{\text{MFI}_{(\text{Farbstoff} + \text{Substanz})} - \text{MFI}_{(\text{Substanz})}}$$

MFI _(Farbstoff) :	Mediane Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff
MFI _(Kontrolle) :	Mediane Fluoreszenzintensität der Zellen nach Inkubation im Medium
MFI _(Farbstoff + Substanz) :	Mediane Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff in Anwesenheit des Hemmstoffes/Substanz
MFI _(Substanz) :	Mediane Fluoreszenzintensität der Zellen nach Inkubation mit dem Hemmstoffes/Substanz
Rel. Akkumulation:	Relative [Rel.] Akkumulation vom Fluoreszenzfarbstoff in Anwesenheit der Substanz in Relation zur Akkumulation mit nur dem Fluoreszenzfarbstoff

2.8.2.2. Efflux-Assay

Zur Bestimmung der Efflux-Kapazität wurden die Zellen wie oben beschrieben nur mit den einzelnen Fluoreszenzfarbstoffen beladen. Nach der Akkumulations-Phase wurden die Zellen pelletiert (4.000 rpm, 4 Minuten, 4°C), einmal mit eiskalten PBS gewaschen und im Efflux-Puffer (5 % FCS in Glukose-Transportpuffer) in Ab- oder Anwesenheit der jeweiligen Hemmstoffe oder Substanzen für 20 oder 120 Minuten bei 37°C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 800 rpm inkubiert. Eine Probe wurde während der Inkubationszeit im Efflux-Medium auf Eis gelagert und diente als 0-Wert (kein Efflux vom Fluoreszenzfarbstoff). Nach der Inkubationsphase wurden die Zellen auf Eis gehalten, pelletiert (4.000 rpm, 4 Minuten, 4°C) und dreimal mit eiskalten PBS gewaschen. Die Zellen wurden in eiskaltem PBS mit 20 µg/ml PI resuspendiert und identisch zum Akkumulations-Assay analysiert. Die Berechnung des Effluxes der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte anhand der folgenden Formeln und wurde immer in Relation zum Hemmstoff der jeweiligen ABC-Transporter (Positivkontrolle [PK]) kalkuliert:

$$(1) \quad \text{Efflux}_{(\text{Substanz})} = \frac{[\text{MFI}_{\text{efflux (Substanz)}} - \text{MFI}_{\text{Ko (Substanz)}}] - [\text{MFI}_{\text{efflux (Kontrolle)}} - \text{MFI}_{\text{Ko}}]}{[\text{MFI}_{\text{0-Wert}} - \text{MFI}_{\text{Ko}}] - [\text{MFI}_{\text{efflux (Kontrolle)}} - \text{MFI}_{\text{Ko}}]}$$

$$(2) \quad \text{Efflux}_{(\text{Hemmstoff})} = \frac{[\text{MFI}_{\text{efflux (Hemmstoff)}} - \text{MFI}_{\text{Ko (Hemmstoff)}}] - [\text{MFI}_{\text{efflux (Kontrolle)}} - \text{MFI}_{\text{Ko}}]}{[\text{MFI}_{\text{0-Wert}} - \text{MFI}_{\text{Ko}}] - [\text{MFI}_{\text{efflux (Kontrolle)}} - \text{MFI}_{\text{Ko}}]}$$

$$(3) \quad \text{Rel. Efflux}_{(\text{Substanz})} = \frac{\text{Efflux}_{(\text{Substanz})}}{\text{Efflux}_{(\text{Hemmstoff})}}$$

MFI _{efflux (Substanz)} :	Mediane Fluoreszenzintensität nach Akkumulation mit dem Fluoreszenzfarbstoff und der Efflux-Phase in Anwesenheit einer Substanz
MFI _{Ko (Substanz)} :	Mediane Fluoreszenzintensität der Zellen in Anwesenheit einer Substanz
MFI _{efflux (Kontrolle)} :	Mediane Fluoreszenzintensität nach Akkumulation mit dem Fluoreszenzfarbstoff und der Efflux-Phase im Medium
MFI _{Ko} :	Mediane Fluoreszenzintensität der Zellen nach Inkubation im Medium
MFI _{0-Wert} :	Mediane Fluoreszenzintensität nach Akkumulations-Phase mit dem Fluoreszenzfarbstoff
MFI _{efflux (Hemmstoff)} :	Mediane Fluoreszenzintensität nach Akkumulation mit dem Fluoreszenzfarbstoff und der Efflux-Phase in Anwesenheit des Inhibitors
MFI _{Ko (Hemmstoff)} :	Mediane Fluoreszenzintensität der Zellen in Anwesenheit des Hemmstoffes
Efflux _(Substanz) :	Relative Hemmung des Effluxes vom Fluoreszenzfarbstoff in Anwesenheit der Substanz
Efflux _(Hemmstoff) :	Relative Hemmung des Effluxes vom Fluoreszenzfarbstoff in Anwesenheit des Hemmstoffes
Rel. Efflux _(Substanz) :	Relative Hemmung des Effluxes vom Fluoreszenzfarbstoff in Relation zum Hemmstoff (PK)

2.8.2.3. Fluoreszenzfarbstoffe, Inhibitoren und Testsubstanzen

Substanz	Funktion der Substanz	Konzentration im Assay
Rhodamin 123 [Rho 123] ¹	Fluoreszenzfarbstoff der vom P-gp transportiert wird	30 µM
5(6)-Carboxy-2',7'-Dichlorfluorescein-Diacetat [CFDA] ¹	Fluoreszenzfarbstoff der vom MRP1 transportiert wird	20 µM
Pheophorbid A [Pheo A] ¹	Fluoreszenzfarbstoff der vom BCRP transportiert wird	0,5 µM
Verapamil	Kompetitives Substrate für P-gp	100 µM
MK571	Inhibitor für MRP1	40 µM
Ko143	Inhibitor für BCRP	50 µM
O ⁶ BG	MGMT-Inhibitor	100 µM
O ⁶ BTG	MGMT-Inhibitor	100 µM
O ⁶ BG-Glu	MGMT-Inhibitor	100 µM
O ⁶ BTG-Glu	MGMT-Inhibitor	100 µM

¹ Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden von der Firma „Sigma-Aldrich“ in Taufkirchen, Deutschland bezogen

2.9. Koloniebildungsassay

Exponentiell wachsende Zellen wurden in Einzelzellsuspension gebracht und in einer angemessenen Zellzahl (200 bis 3.500 Zellen) in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät. Die Zellzahlen wurden in unabhängigen Experimenten bestimmt und so ausgewählt, dass in An- oder Abwesenheit der Behandlung mindestens 50 Kolonien nach der Inkubationszeit gewachsen waren. Nach der Aussaat wurden den Zellen erlaubt für 6 Stunden an die Schalen zu adhären. Anschließend fand die Behandlung mit MGMT-Hemmstoffen und steigenden Konzentrationen der Zytostatika statt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Tagen wurde das Medium entfernt, die adhären Zellen mit PBS gewaschen und mit einer Lösung [Essigsäure:Methanol:Wasser (1:1:8)] für 30 Minuten fixiert. Die Kolonien (mindestens 50 Zellen) wurden mit einer Färbelösung (1,25 % Giemsa und 0,125 % Kristalviolett) für 10 Minuten angefärbt. Die Überlebensrate wurde unter Berücksichtigung der Koloniebildungseffizienz relativ zur unbehandelten Kontrolle kalkuliert.

2.10. Humanes Xenograft-Mausmodell

2.10.1. Versuchstiere

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weibliche oder männliche Nacktmäuse des Stammes BALB/c nu/nu aus pathogen-freier Zucht der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) in Mainz bezogen. Aufgrund des fehlenden Thymus ist dieser Mausstamm nicht in der Lage T-Zellen auszubilden und weist somit einen immundefizienten Phänotyp auf. Die Haltung, Pflege und Fütterung der Tiere wurde in den zentralen Tierlaboren der ZVTE von ausgebildeten Mitarbeitern durchgeführt. Die Tierversuchsvorhaben wurden unter Berücksichtigung des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

2.10.2. Tumorwachstum und Applikation von MGMT-Hemmstoffen

In dieser Arbeit wurde ein Xenograft-Mausmodell verwendet. Hierbei wurde ein Tumor aus der humanen Melanomzelllinie A375 zum Anwachsen gebracht. Humane A375 Melanomzellen wurden geerntet, in PBS aufgenommen und 7×10^6 Zellen wurden subkutan in die linke und/oder rechte Flanke der Maus injiziert. Nach dem Erreichen einer angemessenen Tumorgöße ($50\text{-}200 \text{ mm}^3$) wurde mit der Behandlung begonnen. Die Glukose-Konjugate wurden intraperitoneal [i.p.] oder intravenös [i.v.] in Ab- oder Anwesenheit einer 30-minütigen Vorbehandlung mit den ABC-Transporter-Hemmstoffen appliziert. Nach definierten Inkubationszeiten wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation (Genickbruch) getötet, die Organe herauspräpariert und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Gewebe fand bei -80°C statt. Zur Bestimmung der MGMT-Aktivität wurden Gewebestücke in Sonifizierungs-Puffer + Protease-Inhibitoren-Cocktail (Roche, Mannheim, Deutschland) aufgenommen und homogenisiert. Die weitere Verarbeitung der Einzelzellsuspension erfolgte wie in 2.4.1.1. beschrieben.

2.10.3. Kombinationsbehandlungen mit alkylierenden Agenzien

Eine Zusammenfassung der injizierten Substanzen ist in 2.10.4. dargestellt. Zur Generierung des humanen A375-Xenografts wurden 7×10^6 Zellen subkutan in die linke und/oder rechte Flanke der Mäuse injiziert. Bei einer Tumorgröße von 50-200 mm³ wurde die Kombinationsbehandlung initiiert (Tag 0). Die Applikation der MGMT-Hemmstoffe erfolgte in Ab- oder Anwesenheit einer 30-minütigen Vorbehandlung mit den ABC-Transporter-Hemmstoffen. Nach einer Inkubationszeit von 2 (Experimente mit ABC-Transporter-Hemmstoffen) bzw. 4 Stunden wurde den Mäusen die Zytostatika TMZ oder CCNU intraperitoneal verabreicht. Die Bestimmung des Mausegewichts (Toxizitätsmarker) und der Tumorgröße erfolgte im Abstand von 2-3 Tagen. Die Tumorgröße wurde mit der folgenden Formel berechnet und relativ zum Tag der Behandlung (Tag 0) kalkuliert:

$$\text{Tumorvolumen [mm}^3\text{]} = (\text{Länge} \times \text{Breite} \times \text{Höhe}) * \pi / 6$$

2.10.4. Hemmstoffe und Zytostatika für die Maus-Modell-Experimente

Substanz	Funktion	Applikation	Lösungsmittel
O ⁶ BG	MGMT-Inhibitor	20 mg/kg intraperitoneal für 4 Stunden	Polyethylenglycol [PEG]:DMSO:Natriumchlorid [NaCl] (1:1:1)
O ⁶ BTG	MGMT-Inhibitor	20 mg/kg intraperitoneal für 2 bzw. 4 Stunden	PEG:DMSO:NaCl (1:1:1)
O ⁶ BG-Glu	MGMT-Inhibitor	100 mg/kg intraperitoneal für 4 Stunden	PEG:DMSO:NaCl (1:1:1)
		125 mg/kg intravenös für 2 Stunden	10 % DMSO in 0.9 %-ige NaCl-Lösung
O ⁶ BTG-Glu	MGMT-Inhibitor	100 mg/kg intraperitoneal für 4 Stunden	PEG:DMSO:NaCl (1:1:1)
		62,5 mg/kg intravenös für 2 Stunden	10 % DMSO in 0.9 %-ige NaCl-Lösung
Probenecid ¹	Inhibitor für MRP	200 mg/kg intraperitoneal für 30 Minuten	Mit 1 M NaOH gelöst und in PBS verdünnt (pH = 7.4)
Elacridar ²	Inhibitor für P-gp und BCRP	10 mg/kg intraperitoneal für 30 Minuten	PEG:NaCl (1:2)
TMZ	Methylierendes Zytostatika	150 – 200 mg/kg intraperitoneal	DMSO:NaCl (1:5)
CCNU	Chlorethylendes Zytostatika	16 mg/kg intraperitoneal	PEG:DMSO:NaCl (1:1:6)

¹ Probenecid wurden von der Firma „Sigma-Aldrich“ in Taufkirchen, Deutschland bezogen

² Elacridar wurden von der Firma „MedKoo Biosciences“ in Chaepel Hill, NC, USA bezogen

2.11. Aufnahmestudien mit radioaktiv-markiertem Glukose-Konjugat

Die Aufnahme von radioaktiven Stoffen wurde unter Berücksichtigung einiger Modifikationen nach der Methode von Nakanishi et al., (2010) durchgeführt¹⁷⁷. Zur Analyse der Aufnahme des Glukose-Konjugates O⁶BTG-Glu wurde dieses von der Firma „BIOTREND Chemikalien GmbH“ aus Köln mit Tritium radioaktiv markiert [³H-O⁶BTG-Glu]. Die Tritium-Markierung selbst wurde in Russland mittels Tritium-Gasaustausch-Methode durchgeführt und die Unversehrtheit des Moleküls durch die Analyse mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie [HPLC] bestätigt. In 2.11.3. sind die verwendeten radioaktive Stoffe sowie die Transportpuffer angegeben.

2.11.1. Zellbasiertes System

Nach Erreichen eines semi-konfluenten Stadiums wurde das Medium entfernt und die Zellen dreimal mit vorgewärmten Transportpuffer gewaschen. Repräsentativ für die Zellzahl wurde von einer Probe (1. Well) die Zellzahl mittels Neubauer-Kammer bestimmt. Für einen Teil der Experimente fand eine 15-30-minütige Vorinkubation mit den Inhibitoren der Transporter oder mit Transportpuffern (veränderte Komponenten) statt. Die radioaktiven Substanzen wurden in Ab- oder Anwesenheit von Inhibitoren/nicht-radioaktiven Substanzen (kalte Substanzen) den Zellen im neuen Transportpuffer zugefügt und die Aufnahme fand im Wärmebad bei 37°C statt. Nach bestimmten Inkubationszeiten wurde der Transportpuffer entfernt, die Zellen dreimal mit eiskalten Glukose-Transportpuffer gewaschen und in 1 M NaOH lysiert. Die Radioaktivität wurde im Flüssigszintillationszähler bestimmt, die akkumulierte Stoffmenge der radioaktiven Substanz kalkuliert und relativ zur Zellzahl oder Zellzahl pro Zeit dargestellt.

Für das Kompetitions-Experiment (Abbildung 17b) wurden zuerst die einzelnen Stamm-Konzentrationen des kalten O⁶BTG-Glu (gelöst in DMSO) mit dem radioaktiven ³H-O⁶BTG-Glu (gelöst in Ethanol) in der organischen Phase gemischt und anschließend in Transportpuffer auf die jeweilige Endkonzentration eingestellt. Weitere Modifikationen des Versuchansatzes (z.B. Temperaturveränderung der Aufnahmereaktion) sind im Text beschrieben.

2.11.2. Multilamellare Vesikel

Die multilamellaren (mehrschichtigen) Vesikel [MLV], bestehend aus Phosphatidylcholin und Cholesterol, wurden vom Institut für Biophysik in Mainz zur Verfügung gestellt und nach der Methode von Budai et al., hergestellt ¹⁷⁸.

Zur Analyse der initialen Bindung wurden 2,5 mg MLV mit den radioaktiven Stoffen für 5 Sekunden bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliges pelletieren (14.000 rpm, 10 Minuten, RT) und waschen der MLV mit dem Glukose-Transportpuffer. Die Radioaktivität in den MLV wurde im Flüssigszintillationszähler bestimmt und der Anteil zur eingesetzten Gesamtradioaktivität kalkuliert.

2.11.3. Radioaktive Stoffe und Transportpuffer der Aufnahmestudien

Substanz	spezifische Radioaktivität	Quelle
³ H-O ⁶ BTG-Glu	8 Ci/mmol	BIOTREND, Köln, Deutschland
³ H-deoxy-Glukose	20 Ci/mmol	PerkinElmer, Rodgau, Deutschland
¹⁴ C-alpha-Methyl-Glucopyranosid	250 mCi/mmol	PerkinElmer, Rodgau, Deutschland

Transportpuffer [TP] (Modified Hank's balanced salt solution)	Zusammensetzung/Änderungen zum Standard-TP
Standard-TP	0,952 mM CaCl ₂ , 5,36 mM KCl, 0,441 mM KH ₂ PO ₄ , 0,812 mM MgSO ₄ , 136,7 mM NaCl, 0,385 mM Na ₂ HPO ₄ , 1 mM Glukose, 10 mM HEPES, pH = 7,4
Glukose-TP	25 mM Glukose
red. NaCl-TP	13,67 mM NaCl
Cholinchlorid-TP	kein NaCl, aber 136,7 mM Cholinchlorid
KCl-TP	kein NaCl, aber 136,7 mM KCl
Saccharose-TP	100 µM Glukose + 10 mM Saccharose

2.12. Partikelbildung der MGMT-Hemmstoffe

Die Identifikation der Partikelbildung in wässrigen Lösungen erfolgte mittels *High Particle Performance Sizer* [HPPS] (Malvern Instruments GmbH, Herrenberg) im Institut für Biophysik der Mainzer Universität. Dieses Gerät verwendet die Technik der dynamischen Lichtstreuung (*dynamic light scattering*, [DLS]) zur Bestimmung der Partikelgröße. Die DLS analysiert die Brownsche Molekularbewegung und kalkuliert daraus die Interferenz des Lichtes und somit die Größe von Partikeln¹⁷⁹.

Die Lösungen (1 % DMSO in PBS) mit den jeweiligen Konzentrationen der MGMT-Hemmstoffe wurden in eine Quarzküvette pipettiert und mittels HPPS analysiert. Die Messung wurde bei 25°C durchgeführt. Die Durchschnittswerte folgender Parameter wurde kalkuliert: die Partikelgröße, der Polydispersitäts-Index und die Intensität des Streulichtes.

2.13. Statistik

Für alle quantitativen Analysen wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Daten wurden mit der Software GraphPad Prism Version 6 verarbeitet. Es wurden die entsprechenden Mittelwerte mit ihren jeweiligen Standardfehler (*standard deviation*, [SD]) kalkuliert und graphisch dargestellt. Zur Überprüfung der Signifikanz wurden die p-Werte mittels ungepaarten T-Test oder der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Dunnett-Test berechnet. Die p-Werte sind wie folgt angegeben: *, $p < 0.05$; ns, nicht signifikant

3. Ergebnisse

3.1. Sensibilisierung gegenüber alkylierenden Agenzien

Das DNA-Reparaturprotein O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase [MGMT] stellt einen Resistenzfaktor gegenüber alkylierenden Zytostatika dar. Aus diesem Grund wird seit Jahren eine pharmakologische Hemmung dieses Proteins versucht, um die Therapie in MGMT-exprimierenden Tumoren zu steigern. Die therapeutisch verwendeten Inhibitoren O⁶-Benzylguanin [O⁶BG] und O⁶-(4-Bromothienyl)guanin [O⁶BTG] hemmen das MGMT-Protein im Tumorgewebe, ohne selbst toxisch zu wirken. Trotz vielversprechender Ergebnisse in klinischen Phase I und II Studien, erreichte bis heute kein MGMT-Inhibitor die klinische Phase III Studie. Die Ursache liegt in der nicht-selektiven Hemmung von MGMT begründet. Dies erfordert eine Reduktion der Zytostatika-Dosis, die letzten Endes den therapeutischen Index nicht verbessert. Folglich sind alternative Strategien erforderlich.

In dieser Arbeit wurde die Strategie der Glukosekonjugation von MGMT-Inhibitoren verwendet, um ein Targeting zum Zweck der Hemmung des MGMT-Proteins in Tumorzellen bzw. Tumoren zu ermöglichen. Die verwendeten Zuckerkonjugate sind *2-amino-6-(benzyloxy)-9-(octyl-β-D-glycosyl)-purine* und *2-amino-6-(4-bromothiophen-2-yl-methoxy)-9-(octyl-β-D-glycosyl)-purine*, im Folgenden jeweils als O⁶BG-Glu und O⁶BTG-Glu bezeichnet. Die Strukturformeln der Zuckerkonjugate und ihrer jeweiligen Ausgangssubstanzen sind in Abbildung 4 (Abb. 4) dargestellt.

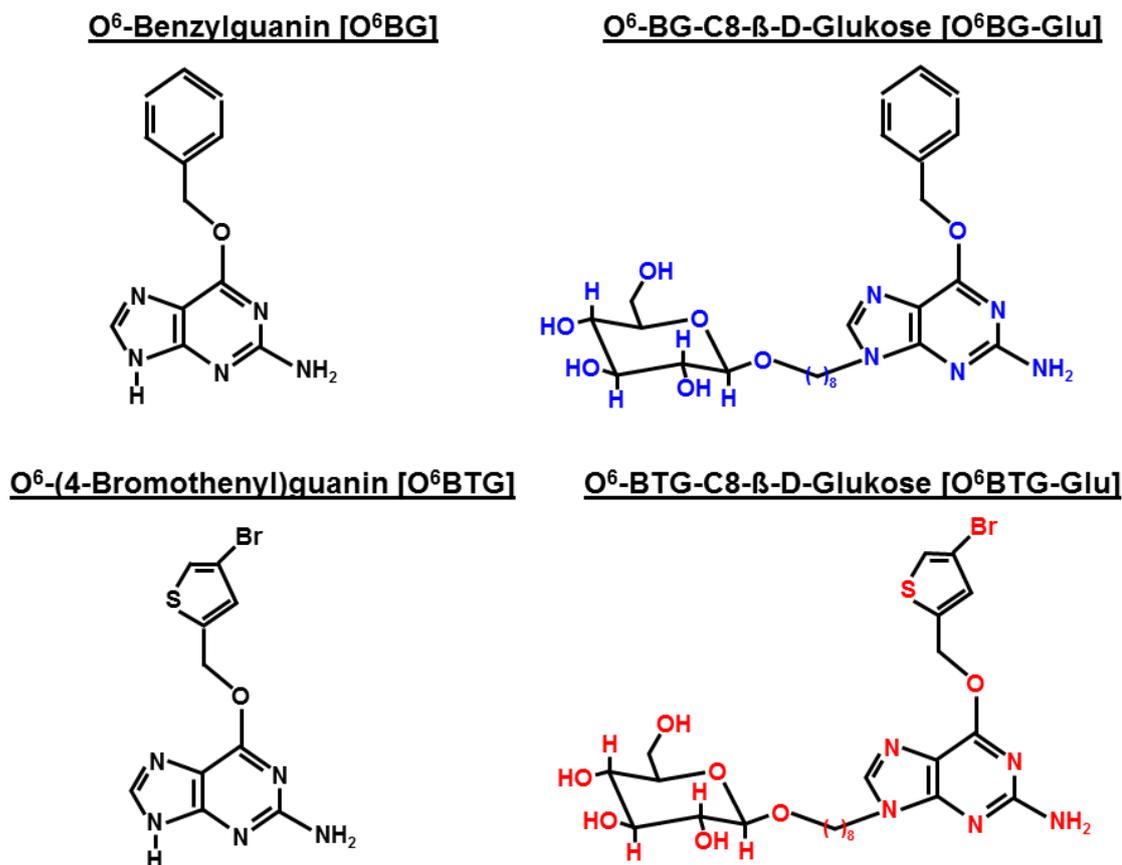


Abb. 4: Strukturformeln und Abkürzungen der verschiedenen MGMT-Hemmstoffe

3.1.1. Wirksamkeit Glukose-konjugierter Hemmstoffe im zellbasiertem *in vitro*-System

Vorhergehend wurde am Institut für Toxikologie in Mainz verschiedene Glukose-Konjugate synthetisiert und ihre konzentrationsabhängige Hemmwirkung analysiert; diese Untersuchungen fanden in der Zervixkarzinomzelllinie HeLa S3 statt¹⁸⁰. Zur Erweiterung dieser Resultate auf ein Hirntumor-Modell wurde die zeit- und konzentrationsabhängige Hemmung des MGMT-Proteins in einer Glioblastomzelllinie charakterisiert. Die humane Glioblastomzelllinie T98G wurde aufgrund der Expression von MGMT und dem Glukosetransporter GLUT1 als Modellzelllinie ausgewählt^{181,182}. Der im Institut etablierte MGMT-Assay, der die Übertragung einer Tritium-markierten Methylgruppe von der DNA auf das MGMT-Protein analysiert, fand Verwendung bei der Untersuchung des Inhibitionseffektes.

Die Fähigkeit der Glukose-Konjugate O^6BG -Glu und O^6BTG -Glu zur Inhibierung des zellulären MGMT-Proteins stieg mit der Konzentration und Inkubationszeit an (Abb. 5a bis d). Die nicht mit Glukose-konjugierten Inhibitoren O^6BG und O^6BTG hemmten MGMT bereits innerhalb von 15 Minuten [Min.] für 10 μM O^6BG oder 1 Minute für 5 μM O^6BTG ; die Glukose-Konjugate benötigten zur Erreichung der identischen Hemmung mindestens 240 Minuten für 25 μM O^6BG -Glu oder 60 Minuten für 5 μM O^6BTG -Glu (Abb. 5c und d). In T98G Zellextrakten erfolgte die Inaktivierung des MGMT-Proteins mit den Glukose-Konjugaten bereits nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten für 25 μM O^6BG -Glu oder 5 Minuten für 5 μM O^6BTG -Glu (Abb. 5e und f); im Zellsystem wurde nur eine 50 %-ige Hemmung nach diesen kurzen Inkubationszeiten erreicht. Dies bestätigt die Wirksamkeit der Glukose-Konjugate zur Hemmung des MGMT-Proteins.

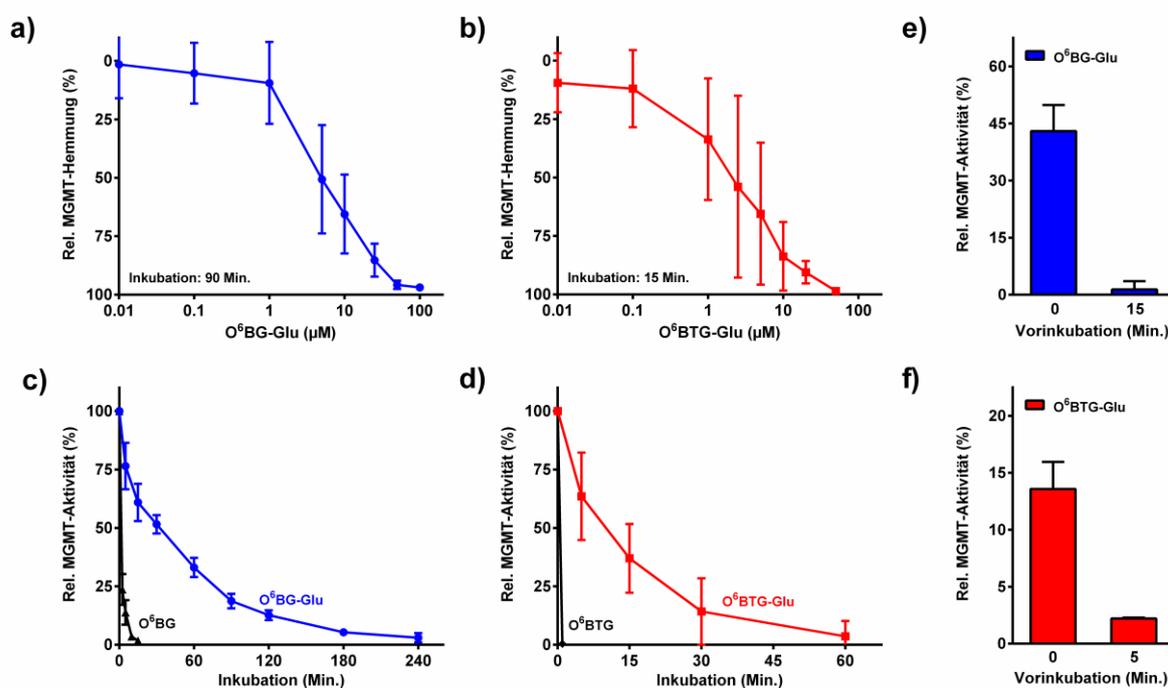


Abb. 5: Hemmung der MGMT-Aktivität in T98G Glioblastomzellen und deren Zellextrakten MGMT-Hemmung in T98G Zellen in Abhängigkeit der Konzentration nach Behandlung mit O^6BG -Glu für 90 Minuten (a) oder O^6BTG -Glu für 15 Minuten (b). MGMT-Hemmung in T98G Zellen in Abhängigkeit der Zeit nach Behandlung mit 10 μM O^6BG , 25 μM O^6BG -Glu (c), 5 μM O^6BTG oder 5 μM O^6BTG -Glu (d). Hemmung des MGMT-Proteins in T98G Zellextrakten nach 15-minütiger Vorinkubation mit 25 μM O^6BG -Glu (e) oder 5-minütiger Vorinkubation mit 5 μM O^6BTG -Glu (f). Bei keiner Vorinkubation (0 Min.) erfolgte die Zugabe des Inhibitors und der 3H -DNA zum gleichen Zeitpunkt. Die Hemmung der MGMT-Aktivität wurde mittels MGMT-Assay bestimmt und relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt.

In den anschließenden *in vitro*-Experimenten wurde für die nicht-konjugierten Inhibitoren eine Konzentration von 10 μM O⁶BG und 5 μM O⁶BTG sowie für die Glukose-Konjugate eine Konzentration von 25 μM O⁶BG-Glu und 5 μM O⁶BTG-Glu verwendet. Für alle Hemmstoffe betrug die Expositionsdauer 4 Stunden [Std.].

Die Effektivität von alkylierenden Chemotherapeutika ist von der Dauer der MGMT-Inhibition abhängig. Schon eine geringe MGMT-Aktivität führt zur Resistenzentwicklung in Tumoren ¹⁸³. Auf dieser Grundlage wurde im zellbasierten *in vitro*-System die Effektivität der MGMT-Hemmung nach dauerhafter Behandlung der Zellen für einen Zeitraum von 120 Stunden untersucht. Zur Identifikation der endogenen Resynthese vom MGMT-Protein und dem Auftreten eventueller Akkumulationsprozesse im Zellinneren (insbesondere für die Glukose-Konjugate) wurde zusätzlich für die beiden Inhibitoren O⁶BG und O⁶BG-Glu die zeitabhängige Wiedererlangung der vollständigen MGMT-Aktivität nach einer Puls-Behandlung (d.h. Entfernung des Inhibitors aus dem Medium) analysiert. Die ständige Präsenz der MGMT-Hemmstoffe führte zur vollständigen Inhibition der MGMT-Aktivität über einen Zeitraum von mindestens 120 Stunden (Abb. 6a). Wurden jedoch die Inhibitoren nach erfolgter MGMT-Hemmung entfernt, so stieg die MGMT-Aktivität mit fortlaufender Inkubationsdauer wieder an und erlangte nach ungefähr 72 Stunden ihr Ausgangsniveau (Abb. 6c und d). Der zeitliche Verlauf der Wiedererlangung des MGMT-Proteins war für das Glukose-Konjugat O⁶BG-Glu und den Inhibitor O⁶BG identisch, was darauf hinweist, dass keine verlängerte Akkumulation des Glukose-Konjugats in den Zellen stattfindet. Die Daten der Aktivitätsmessung wurden in diesem Experiment durch Bestimmung des MGMT-Proteins mittels Western-Blot verifiziert (Abb. 6b, e und f). Da MGMT nach seiner im Zuge des Reparaturvorganges erfolgten Inaktivierung proteosomal abgebaut wird, korreliert die Proteinmenge mit der enzymatischen Aktivität ¹⁸⁴.

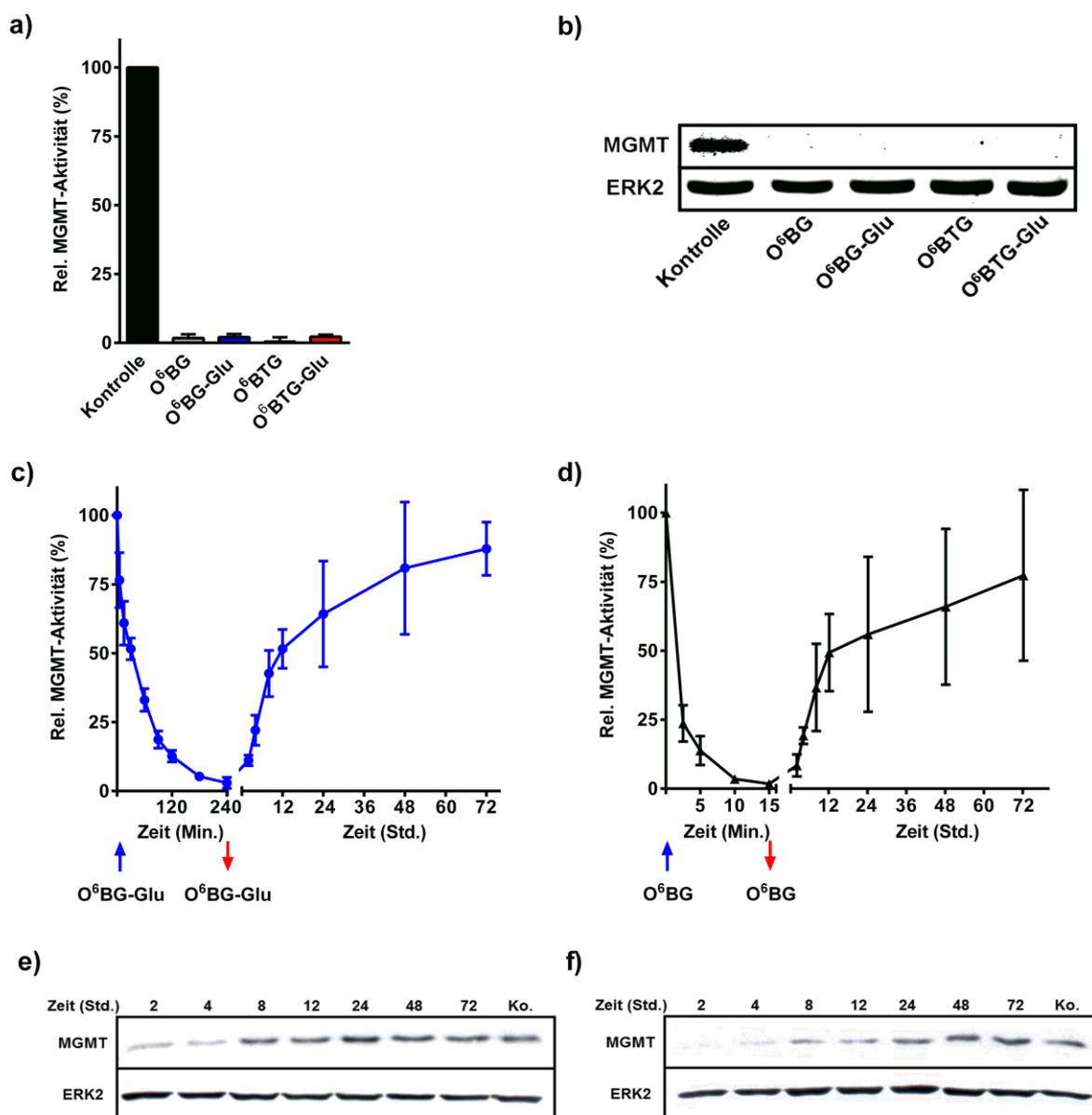


Abb. 6: Hemmung und Resynthese des MGMT-Proteins in T98G Glioblastomzellen

a) Behandlung mit 10 μM O⁶BG, 25 μM O⁶BG-Glu, 5 μM O⁶BTG oder 5 μM O⁶BTG-Glu über einen Zeitraum von 120 Stunden. Behandlung mit 25 μM O⁶BG-Glu für 4 Stunden (c) oder 10 μM O⁶BG für 15 Minuten (d) und ihre zeitabhängige Resynthese der MGMT-Aktivität. Die Pfeile kennzeichnen die Zugabe (↑) oder Entfernung (↓) der Inhibitoren. Die relative MGMT-Aktivität wurde mittels MGMT-Assay bestimmt und relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Analyse der Expression des MGMT-Proteins mittels Western-Blot nach Behandlung mit den jeweiligen MGMT-Hemmstoffen für 120 Stunden (b) oder Kinetik der Resynthese nach Behandlung mit 25 μM O⁶BG-Glu für 4 Stunden (e) oder 10 μM O⁶BG für 15 Minuten (f). ERK2 diente als Ladekontrolle.

Zusammenfassend bestätigen die Resultate die Aufnahme der Glukose-Konjugate in die Zelle und ihre Fähigkeit zur dauerhaften MGMT-Hemmung, für die Zeit der Anwesenheit des Inhibitors im Medium. Zusätzlich weisen die Ergebnisse darauf hin, dass eine Aufnahme der Glukose-Konjugate per einfacher Diffusion nicht erfolgt, da zur vollständigen Hemmung von MGMT eine längere Inkubationszeit der Zellen mit dem Inhibitor benötigt wird als für permeable Substanzen zu erwarten wäre.

3.1.2. Inaktivierung vom MGMT-Protein in verschiedenen Zelltypen

Membrantransporter besitzen eine wichtige Funktion in der Verteilung von Medikamenten im Körper, der zellulären Aufnahme und Abgabe (Influx und Efflux), der therapeutischen Effektivität und dem Auftreten von Nebenwirkungen. Derzeit sind über 400 Transportergene im menschlichen Genom identifiziert worden, die eine zelltypspezifische Expression aufweisen¹⁴⁷. Zur Bestimmung der Anwendbarkeit der Glukose-konjugierten Inhibitoren in verschiedenen Zelltypen wurden Tumorzelllinien und zwei nicht-transformierte Fibroblastenzelllinien hinsichtlich ihrer MGMT-Hemmung (und somit indirekt hinsichtlich der Aufnahme des Inhibitors) analysiert. Für die Gesamtheit der analysierten Tumorzellen wurde nach einer 4-stündigen Inkubationsdauer eine deutliche Hemmung der MGMT-Aktivität für alle Inhibitoren gemessen (Abb. 7a). Bei den Zelllinien T98G, HT29 und Caco-2 war für das Glukose-Konjugat O⁶BG-Glu eine geringe Restaktivität nachweisbar, die aber weniger als 5 % der Gesamtaktivität betrug. In den menschlichen VH10-tert Hautfibroblasten wurde unter diesen Bedingungen ebenfalls eine komplette MGMT-Hemmung für alle Inhibitoren nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde bei der murinen Fibroblastenzelllinie NIH-3T3 mit beiden Glukose-Konjugaten eine komplette Inaktivierung der MGMT-Aktivität nach 4 Stunden Exposition nicht erreicht (Abb. 7b).

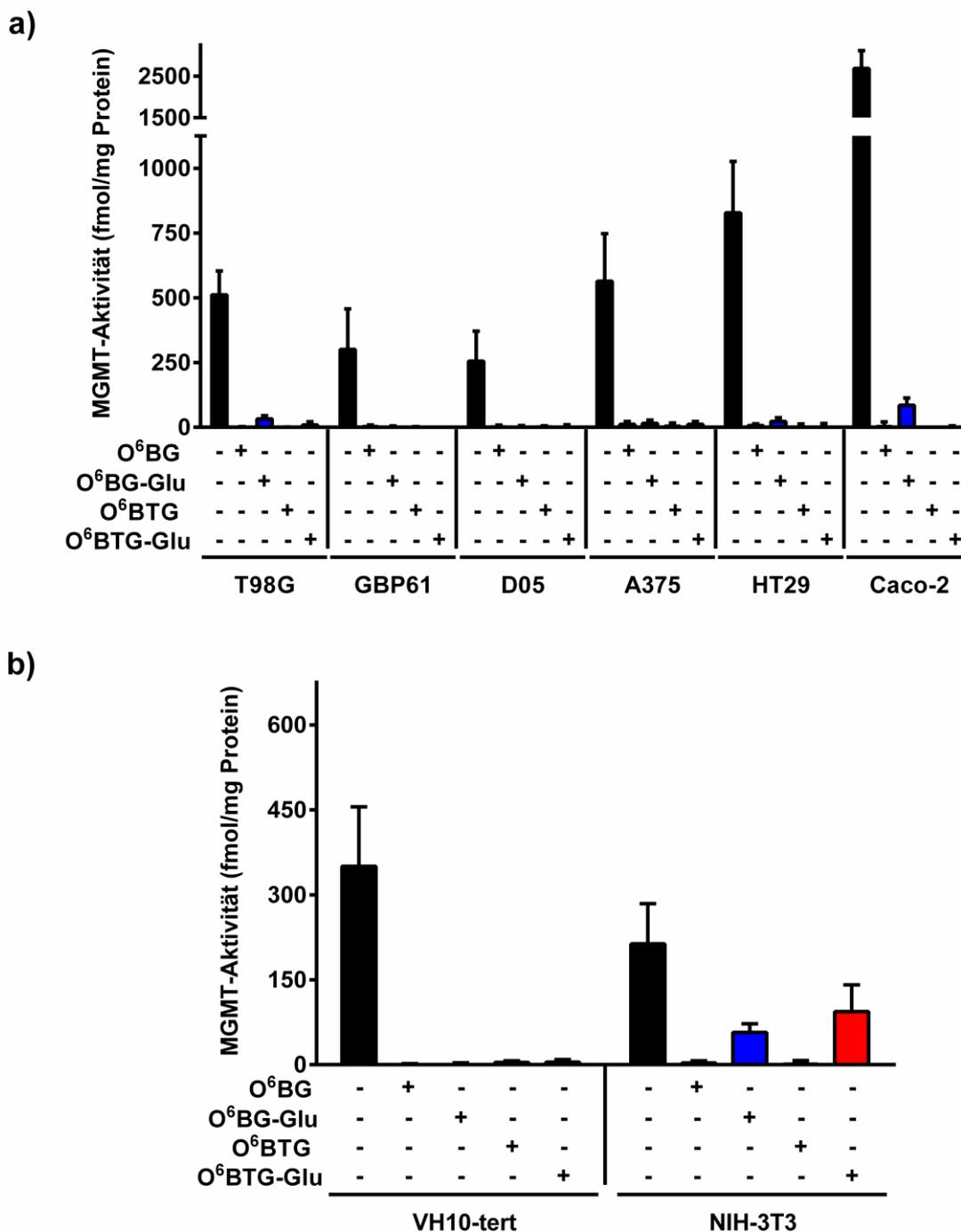


Abb. 7: Hemmung der MGMT-Aktivität in verschiedenen Zelltypen

Bestimmung der MGMT-Aktivität von Tumorzelllinien (a) oder Fibroblastenzelllinien (b) in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) von 10 μ M O⁶BG, 25 μ M O⁶BG-Glu, 5 μ M O⁶BTG oder 5 μ M O⁶BTG-Glu für eine Expositionsdauer von 4 Stunden. Die MGMT-Aktivität wurde mittels MGMT-Assay bestimmt.

Das DNA-Reparaturprotein MGMT wird in unterschiedlichen Spezies exprimiert. Die Aminosäurezusammensetzung von MGMT ist innerhalb und zwischen den Spezies nicht identisch. Dies besitzt einen Einfluss auf die Wirksamkeit von MGMT-Hemmstoffen; der Inhibitor O⁶BG benötigt zur Inhibition des MGMT-Proteins der Maus eine 10-fach höhere Konzentration als zur vergleichbaren Inhibition des menschlichen MGMT-Proteins¹⁸⁵. Um der Fragestellung nachzugehen, ob die Glukose-Konjugate eine geringere Hemmwirkung auf das murine MGMT-Protein von der NIH-3T3 Zelllinie aufweisen, wurden dessen Zellextrakte hinsichtlich der MGMT-Hemmung untersucht. Eine kurze Inkubationsdauer von 15 Minuten mit 25 µM des Glukose-Konjugates O⁶BG-Glu oder 5 Minuten für 5 µM O⁶BTG-Glu führten nur zu einer geringen Hemmung der MGMT-Aktivität (Abb. 8). Unter diesen Bedingungen wurde das menschliche MGMT-Protein von den T98G Zellextrakten vollständig inhibiert (Vergleiche Abb. 6e und f). Dies bestätigt eine geringere Hemmwirkung auf das murine MGMT-Protein durch die beiden Glukose-Konjugate.

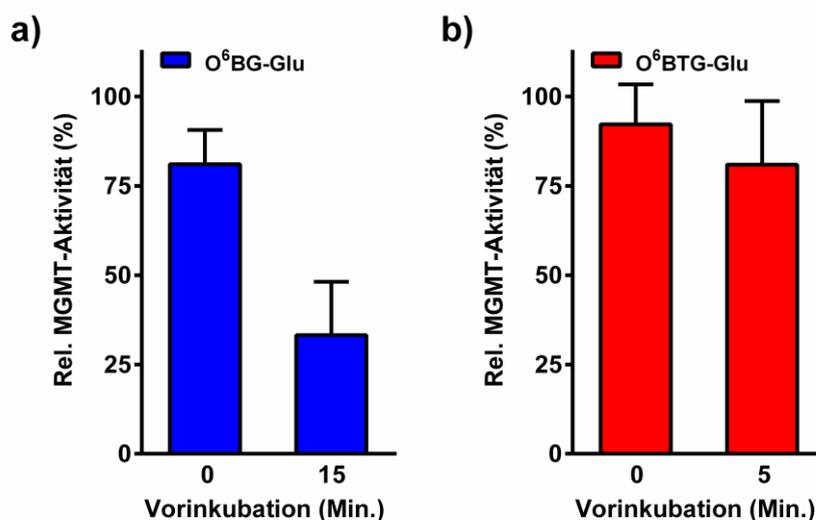


Abb. 8: Inaktivierung des MGMT-Proteins in Zellextrakten der Maus-Zelllinie NIH-3T3
Hemmung des MGMT-Proteins in NIH-3T3 Zellextrakten nach 15-minütiger Vorinkubation mit 25 µM O⁶BG-Glu (a) oder 5-minütiger Vorinkubation mit 5 µM O⁶BTG-Glu (b). Bei keiner Vorinkubation (0 Min.) erfolgte die Zugabe des Inhibitors und der ³H-DNA zum gleichen Zeitpunkt. Die Hemmung der MGMT-Aktivität wurde mittels MGMT-Assay bestimmt und relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt.

Zusammenfassend bestätigen die Daten die Anwendbarkeit der Glukose-konjugierten Inhibitoren zur effektiven MGMT-Hemmung in humanen Tumorzellen. Die Daten weisen zudem darauf hin, dass der (die) für die Aufnahme verantwortliche(n) Transporter in vielen unterschiedlichen Zelltypen exprimiert werden.

3.1.3. Sensibilisierung gegenüber methylierenden Agenzien

Alkylierende Agenzien finden aufgrund ihrer zytotoxischen Wirkung Anwendung als Chemotherapeutika in Tumorarten wie Hirntumoren oder dem malignen Melanom. Diese reaktiven Agenzien führen zu verschiedenen Addukten in der DNA, wobei die Läsionen O⁶-Methylguanin (für Temozolomid [TMZ]) und O⁶-Chlorethylguanin (für Lomustin [CCNU]) die höchste Toxizität und Mutagenität aufweisen. Das DNA-Reparaturprotein MGMT entfernt diese DNA-Addukte und ist somit ein wichtiger Resistenzfaktor in Tumorzellen.

Nachdem gezeigt wurde, dass MGMT durch die Glukose-Konjugate in der Aktivität gehemmt werden kann, wurden Tumorzellen, die eine Resistenz gegenüber dem alkylierenden Agens TMZ aufweisen, mit einer Kombination aus Inhibitor und Chemotherapeutikum behandelt. Der Zelltod wurde mittels Analyse der Sub-G1-Fraktion unter Verwendung der Durchflusszytometrie bestimmt, da vorherige Studien die Induktion der Apoptose als primären Mechanismus des Zelltodes nach einer Behandlung mit alkylierenden Agenzien aufzeigten⁴⁹. Für die Induktion der Apoptose bei den Melanomzelllinien D05 und A375 war eine 24-stündige Vorbehandlung mit Interferon- β [IFN- β] nötig, um ein Caspase-8-Defekt aufzuheben¹⁸⁶. Wie in Abbildung 9a dargestellt, wurde nach Behandlung mit den MGMT-Hemmstoffen gefolgt von 50 μ M TMZ Apoptose nach 120 Stunden in verschiedenen Tumorzelltypen induziert. Eine Ausnahme ist die Glioblastomzelllinie GBP61, die nicht durch die Hemmstoffe gegen das methylierende Agens TMZ sensibilisiert wurde. Die Effektivität der Apoptoseinduktion war für die Inhibitoren O⁶BG und O⁶BTG sowie dem Glukose-Konjugat O⁶BTG-Glu in den anderen Tumorzelllinien identisch. Die Vorbehandlung mit O⁶BG-Glu führte nur zu einer vergleichbaren Apoptoseinduktion in der Melanomzelllinie D05. Die Zelllinien A375 und T98G zeigten eine verminderte Induktion des Zelltodes, die dennoch signifikant unterschiedlich zu der alleinigen TMZ-Behandlung war. Dagegen war in der Kolonkarzinomzelllinie HT29 kein signifikanter Unterschied durch die Vorbehandlung mit O⁶BG-Glu nachzuweisen.

DNA-Schäden induzieren abhängig vom Zelltyp verschiedene Arten des Zelltodes^{187,188}. Der Koloniebildungsassay (*colony formation assay*, [CFA]) integriert die Gesamtheit der Zelltodmechanismen und die Fähigkeit zur Proliferation¹⁸⁹. Zur Bestimmung, ob nach der Behandlung mit O⁶BG-Glu und TMZ andere Mechanismen des Zelltodes eine Rolle spielen, wurde der CFA für die Zelllinie HT29 durchgeführt. Die Ergebnisse des CFA waren mit den Resultaten der Apoptosemessung vergleichbar (Abb. 9b). Das Konjugat O⁶BG-Glu führte zu keiner Induktion des Zelltodes in den HT29 Zellen nach TMZ-Behandlung. Die anderen MGMT-Hemmstoffe sensibilisierten die Zellen in gleichem Ausmaß wie die Sub-G1-Analyse anzeigte; die Vorbehandlung mit O⁶BTG besaß den stärksten Effekt und die anderen Inhibitoren, O⁶BG und O⁶BTG-Glu, zeigten vergleichbare Resultate. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Experimenten die Messung der Apoptose mittels Sub-G1-Analyse als Indikator für den Zelltod festgelegt.

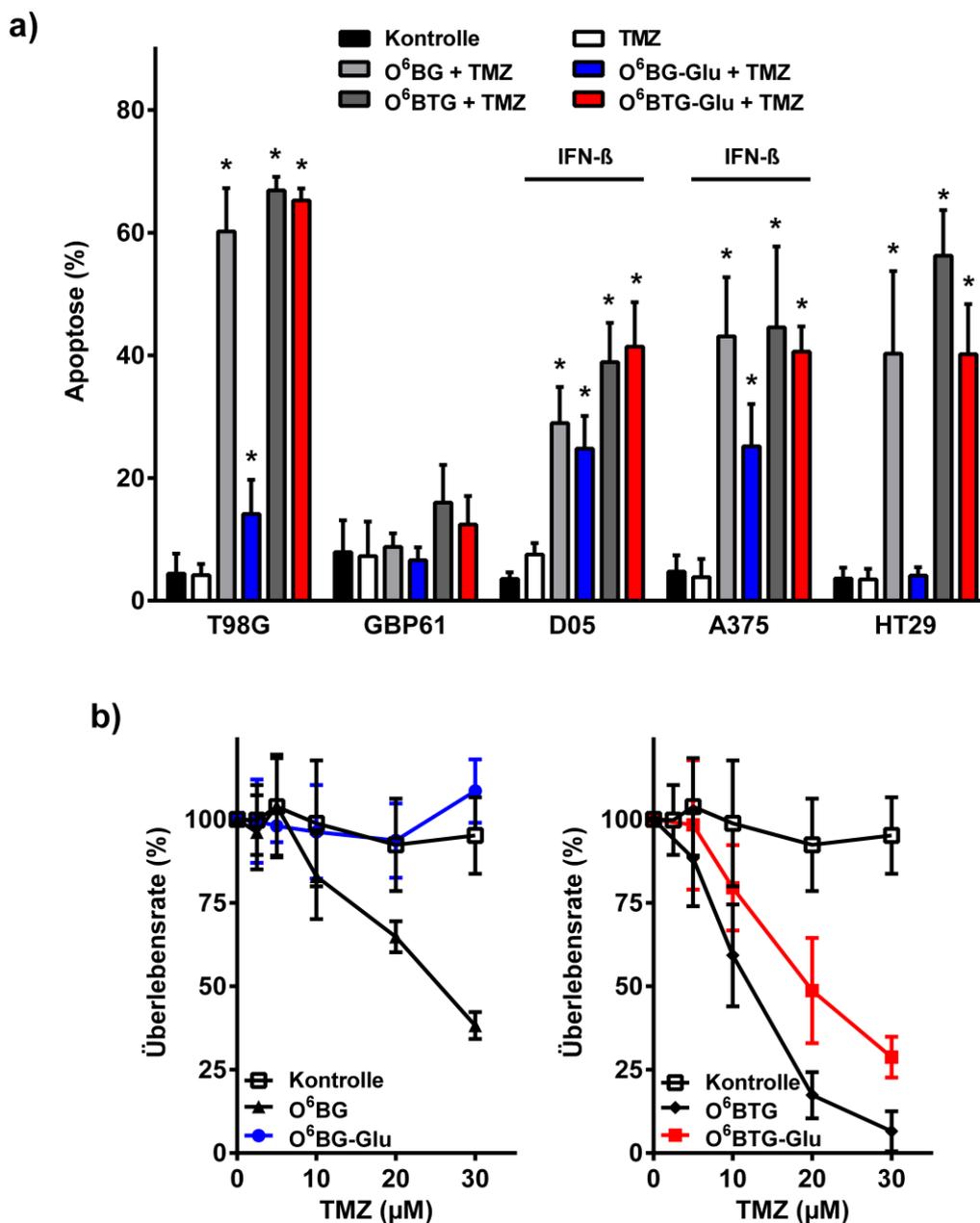


Abb. 9: Induktion des Zelltodes nach Kombinationsbehandlung aus Inhibitoren und TMZ
 a) Induktion der Apoptose in Tumorzelllinien nach 120 Stunden. Die Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG, 25 μM O⁶BG-Glu, 5 μM O⁶BTG oder 5 μM O⁶BTG-Glu für 4 Stunden inkubiert, gefolgt von einer Behandlung mit 50 μM TMZ. Bei den Melanomzelllinien D05 und A375 fand eine 24-stündige Vorbehandlung mit 300 IU/ml IFN- β statt. Die Apoptose wurde mittels Sub-G1-Analyse bestimmt.
 b) Identifikation der Koloniebildungsrate von HT29 Zellen mittels Koloniebildungsassay nach Behandlung mit den identischen Konzentration der MGMT-Hemmstoffe und den angezeigten TMZ-Konzentrationen. Die p-Werte (*, $p < 0,05$) beziehen sich jeweils auf die alleinige TMZ-Behandlung der jeweiligen Zelllinien.

Die Bildung von Doppelstrangbrüchen [DSB], die nach Behandlung mit O⁶MeG-induzierenden Agenzien entstehen, führen zur Induktion von Apoptose. Bei Verwendung höherer TMZ-Konzentrationen entstehen mehr DSB, deren Quantität mit der Induktion des Zelltods korreliert ¹⁹⁰. Um die Ursache der fehlenden Apoptoseinduktion für O⁶BG-Glu in einigen Zelllinien zu analysieren, wurde im nächsten Ansatz die Konzentration vom TMZ erhöht sowie ein weiteres methylierendes Agens, N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin [MNNG] für die Behandlung verwendet. Die Behandlung mit 10 µM O⁶BG und den erwähnten Genotoxinen führte schon bei geringen Konzentrationen zu einer Apoptoseinduktion, die trotz Erhöhung der Genotoxin-Konzentration nur geringfügig beeinflusst wurde. Im Gegensatz dazu fand beim Glukose-Konjugat mit Erhöhung der Dosis ein stetiger Anstieg der Apoptoseinduktion statt. Die Behandlung der Glioblastomzelllinie T98G mit 150 µM TMZ oder 2 µM MNNG führte nach 120 Stunden zu einer vergleichbaren Apoptoseausbeute wie nach der O⁶BG-Behandlung (Abb. 10a und b). Die erhöhte Apoptoseinduktion nach Konzentrationsteigerung des Alkylanz war jedoch ein zellspezifischer Effekt. Im Gegensatz zu den Zelllinien T98G und A375, die beide eine signifikante Steigerung der Apoptose nach Erhöhung der Dosis aufwiesen, zeigte die Darmzelllinie HT29 auch nach einer Behandlung mit 150 µM TMZ und dem Glukose-Konjugat O⁶BG-Glu keine eindeutige Induktion der Apoptose auf, obwohl in diesen Zellen O⁶BG wirksam war (Abb. 10c).

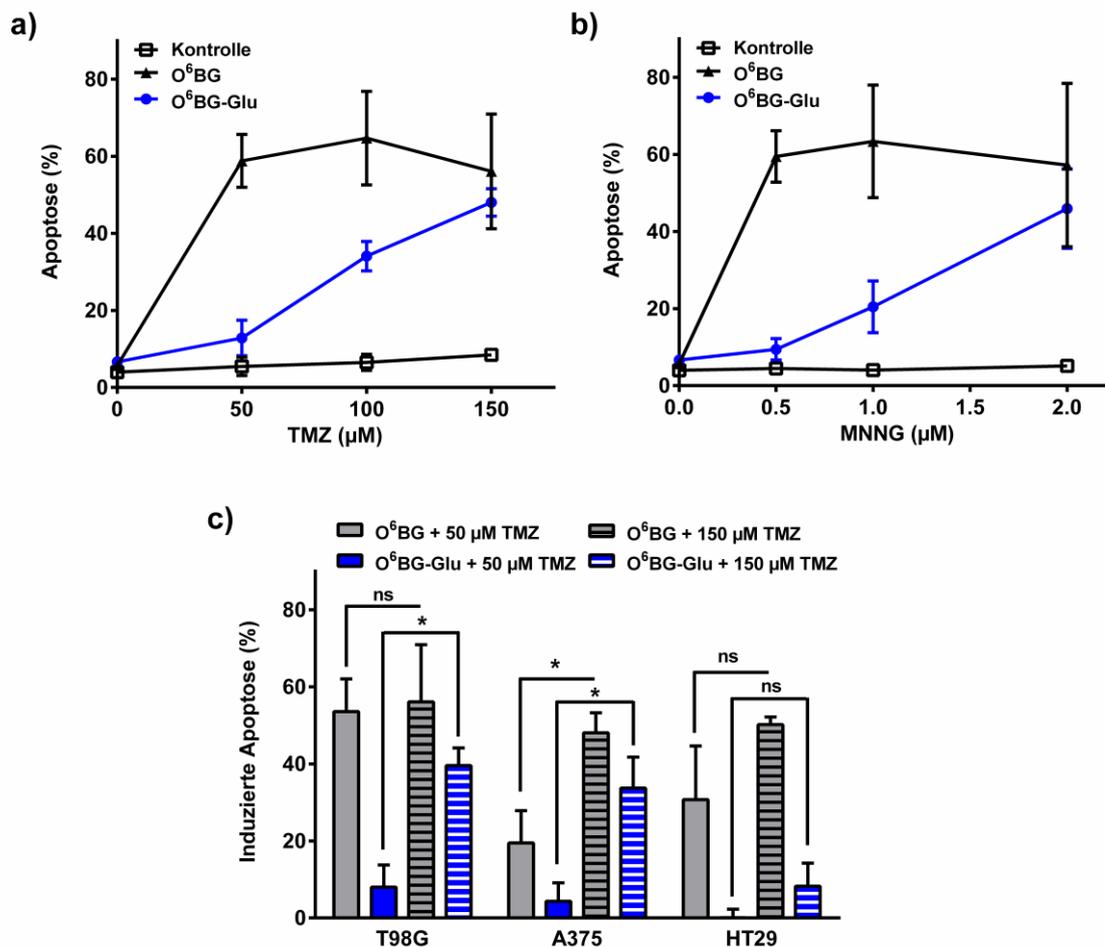


Abb. 10: Toxischer Effekt in Tumorzelllinien mit hohen Dosen von methylierenden Agenzien
 Apoptoseinduktion in Abhängigkeit der Konzentration: Behandlung von T98G Zellen mit 10 µM O⁶BG oder 25 µM O⁶BG-Glu für eine Inkubationsdauer von 4 Stunden und steigenden Dosen von TMZ (a) oder MNNG (b). Apoptoseinduktion in verschiedenen Tumorzelllinien nach Kombinationsbehandlung mit 10 µM O⁶BG oder 25 µM O⁶BG-Glu und einer geringen Dosis (50 µM) oder hohen Dosis (150 µM) TMZ. Die Apoptosemessung erfolgte nach 120 Stunden mittels Sub-G1-Analyse. Die p-Werte (*: p < 0,05; ns: nicht signifikant) beziehen sich jeweils auf die markierten Behandlungen.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse auf eine unterschiedliche Wirksamkeit der Glukose-Konjugate zur Sensibilisierung gegenüber methylierenden Agenzien hin. Das effektivere O⁶BTG-Glu Glukose-Konjugat sensibilisiert Tumorzellen im gleichen Ausmaß wie die Inhibitoren O⁶BG und O⁶BTG, wobei O⁶BG-Glu nur eine zellspezifische Induktion der Apoptose auslöst.

3.1.4. Sensibilisierung gegenüber chlorethylierenden Agenzien

Chlorethylierende Agenzien sind eine weitere Klasse von Chemotherapeutika, die in der Tumorthherapie eingesetzt werden, z.B. CCNU zur Behandlung von Glioblastomen. Die toxische Läsion O⁶-Chlorethylguanin [O⁶ClEtG], die über eine Bildung von *Interstrand-Crosslinks* [ICL] die Induktion von DSB bewirkt, wird ebenfalls vom MGMT-Protein erkannt und entfernt (1.1.3.1.). Dementsprechend sind MGMT-exprimierende Tumore auch gegenüber diesen Zytostatika resistent.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden verschiedene Tumorzelllinien mit 20 µM des chlorethylierenden Agens CCNU behandelt. Nach identischer Vorbehandlung mit den MGMT-Inhibitoren wurde die Induktion der Apoptose nach 96 Stunden analysiert. Die Mehrzahl der Tumorzelllinien zeigte eine starke Apoptoseinduktion nach Behandlung mit den MGMT-Hemmstoffen und CCNU (Abb. 11a). Eine Ausnahme war die Melanomzelllinie A375, die kaum zu sensibilisieren war. Im Gegensatz zu TMZ war die Behandlung mit CCNU plus dem Glukose-Konjugat O⁶BG-Glu effektiver; Zelllinien (T98G, HT29) die nur geringfügig gegenüber TMZ sensibilisiert wurden, zeigten eine signifikante Induktion der Apoptose. Trotzdem zeigten die Darmkrebszelllinien (HT29, Caco-2) eine erhöhte Resistenz gegenüber der Behandlung mit O⁶BG-Glu + CCNU; es wurde nicht das identische Apoptoseniveau wie in der Kombinationsbehandlung mit den MGMT-Hemmstoffen O⁶BG, O⁶BTG oder O⁶BTG-Glu und dem chlorethylierenden Zytostatika erreicht. Das Glukose-Konjugat O⁶BTG-Glu induzierte in allen Zelllinien ein vergleichbares Apoptoseniveau wie die Inhibitoren O⁶BG und O⁶BTG. Die Resultate der Apoptosemessung wurde ebenfalls für die Zelllinie HT29 mit dem CFA verifiziert (Abb. 11b). Die Rate der Koloniebildung war vergleichbar mit der Apoptoseinduktion; O⁶BG-Glu bewirkte im Vergleich zu den anderen Inhibitoren nur eine partielle Sensibilisierung der Zellen.

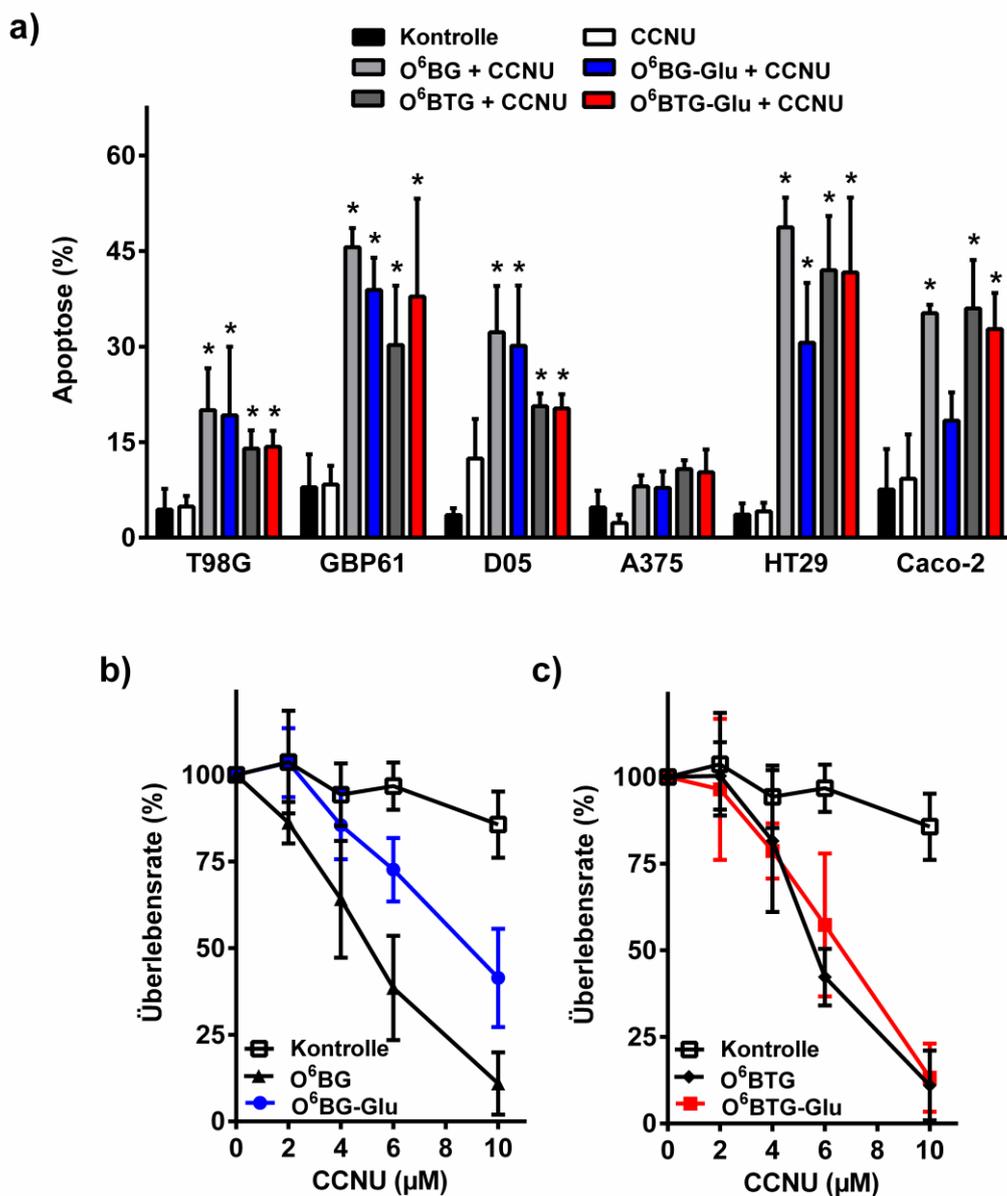


Abb. 8: Induktion des Zelltodes nach Kombinationsbehandlung mit Inhibitoren und CCNU
 a) Induktion der Apoptose in verschiedenen Tumorzelllinien nach 96 Stunden. Die Zellen wurden mit 10 μM O⁶BG, 25 μM O⁶BG-Glu, 5 μM O⁶BTG oder 5 μM O⁶BTG-Glu für 4 Stunden inkubiert, gefolgt von einer Behandlung mit 20 μM CCNU. Die Apoptose wurde mittels Sub-G1-Analyse ermittelt. b) Identifikation der Koloniebildungsrate von HT29 Zellen mittels Koloniebildungsassay nach Behandlung mit den identischen Konzentrationen der MGMT-Hemmstoffe und den angezeigten CCNU-Konzentrationen. Die p-Werte (*, $p < 0,05$) beziehen sich jeweils auf die alleinige CCNU-Behandlung der jeweiligen Zelllinie.

3.1.5. Hemmung der MGMT-Aktivität im Mausmodell

Tiermodelle sind ein aussagekräftiges Instrument zur Bestimmung der *in vivo*-Aktivität von neuen Krebsmedikamenten, besonders hinsichtlich deren Effizienz und Toxizität. Die Hausmaus (*Mus musculus*) ist eines der besten Modellsysteme für die Krebsforschung, u.a. wegen ihrer physiologischen und molekularen Ähnlichkeit zum Menschen¹⁹¹. Das am häufigste verwendete Modell ist das Xenograft-Modell, wo menschliche Tumore oder Zelllinien subkutan in athymische oder immundefiziente Mäuse zum Wachsen gebracht werden.

Zur Identifikation der Konzentration und des Applikationsweges, die eine maximale MGMT-Hemmung bewirkt, wurden in den ersten *in vivo*-Experimenten athymische Balb/c nude Mäuse, die ein menschliches A375-Melanom-Xenograft trugen, mit den Glukose-Konjugaten behandelt und anschließend die MGMT-Aktivität im Tumor und einigen Mausegeweben analysiert. In Abbildung 12a sind die MGMT-Aktivitäten des A375-Melanom-Xenografts und den unbehandelten Mausegeweben dargestellt. Eine intraperitoneale [i.p.] Applikation von 100 mg/kg O⁶BG-Glu oder O⁶BTG-Glu bewirkte nach 4 Stunden Exposition eine über 95 %-ige Hemmung des MGMT-Proteins im Tumor. Geringere Hemmstoff-Konzentrationen oder eine verringerte Inkubationszeit führten nur zu einer unvollständigen MGMT-Inaktivierung. Diese Bedingung der Behandlung reduzierte die MGMT-Aktivität im Tumor noch 24 Stunden nach der Applikation (Abb. 12b). Die intravenöse [i.v.] Verabreichung von 125 mg/kg O⁶BG-Glu oder 62,5 mg/kg O⁶BTG-Glu führte nach 2 Stunden nicht zur kompletten Hemmung des MGMT-Proteins im Tumor (Abb. 12c). In den anschließenden *in vivo*-Experimenten wurde eine 4-stündige Vorbehandlung mit 100 mg/kg intraperitonealer Injektion der Glukose-Konjugate als Behandlungsschema verwendet. Die Behandlung der Mäuse unter diesen Bedingungen führte nur zu einer partiellen MGMT-Hemmung im Nicht-Tumorgewebe (Abb. 12d und e), was für eine gewisse Selektivität der Wirkung auf den Tumor spricht. Im Gehirn fand mit den Glukose-Konjugaten kaum eine Inhibition der MGMT-Aktivität statt, dies liegt vermutlich an der Unfähigkeit der Konjugate die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Im Gegensatz zum Tumorgewebe ist die Wiedererlangung der MGMT-Aktivität im Normalgewebe nur mäßig.

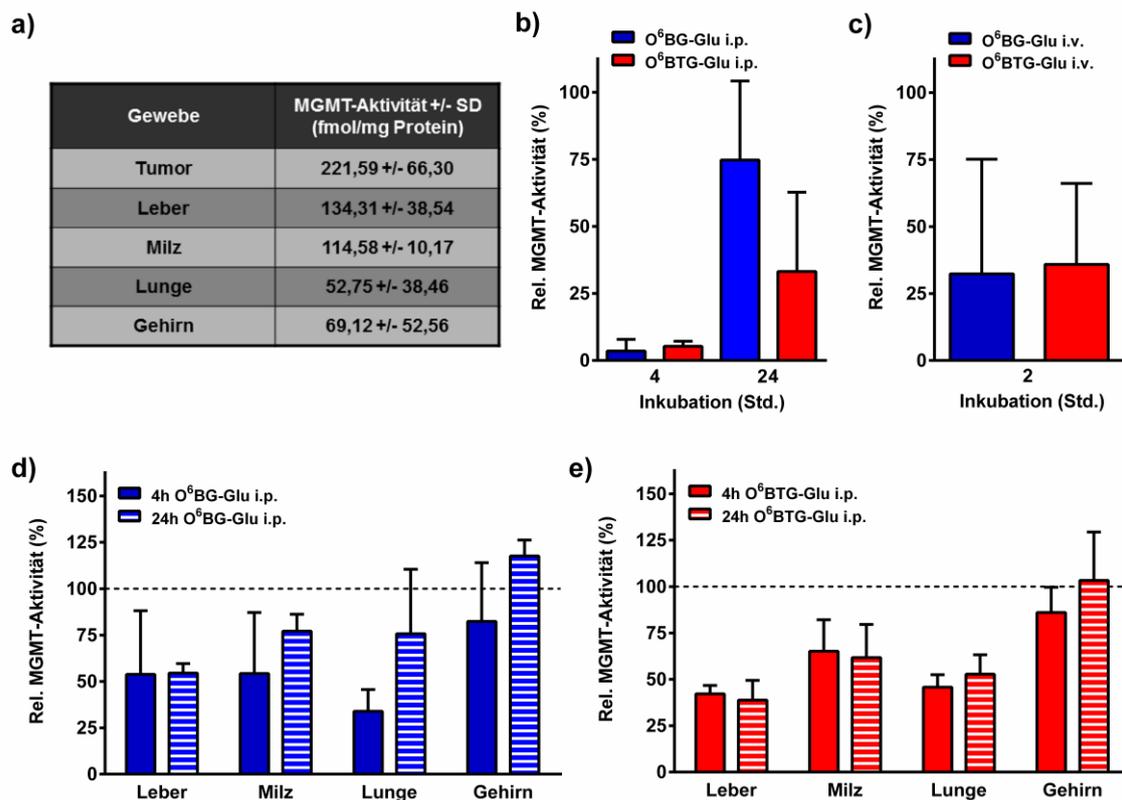


Abb. 12: MGMT-Hemmung im A375-Melanom-Xenograft-Modell nach Applikation der Glukose-Konjugate

a) Zusammenfassung der MGMT-Aktivität +/- Standardabweichung [SD] im Tumor und Geweben von unbehandelten A375-tragende Balb/c nude Mäusen. b) Intraperitoneale Applikation von 100 mg/kg O⁶BG-Glu oder O⁶BTG-Glu für 4 oder 24 Stunden und anschließender Bestimmung der MGMT-Aktivität im A375-Tumor. c) Intravenöse Applikation von 125 mg/kg O⁶BG-Glu oder 62,5 mg/kg O⁶BTG-Glu für 2 Stunden und anschließender Bestimmung der MGMT-Aktivität im A375-Tumor. MGMT-Aktivität in Mausgeweben nach 4 und 24-stündiger intraperitonealer Verabreichung von 100 mg/kg O⁶BG-Glu (d) oder O⁶BTG-Glu (e). Die MGMT-Aktivität wurde mittels MGMT-Assay bestimmt und relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben. Die Werte repräsentieren den Mittelwert +/- Standardfehler von mind. 3 Mäusen pro Gruppe.

3.1.6. Sensibilisierung gegenüber TMZ im Mausmodell

In den anschließenden Maus-Experimenten wurde die Wirksamkeit der Glukose-Konjugate gegenüber der Sensibilisierung mit Temozolomid untersucht. Dafür wurde das Tumorwachstum über die Zeit quantifiziert und mit den Inhibitoren O⁶BG und O⁶BTG verglichen. Als Behandlungsschema für die beiden nicht-konjugierten Inhibitoren wurde eine intraperitoneale Verabreichung mit 20 mg/kg durchgeführt: Dies führte im gleichen Xenograft-Modell zu einer kompletten MGMT-Hemmung im Tumor, ohne selbst toxisch zu wirken¹⁹². Der Verlust des Körpergewichtes der Mäuse diente als Indikator für die mögliche Toxizität.

Die alleinige Behandlung A375-tragender nude-Mäuse mit 150 mg/kg TMZ oder den jeweiligen MGMT-Hemmstoffen beeinflusste kaum das Tumorwachstums und wirkte nicht toxisch auf den Mausorganismus (Daten der alleinigen Inhibitor-Applikation sind im Anhang Abb. 34 zusammengefasst). In der Kombinationsbehandlung mit TMZ führten beide Glukose-Konjugate zu einer deutlichen Reduktion des Tumorwachstums, die identisch zu den beiden Inhibitoren O⁶BG und O⁶BTG war (Abb. 13a und b). Die geringe Toxizität war unter diesen Bedingungen für alle MGMT-Inhibitoren vergleichbar (Abb. 13c).

Im Anschluss wurde die TMZ-Konzentration für O⁶BTG und O⁶BTG-Glu auf 180 mg/kg erhöht und dessen Auswirkung auf die Toxizität analysiert. Die Kombinationsbehandlung mit dem Glukose-Konjugat zeigte unter den Bedingungen der intraperitonealen Verabreichung eine höhere Toxizität als der nicht-konjugierte MGMT-Hemmstoff O⁶BTG (Abb. 13d).

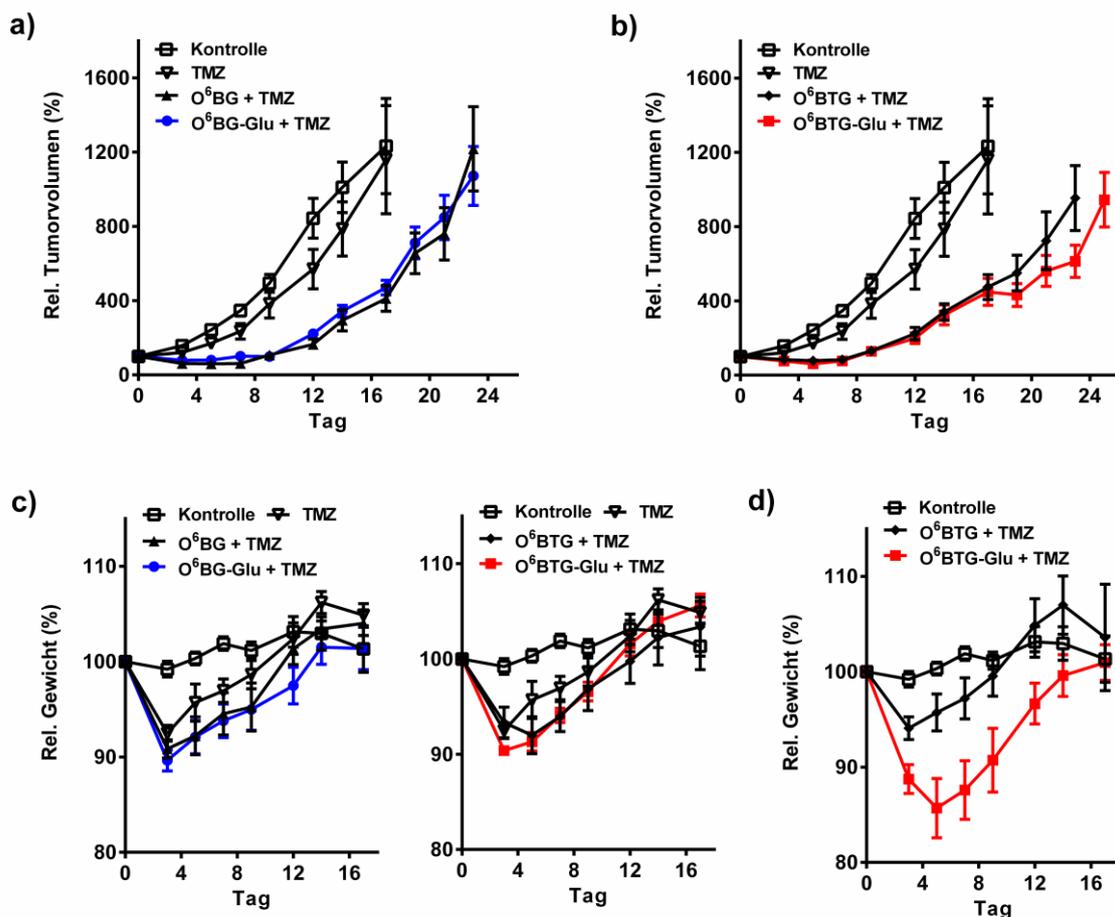


Abb. 13: Wachstumskurve und Toxizität des A375-Xenograft-Modell nach Kombinationsbehandlung mit MGMT-Hemmstoffen und dem methylierenden Agens TMZ
 Intraperitoneale Applikation von 30 % DMSO in 0,9 % NaCl und PEG (□,▽), 20 mg/kg O⁶BG (▲), 100 mg/kg O⁶BG-Glu (●), 20 mg/kg O⁶BTG (◆) oder 100 mg/kg O⁶BTG-Glu (■) für eine Inkubationsdauer von 4 Stunden und anschließender Behandlung mit 150 mg/kg TMZ. Bestimmung des relativen Tumorwachstums (a und b) und des Körpergewichtes (c) über die Zeit. d) Ermittlung des relativen Körpergewichtes über die Zeit. Intraperitoneale Applikation von 30 % DMSO in 0,9 % NaCl und PEG (□) (ohne folgende Alkylanz-Injektion), 20 mg/kg O⁶BTG (◆) oder 100 mg/kg O⁶BTG-Glu (■) für eine Inkubationsdauer von 4 Stunden und anschließender Behandlung mit 180 mg/kg TMZ. Die Werte repräsentieren den Mittelwert +/- Standardfehler von mind. 6 Mäusen pro Gruppe und beziehen sich jeweils auf den Tag 0 (Tag der Behandlung).

Insgesamt bestätigen die Resultate eine Wirksamkeit der Glukose-Konjugate im *in-vivo*-Mausmodell gegenüber der Sensibilisierung mit TMZ. Jedoch erforderte die komplette Hemmung der MGMT-Aktivität im Tumor eine ca. 2,5-fach höhere Konzentration der Glukose-Konjugate als die Behandlung mit den Inhibitoren O⁶BG und O⁶BTG; dies bewirkte eine Verstärkung der Toxizität bei Verabreichung höherer TMZ-Konzentrationen.

3.2. Aufnahmemechanismus der Glukose-Konjugate

3.2.1. Untersuchungen der Aufnahme für das Glukose-Konjugat O⁶BG-Glu

Die Zellmembran, bestehend aus einer Lipiddoppelschicht und Proteinen, isoliert das Zellinnere von ihrer Umgebung. Sie funktioniert als selektiv permeable Membran, die einige Moleküle in die Zelle transportiert (z.B. Nährstoffe) und andere wieder ausschleusst (z.B. Abfallprodukte). Der Mechanismus der Aufnahme ist vom Molekül abhängig. Hydrophobe Substanzen (die Mehrheit der Medikamente) durchqueren die Zellmembran durch einfache Diffusion; entlang ihres Konzentrationsgradienten. Dagegen werden hydrophile Substanzen von speziellen Membranproteinen in die Zelle transportiert. Diese Aufnahmemechanismen benötigen die Beteiligung von Transportern, Kanälen oder Rezeptoren¹⁹³. Targeting-Strategien nutzen die Aufnahme über Transporter oder Rezeptoren aus, die in Krebszellen überexprimiert sind, um eine bevorzugte Akkumulation im Tumorgewebe anzustreben.

Zur Bestimmung des Mechanismus, der für die Aufnahme der Glukose-Konjugate verantwortlich ist, stand zu Beginn der Studie nur eine indirekte Messmethode zur Verfügung: die Hemmung der MGMT-Aktivität. Dabei wurde angenommen, dass die Aufnahme des Inhibitors mit der Hemmung von MGMT korreliert. Die Untersuchungen begannen mit dem Glukose-Konjugat O⁶BG-Glu, da dieses am Beginn der Studie in ausreichender Menge zur Verfügung stand.

Zunächst wurde ein Experiment durchgeführt, das die Aufnahme über passive Diffusion ausschließt (Bestätigung der Ergebnisse in Abb. 5) und stattdessen auf eine Beteiligung von Transportern hinweist. Es erfolgte eine Behandlung der T98G Zelllinie mit O⁶BG oder O⁶BG-Glu bei einer niedrigen Temperatur von 4°C für 30 Minuten (Aufnahme nur über passive Diffusion). Im Anschluss der Vorinkubation und Entfernung der im Medium befindlichen Hemmstoffe fand ein Austausch der Temperaturumgebung für 90 Minuten statt. Dies diente zusätzlich zur Unterscheidung von Rezeptor- (Aufnahme bei Überführung zu 37°C) oder Transporter-vermittelter Aufnahme (keine Aufnahme beim Temperaturwechsel). Der Inhibitor O⁶BG inhibiert das MGMT-Protein bei einer gleichbleibenden Temperatur von 4°C oder anschließender Überführung zu 37°C (Abb. 14). Dies beruht auf der zellpermeablen Eigenschaft des Inhibitors. Im Gegensatz dazu zeigte das Glukose-Konjugat keine signifikante Hemmung des Zielproteins nachdem der gesamte Transport der Zelle blockiert wurde (4°C). Dies bestätigt die impermeable Eigenschaft des Glukose-Konjugates und der Notwendigkeit eines Aufnahmemechanismus. Des Weiteren konnte eine Beteiligung der

Rezeptor-vermittelten Aufnahme weitgehend ausgeschlossen werden, da eine anschließende Überführung der Zellen von 4°C zu 37°C kaum einen Effekt auf die Inhibition der MGMT-Aktivität aufwies. Als Positivkontrolle (PK) der Rezeptor-vermittelten Aufnahme diente ein bakterielles Toxin und dessen Effekt auf die Chromatinstruktur der Zelle ¹⁹⁴ (Anhang Abb. 35).

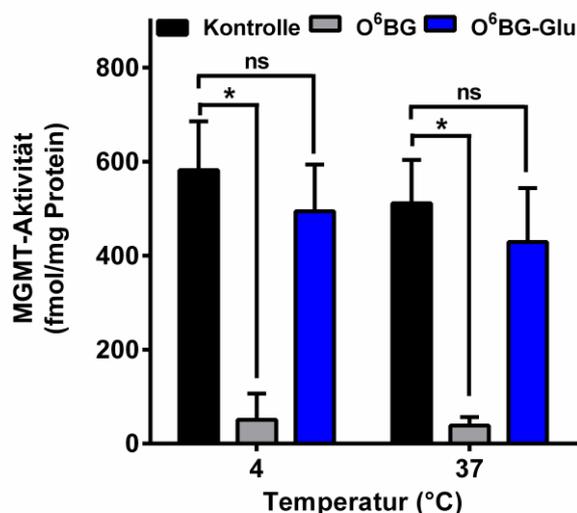


Abb. 14: Untersuchung der Transporter-vermittelten Aufnahme des Konjugates O⁶BG-Glu
Die Inhibitoren O⁶BG (10 µM) und O⁶BG-Glu (25 µM) wurden für 30 Minuten bei 4°C vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere 90-minütige Inkubation bei 4°C oder die Überführung auf 37°C. Die MGMT-Aktivität wurde mittels MGMT-Assay bestimmt. Details siehe Text. Die p-Werte (*: p < 0,05; ns: nicht signifikant) beziehen sich jeweils auf die markierten Behandlungen.

Tumorzellen weisen häufig eine erhöhte glykolytische Aktivität auf (Warburg-Effekt) und zeigen eine erhöhte Expression von Glukosetransportern. Die Glukoseaufnahme erfolgt durch die Glukosetransporter *facilitative glucose transporters* [GLUT] oder *sodium dependent glucose transporter* [SGLT] (1.4.1.). Die folgenden Experimente zur Identifizierung des Aufnahmemechanismus wurden in einem speziellen Transportpuffer [TP] " *Modified Hank's balanced salt solution*" durchgeführt ¹⁷⁷. Dies bietet eine schnelle und effektive Änderung der Pufferbedingungen (Glukose, NaCl, usw.), die für Transport-Untersuchungen zwingend erforderlich sind. Die Effektivität der MGMT-Hemmung durch das Glukose-Konjugat O⁶BG-Glu war im Medium und TP identisch (Anhang Abb. 36). Zur Überprüfung der Aufnahme des Glukose-Konjugates O⁶BG-Glu durch einen der Glukosetransporter wurden zwei Strategien verfolgt. Erstens wurde der Einfluss von verschiedenen Glukosekonzentrationen im Inkubationspuffer (Kompetitionsassay) auf die Aufnahme von O⁶BG-Glu analysiert. Zweitens wurde die Hemmung des MGMT-Proteins in An- oder Abwesenheit von Inhibitoren der Glukosetransporter untersucht. Die Reduzierung der

Glukosekonzentration auf das 250-fache (auf 0,1 mM) zeigte über einen Zeitraum von 60 Minuten keinen Effekt hinsichtlich der MGMT-Hemmung (Abb. 15a). Nach einer Inkubationsdauer von 15 Minuten führte die alleinige Präsenz der GLUT-Inhibitoren [GLUT_i] Cytochalasin B (10 μM) oder Phloretin (500 μM) sowie der SGLT-Inhibitoren [SGLT_i] Sergliflozin A (100 μM) oder Phlorizin (100 μM) zu keiner signifikanten Änderung in der MGMT-Hemmung durch das Glukose-Konjugat O⁶BG-Glu (25 μM). Im Gegensatz dazu bewirkte die Anwesenheit von GLUT und SGLT-Inhibitoren (Phloretin und Phlorizin) entgegen der Erwartung eine schnellere Inaktivierung von MGMT durch die Behandlung mit O⁶BG-Glu; die bei der Zugabe von allen Glukosetransporter-Inhibitoren sogar signifikant unterschiedlich war (Abb. 15b). Die Aufnahmehemmung von ³H-desoxy-Glukose [³H-dGlu] oder ¹⁴C-alpha-Methyl-Glucoopyranosid [¹⁴C-AMG] durch die jeweiligen Inhibitoren wurde in unabhängigen Experimenten bestätigt (Anhang Abb. 37).

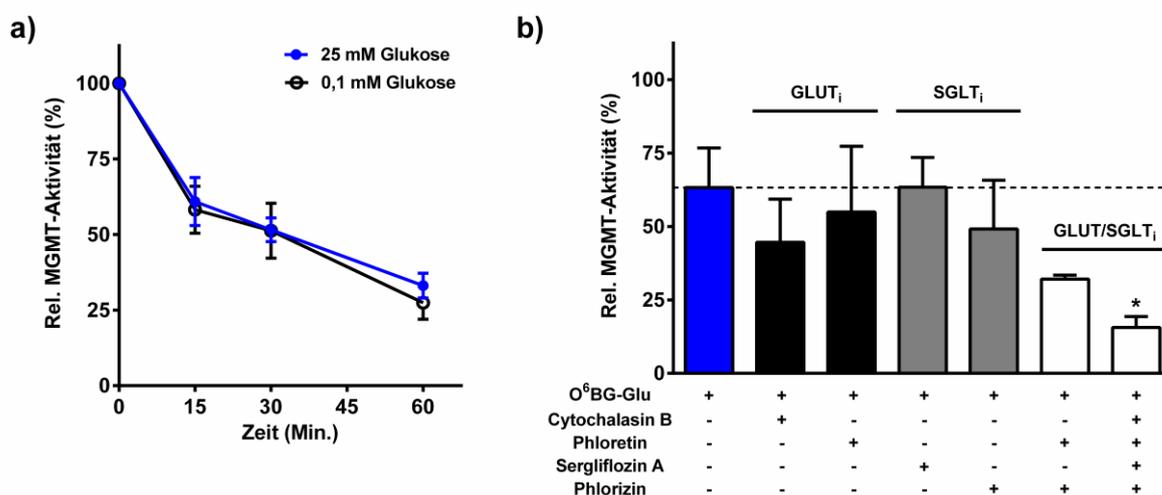


Abb. 15: Untersuchung der Aufnahme von O⁶BG-Glu durch Glukosetransporter in T98G Zellen
a) MGMT-Hemmung nach angezeigten Inkubationszeiten mit 25 μM O⁶BG-Glu in Transport-Puffer mit hoher (25 mM) oder niedriger (0,1 mM) Glukosekonzentration. b) Bestimmung der MGMT-Aktivität nach Behandlung mit 25 μM O⁶BG-Glu in An- (+) oder Abwesenheit (-) von Inhibitoren der Glukosetransporter. Details siehe Text. Die MGMT-Aktivität wurde mittels MGMT-Assay bestimmt und relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben. Die p-Werte (*, p < 0.05) beziehen sich auf die alleinige Behandlung mit O⁶BG-Glu.

Zusammenfassend weisen die bisher erhaltenen Daten (entgegen der Erwartungen) auf keine Beteiligung von Glukosetransportern bei der Aufnahme von O⁶BG-Glu hin. Jedoch wurde bisher nur eine indirekte Messmethode (MGMT-Assay) für die Aufnahme-Experimente verwendet, die eine Beurteilung aufgrund der erforderlichen langen Inkubationszeiten und den hohen eingesetzten Inhibitor-Konzentrationen erschwert. Der Einsatz von radioaktiv-markierten Glukose-Konjugaten (siehe unten) für die Untersuchung der Aufnahme reduziert mögliche Fehlerquellen und ist deutlich aussagekräftiger.

3.2.2. Transportuntersuchungen des radioaktiv-markierten Konjugats O⁶BTG-Glu

Radioaktive Moleküle finden häufig Verwendung in der Entwicklung und Erforschung neuer Pharmazeutika. In nicht-klinischen Studien (Tiermodelle) liefern sie wertvolle Information über die Aufnahme, Verteilung, Verstoffwechslung und Ausscheidung sowie den toxischen Eigenschaften der Substanz. Zusätzlich werden radioaktive Moleküle in einer Vielzahl von weiteren Forschungsbereichen (*in vitro*) verwendet: Aufnahme in Zellen, Bindung an Rezeptoren, DNA-Replikation, Zellzyklus-Untersuchungen und Inhibition von Transportern. Am häufigsten werden die Radioisotope C¹⁴ und H³ verwendet, wobei die Markierung mit Tritium einfacher ist, weshalb viele Substrate für *in vitro*-Analysen eine Tritium-Markierung tragen¹⁹⁵. Das Glukose-Konjugat O⁶BTG-Glu wurde mittels der Tritium-Gasaustausch-Methode, die häufig für Pharmazeutika oder komplexe Moleküle verwendet wird, markiert [³H-O⁶BTG-Glu]. Die Position der Tritium-Gruppe(n) (Glukose, Linker oder Hemmstoff) war nach der Synthese nicht bekannt (Abb. 16a). Der Metabolismus des Glukose-Konjugates in der Zelle ist unbekannt. Jedoch könnte das MGMT-Protein einen Effekt auf die intrazelluläre Akkumulation des ³H-O⁶BTG-Glu ausüben, vorausgesetzt ein Teil der Tritium-Markierung befindet sich in der Bromthiophengruppe. Dies würde Einfluss auf die Ergebnisse der Aufnahme-Studien besitzen, in denen verschiedene Zelllinien mit unterschiedlichen MGMT-Status untersucht werden.

Um diese Annahme zu überprüfen und gleichzeitig einen Hinweis zu erlangen, ob das radioaktiv-markierte Glukose-Konjugat in der Lage ist MGMT zu inhibieren, wurde die Radioaktivität in An- oder Abwesenheit des MGMT-Proteins in der Caco-2 Zelllinie analysiert. Die Akkumulation von ³H-O⁶BTG-Glu war nach der Inhibition des endogenen MGMT (durch eine 30-minütige Vorinkubation mit 10 µM O⁶BTG) signifikant geringer als in den MGMT-exprimierenden Caco-2 Zellen (Abb. 16b). Dies bestätigt die Tritium-Markierung der Bromthiophengruppe sowie die Fähigkeit der MGMT-Hemmung des radioaktiv-markierten Glukose-Konjugates. In den folgenden Aufnahme-Experimenten wurde immer eine Vorinkubation mit 10 µM O⁶BTG für 30 Minuten durchgeführt. Dies diente dem besseren Vergleich der Aufnahme zwischen den Zelllinien.

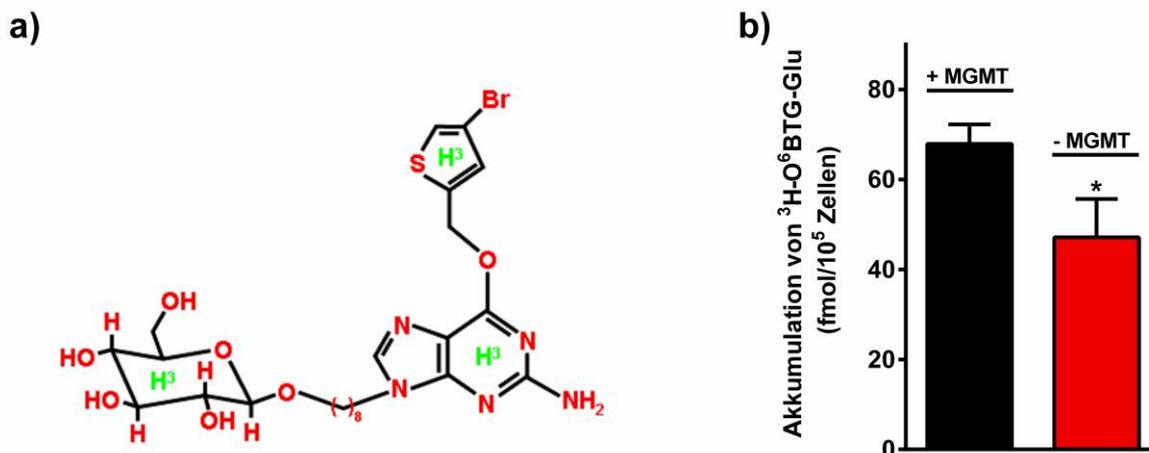


Abb. 16: Charakterisierung des radioaktiv-markierten Glukose-Konjugats $\text{H}^3\text{-O}^6\text{BTG-Glu}$
 a) Strukturformel von $^3\text{H-O}^6\text{BTG-Glu}$. Die verschiedenen Tritiumgruppen (H^3) weisen auf eine unbekannte Position der Tritium-Markierung hin. b) Einfluss der MGMT-Menge auf die intrazelluläre Menge an $^3\text{H-O}^6\text{BTG-Glu}$. Caco-2 Zellen wurden in Anwesenheit, d.h. kein endogenes MGMT-Protein in den Caco-2 Zellen (- MGMT), oder Abwesenheit (+ MGMT) von $10\ \mu\text{M}$ O^6BTG für 30 Minuten in Transportpuffer inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von $31,25\ \text{pM}$ $^3\text{H-O}^6\text{BTG-Glu}$ für 2 Minuten. Die Zellen wurden lysiert, die Radioaktivität mittels Szintillationszähler detektiert und die Aufnahme pro Zellen kalkuliert.

Die Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 wurde als Ausgangszelllinie für die Transportuntersuchungen verwendet. Aufgrund der Expression von vielen Transportern dient diese Zelllinie als aussagekräftiges *in vitro*-System bei Transportstudien^{147,196-198}. Als erstes wurde in diesen Zellen die Bedingungen (Konzentration und Inkubationszeit) für die anschließenden Aufnahmestudien bestimmt. Caco-2 Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen des Tritium-markierten $\text{O}^6\text{BTG-Glu}$ (bei gleichbleibender Inkubationszeit) oder verlängerten Inkubationszeiten (bei identischer Konzentration) inkubiert. Diese Experimente fanden in Transportpuffer mit $1\ \text{mM}$ Glukosekonzentration [Standard-TP] statt. Anschließend wurde die Aufnahme des radioaktiv-markierten $\text{O}^6\text{BTG-Glu}$ pro Zellen oder pro Zellen und Zeit kalkuliert. Die Aufnahme des Tritium-markierten Glukose-Konjugats stieg mit der Konzentration und der Dauer der Inkubationszeit fortlaufend an. Bei einer kurzen Inkubationszeit von 2 Minuten wurde für einen Konzentrationsbereich bis $62,5\ \text{pM}$ $^3\text{H-O}^6\text{BTG-Glu}$ keine Sättigung der Aufnahme erreicht (Abb. 17a und b). Die Aufnahme des radioaktiven Glukose-Konjugats war im Bereich von 0 bis 2 Minuten sehr hoch und wurde über die Zeit geringer; trotzdem nahm die Akkumulation des Glukose-Konjugates stetig zu (Abb. 17c) (kalkuliert auf die Gesamtzellzahl). Dennoch war die Aufnahme pro Zelle und Zeit bei langen Inkubationszeiten deutlicher geringer als bei kurzen Inkubationszeiten (Abb. 17d) (kalkuliert auf die Aufnahme pro Minute bei unterschiedlichen Inkubationszeiten); dies deutet auf eine Sättigung der $^3\text{H-O}^6\text{BTG-Glu}$ -Aufnahme hin. Für die folgenden Aufnahme-Experimente wurde eine Konzentration von $31,25\ \text{pM}$ $^3\text{H-O}^6\text{BTG-Glu}$ ($500\ \text{nCi}$)

und eine Inkubationszeit von 2 Minuten festgelegt; diese Werte liegen nicht im Sättigungsbereich.

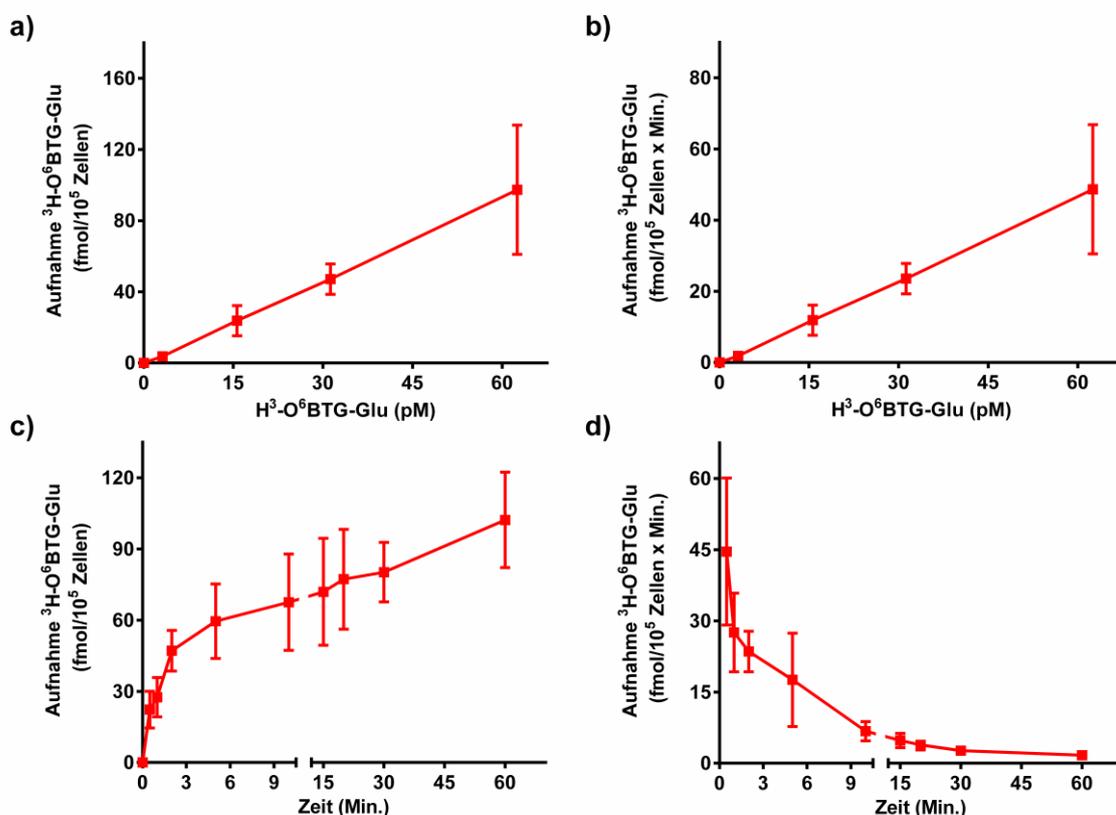


Abb. 17: Aufnahme des radioaktiv-markierten Konjugats $^3\text{H-O}^6\text{BTG-Glu}$ in Caco-2 Zellen
Aufnahme in Abhängigkeit der Konzentration. Die Zellen wurden für 2 Minuten mit den dargestellten Konzentrationen von $^3\text{H-O}^6\text{BTG-Glu}$ und $1 \mu\text{M}$ kaltem $\text{O}^6\text{BTG-Glu}$ in 1 mM Glukose-Transportpuffer inkubiert. Anschließend wurde die Radioaktivität bestimmt und die Aufnahme pro Zellen (a) oder pro Zellen und Minute (b) kalkuliert. Aufnahme in Abhängigkeit der Zeit. Behandlung der Zellen mit $31,25 \text{ pM}$ $^3\text{H-O}^6\text{BTG-Glu}$ und $1 \mu\text{M}$ kaltem $\text{O}^6\text{BTG-Glu}$ in 1 mM Glukose-Transportpuffer für die angezeigten Inkubationszeiten. Anschließend wurde die Radioaktivität mittels Szintillationszähler detektiert und die Aufnahme pro Zellen (c) oder pro Zellen und Minute (d) kalkuliert.

In den folgenden Experimenten sollte die Beteiligung der Glukosetransporter GLUT und SGLT auf die Aufnahme des Glukose-Konjugates analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde die Aufnahme von $^3\text{H-O}^6\text{BTG-Glu}$ bei simultaner Inkubation mit den GLUT- und SGLT-Inhibitoren (identisch mit dem Experiment in Abb.15) sowie Veränderungen der TP-Bedingungen analysiert. Neben der Erhöhung der Glukosekonzentration im TP (von 1 mM [Standard-TP] auf 25 mM [Glukose-TP], d.h. eine Veränderung des Verhältnisses Glukose-Konjugat zu Glukose von $1: 7,68 \cdot 10^8$) wurden ebenfalls andere Komponenten des TP verändert (die NaCl-Konzentration wurde auf $1/10$ reduziert [red. NaCl-TP] oder komplett durch identische Konzentrationen von Cholinchlorid [Cholinchlorid-TP] oder KCl [KCl-TP] ersetzt); dies diente der Identifikation von Natrium-abhängigen Transportern für die

Aufnahme des Zucker-Konjugates. Eine Veränderung der Glukose- und Natriumkonzentration im TP beeinflusste nicht signifikant die Aufnahme des Glukose-Konjugates. Nur in der Anwesenheit einer höheren Kaliumkonzentration war eine geringe Erhöhung der $^3\text{H-O}^6\text{BTG-Glu}$ -Aufnahme zu messen (Abb. 18a). Identisch zu den MGMT-Assay Ergebnissen in Abbildung 15 war in der Anwesenheit der GLUT_i (10 μM Cytochalasin B [Cyt B]/500 μM Phloretin) oder SGLT_i (100 μM Sergliflozin A [Sergli A]/100 μM Phlorizin) keine signifikante Reduktion der Aufnahme des Glukose-Konjugates nachzuweisen.

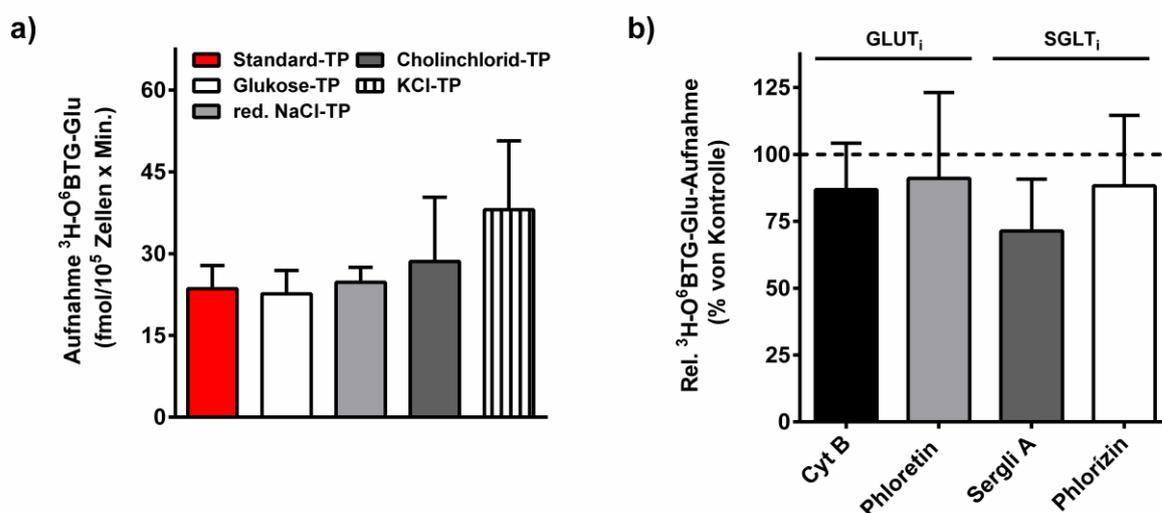


Abb. 18: Aufnahme von $^3\text{H-O}^6\text{BTG-Glu}$ durch Glukosetransporter in Caco-2 Zellen

Die Zellen wurden für 2 Minuten mit 31,25 pM $^3\text{H-O}^6\text{BTG-Glu}$ und 1 μM kaltem $\text{O}^6\text{BTG-Glu}$ in verschiedenen TP (a) oder in Anwesenheit von GLUT_i (10 μM Cyt B/500 μM Phloretin) oder SGLT_i (100 μM Sergli A/500 μM Phlorizin) in Standard-TP inkubiert (b). Anschließend wurde die Radioaktivität mittels Szintillationszähler detektiert und die Aufnahme pro Zellen und Minute (a) oder relativ zur Kontrolle (Abwesenheit von Inhibitoren) (b) kalkuliert.

Tumorzellen weisen im Gegensatz zu nicht-transformierten Zellen eine erhöhte glykolytische Aktivität und Expression von Glukosetransportern auf. Deswegen erfolgt die Glukoseaufnahme in Tumorzellen schneller und in höherem Ausmaß. Um diese Tatsache für die in diesem Projekt verwendeten Zelllinien zu überprüfen und des Weiteren die zellspezifische Aufnahme des Glukose-Konjugates zu analysieren, wurden einige Tumorzelllinien sowie zwei Fibroblastenzelllinien hinsichtlich ihrer Glukose- und $^3\text{H-O}^6\text{BTG-Glu}$ -Aufnahme untersucht. Die Inkubation von 100 nCi $^3\text{H-d-Glu}$ (2,5 pM) erfolgte in einem speziellen Saccharose-TP (100 μM Glukose, 10 mM Saccharose), wohingegen die Aufnahme von 500 nCi $^3\text{H-O}^6\text{BTG-Glu}$ (31,25 pM) weiter im Standard-TP erfolgte. Die Aufnahme beider Substanzen wurde nach einer Inkubationszeit von 2 oder 30 Minuten analysiert. Die Resultate in Abbildung 19 zeigten für das Glukose-Konjugat nur

eine geringe Selektivität für die Tumorzellen. Die Aufnahme war für beide Zeitpunkte in den Tumorzelllinien und den Fibroblastenzelllinien VH10-tert und NIH-3T3 vergleichbar (die Werte der rel. Aufnahme zur VH10-tert Zelllinie lagen zwischen 0,6 und 1,5). Des Weiteren war für alle analysierten Zelllinien eine sehr hohe Aufnahme nach 2 Minuten (zwischen 20 und 45 fmol/10⁵ Zellen) nachzuweisen, die über die Zeit kaum Anstieg; mit Ausnahme der Caco-2 Zelllinie (Abb. 19a und b). Im Gegensatz dazu war die Aufnahme der Glukose in den Tumorzellen höher als in den Fibroblastenzellen; nach 2 Minuten war die Akkumulation der ³H-d-Glu 5 bis 9-fach höher als in den VH10-tert Zellen. In allen Zellen stieg die Glukoseaufnahme über die Zeit deutlich an, wobei die Fibroblastenzelllinien auch nach 30 Minuten nicht das Glukoseniveau der Tumorzellen erlangten (Abb. 19c und d).

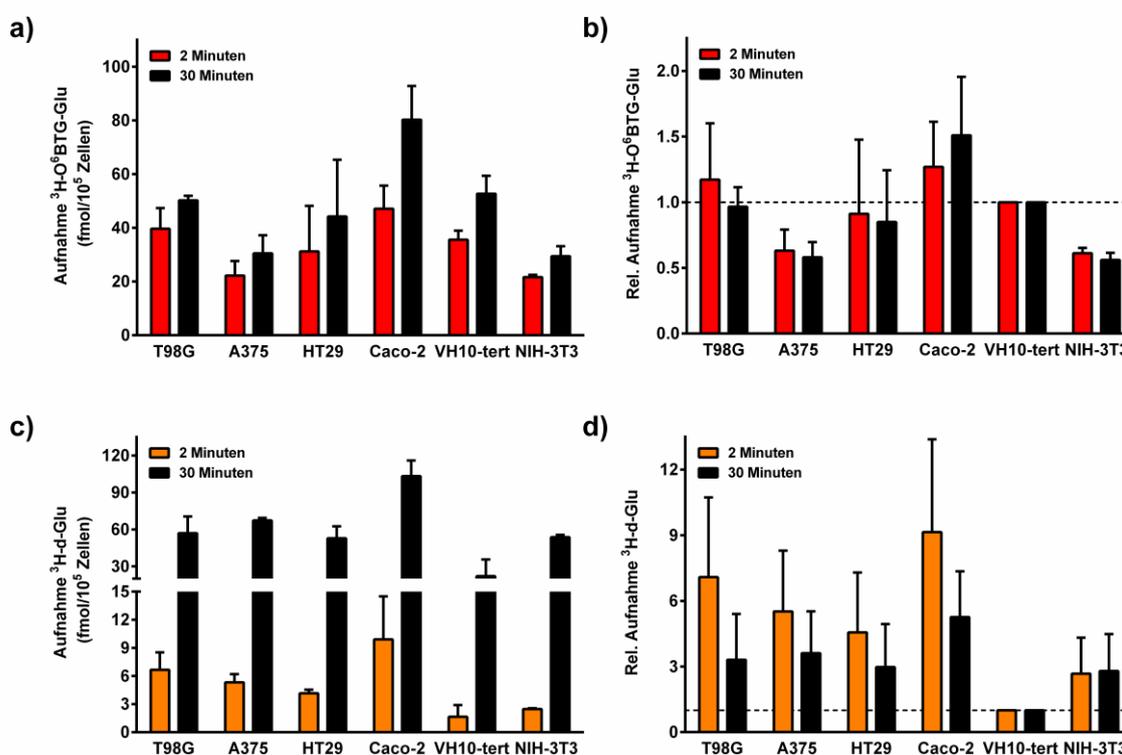


Abb. 19: Aufnahme von ³H-O⁶BTG-Glu und ³H-d-Glu in verschiedenen Zelllinien
Die Zellen wurden für 2 oder 30 Minuten mit 31,25 pM ³H-O⁶BTG-Glu und 1 µM kaltem O⁶BTG-Glu in Standard-TP (a und b) oder 2,5 pM ³H-d-Glu in Saccharose-TP (c und d) inkubiert. Anschließend wurde die Radioaktivität mittels Szintillationszähler detektiert und die Aufnahme pro Zellen (a und c) oder relativ zur VH10-tert Zelllinie (b und d) kalkuliert.

Zusammenfassend zeigten die erzielten Resultate der Aufnahmestudien, dass keine Beteiligung von Glukosetransportern für die Aufnahme von $^3\text{H-O}^6\text{BTG-Glu}$ (radioaktive Aufnahmestudien, Abb. 18 und 19) oder $\text{O}^6\text{BG-Glu}$ (indirekte Aufnahmestudien durch Bestimmung der MGMT-Aktivität, Abb. 15) involviert ist. Damit ist ein Targeting über eine selektive Aufnahme durch Glukosetransporter von $\text{O}^6\text{BG-Glu}$ und $\text{O}^6\text{BTG-Glu}$ nicht möglich.

Moleküle gelangen auf unterschiedliche Art und Weise (abhängig von den Eigenschaften) in die Zelle. Da eine Aufnahme der Glukose-Konjugate über passive Diffusion (Abb. 5), Rezeptoren (Abb. 14) oder Glukosetransportern (Abb. 15,18 und 19) ausgeschlossen wurde, blieb die Frage nach dem Aufnahmemechanismus bzw. Involvierung anderer Transporter offen. Die Inaktivierung des Zielproteins MGMT in den Zellen (Abb. 7) beweist eindeutig ein durchqueren der Zellmembran von den Glukose-Konjugaten (bestätigt durch den sensitiven MGMT-Assay). **Wie gelangen dann aber die Glukose-Konjugate in die Zellen?**

Zellen exprimieren über 400 Transporter, von denen einige für die Aufnahme von Nährstoffen und Arzneistoffen verantwortlich sind (Nukleosidtransporter, Organische Anionen- oder Kationentransporter). Trotzdem existiert noch eine Vielzahl von Transportergenen, deren Funktionen nicht charakterisiert sind. Zur Klärung der Frage, ob ein Transporter-vermittelter Mechanismus für die Aufnahme von $^3\text{H-O}^6\text{BTG-Glu}$ vorliegt, wurde dessen Aufnahme bei unterschiedlichen Temperaturen sowie nach Konzentrationserhöhung des nicht-radioaktiven $\text{O}^6\text{BTG-Glu}$ (Kompetition) analysiert. Beim Kompetitions-Experiment wurde eine niedrigere Konzentration von 6,25 pM (100 nCi) $^3\text{H-O}^6\text{BTG-Glu}$ verwendet; dies steigerte das Verhältnis von radioaktivem zu kaltem $\text{O}^6\text{BTG-Glu}$. Zusätzlich wurde bei diesem Experiment die untersuchte Gesamtzellzahl reduziert. Beide Veränderungen waren in diesem speziellen Experiment nötig, um nicht im Sättigungsbereich zu arbeiten und die nachfolgenden Resultate zu erzielen. Die Aufnahme von 31,25 pM $^3\text{H-O}^6\text{BTG-Glu}$ weist eine deutliche Temperaturabhängigkeit auf (Abb. 20a). Interessanterweise war bei einer niedrigen Temperatur von 4°C (keine Transporter-Aktivität) ebenfalls eine hohe Aufnahme nachzuweisen. Der Kompetitionsassay zeigte eine Abnahme der $^3\text{H-O}^6\text{BTG-Glu}$ -Aufnahme bis zu einer Konzentrationssteigerung von 100 μM der nicht-radioaktiven Substanz. Eine weitere Erhöhung auf 1 mM der kalten Substanz besaß keinen weiteren Effekt auf die Aufnahme der radioaktiven Verbindung; eine Sättigung wurde erreicht. Eine weitere Steigerung der nicht-radioaktiven $\text{O}^6\text{BTG-Glu}$ -Menge war nicht möglich (sinnvoll), da die 1 mM Konzentration schon zu einer milchigen Trübung der Lösung führte.

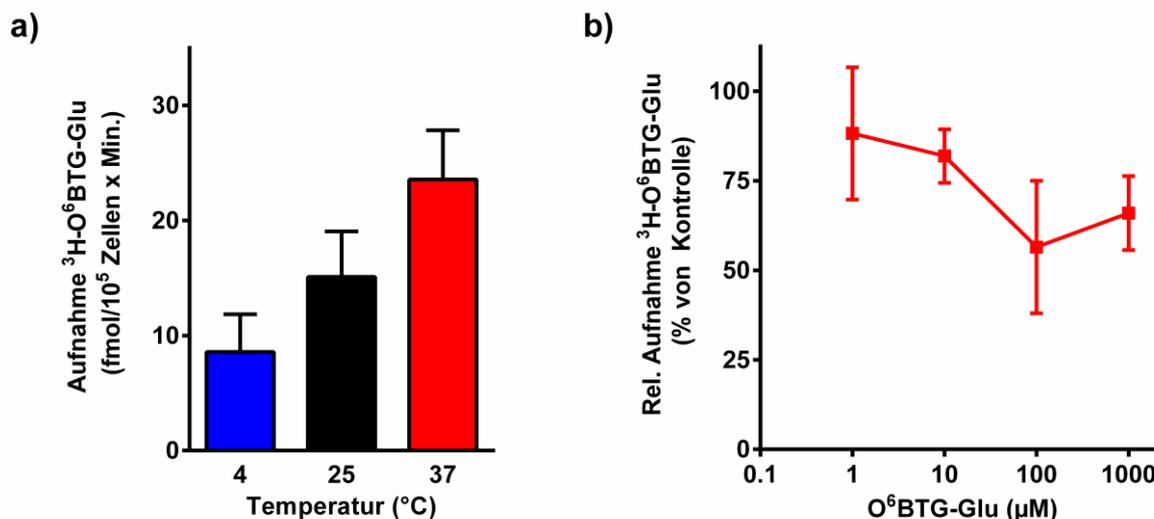


Abb. 20: Untersuchung der Transporter-vermittelten Aufnahme von ³H-O⁶BTG-Glu in Caco-2
 a) Aufnahme in Abhängigkeit der Temperatur. Die Zellen wurden für 2 Minuten mit 31,25 pM ³H-O⁶BTG-Glu und 1 μM kaltem O⁶BTG-Glu in Glu-TP unter der Einwirkung verschiedener Temperaturen inkubiert. b) Kompetitionsassay mit nicht-radioaktivem O⁶BTG-Glu. Die Zellen wurden für 2 Minuten mit 6,25 pM ³H-O⁶BTG-Glu und den angegebenen Konzentrationen an kaltem O⁶BTG-Glu in Glu-TP inkubiert. Anschließend wurde die Radioaktivität mittels Szintillationszähler detektiert und die Aufnahme pro Zellen x Zeit (a) oder relativ zur Kontrolle (Aufnahme ohne kaltem O⁶BTG-Glu) (b) kalkuliert.

Die Daten in Abbildung 20 weisen auf widersprüchliche Ergebnisse bezüglich einer Transporter-vermittelten Aufnahme des Glukose-Konjugates hin. Die temperaturabhängige Aufnahme sowie deren Reduktion durch eine Konzentrationserhöhung mit kaltem O⁶BTG-Glu (im Bereich von 1 bis 100 μM) weisen auf eine Beteiligung von Transportern hin. Im Gegensatz dazu widerlegt die hohe Aufnahme bei 4°C sowie eine maximale Reduktion von ca. 50 % durch den Kompetitionsassay eine Involvierung der Transporter-vermittelten Aufnahme. Dennoch wurden basierend auf diesen Experimenten wichtige Informationen über die Stoffeigenschaften der Glukose-Konjugate erlangt (siehe unten).

3.2.3. Partikelbildung der Glukose-Konjugate

Die Zucker-Konjugate bestehen aus einem hydrophilen (dem Glukosemolekül) und einem hydrophoben Bereich (Linker und O⁶BG/O⁶BTG). Diese Eigenschaft bietet dem Konjugat eine Vielzahl an Möglichkeiten mit der Plasmamembran oder deren Komponenten (Rezeptoren, Transporter- oder Membranproteine) zu interagieren, ohne direkt in die Zelle transportiert zu werden. Eine direkte, schnelle und starke Bindung des ³H-O⁶BTG-Glu an einen dieser Faktoren würde die hohe Aufnahme bei 4°C (in diesem Fall wäre es keine direkte Aufnahme in die Zelle, sondern nur eine Bindung an ihre äußeren Bestandteile) erklären. Zur Untersuchung der Hypothese, wurden Aufnahme-Experimente bei extrem kurzen Inkubationszeiten (2 und 6 Sekunden [Sek.]) in Caco-2 Zellen durchgeführt. Zusätzlich wurde eine initiale Bindung (Inkubationszeit 5 Sek.) an Liposomen (multilamellaren Vesikel [MLV]), die nur aus einer Lipiddoppelschicht bestehen, analysiert. In beiden Experimenten fungierte die Zugabe von 2,5 pM ³H-d-Glu als Negativkontrolle. Die analysierten Moleküle, ³H-O⁶BTG-Glu und ³H-d-Glu, zeigten ein unterschiedliches Verhalten. Die hydrophile ³H-d-Glu wurde nicht nach einer kurzen Inkubationszeit von 2 oder 6 Sekunden in die Zellen aufgenommen; sondern erst nach 2 Minuten wurde eine deutliche Akkumulation in den Zellen nachgewiesen (Abb. 21a). Des Weiteren interagierte das Glukosemolekül nicht mit der Membran der Liposomen (Abb. 21b). Im Gegensatz dazu wurde für das Glukose-Konjugat ein hoher Wert nach 2 bzw. 6 Sekunden in den Caco-2 Zellen detektiert; dieser betrug ca. 40-50 % des 2 Minuten-Zeitpunktes und war deutlich höher als die ³H-d-Glu-Aufnahme nach 120 Sekunden (Abb. 21a). Es wurde ebenfalls eine Bindung des ³H-O⁶BTG-Glu an die Liposomenmembran detektiert; der Wert lag bei ca. 3 % der zugefügten Radioaktivität. Dies deutet auf eine direkte Interaktion des Glukose-Konjugates mit der Plasmamembran hin, wahrscheinlich aufgrund der hydrophoben Bereiche.

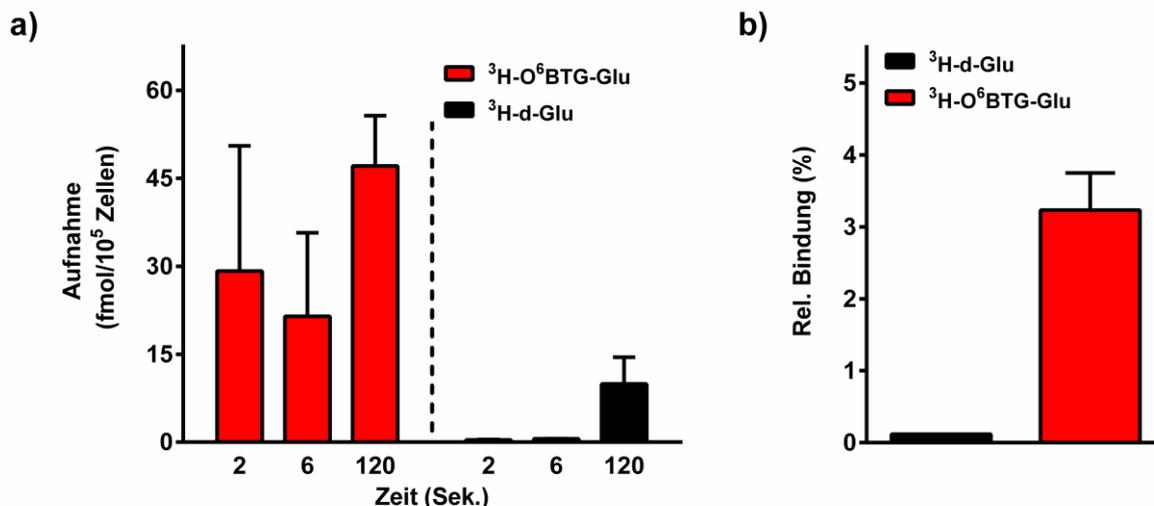


Abb. 21: Aufnahme und Bindung von $^3\text{H-O}^6\text{BTG-Glu}$ und $^3\text{H-d-Glu}$ in Caco-2 und Liposomen
 a) Caco-2 Zellen wurden für die angegebenen Zeitwerte mit 31,25 pM $^3\text{H-O}^6\text{BTG-Glu}$ und 1 μM kaltem $\text{O}^6\text{BTG-Glu}$ in Glu-TP oder mit 2,5 pM $^3\text{H-d-Glu}$ in Saccharose-TP inkubiert. Anschließend wurde die Radioaktivität mittels Szintillationszähler detektiert und die Aufnahme pro Zellen kalkuliert. b) 2,5 mg Liposomen wurde für 5 Sekunden mit 50 nCi $^3\text{H-O}^6\text{BTG-Glu}$ in Glu-TP oder 100 nCi $^3\text{H-d-Glu}$ in Saccharose-TP inkubiert. Anschließend wurde die Radioaktivität mittels Szintillationszähler detektiert und relativ zur eingesetzten Gesamtradioaktivität kalkuliert.

Zusammenfassend lassen die erfassten Resultate keine Schlußfolgerung hinsichtlich des exakten Aufnahmemechanismus zu; lediglich die Aufnahme über einen Glukosetransporter konnte ausgeschlossen werden (siehe Diskussion). Dennoch verweisen die Ergebnisse auf eine Problematik bezüglich der Experimente mit dem radioaktiv-markierten $\text{H}^3\text{-O}^6\text{BTG-Glu}$ hin: Die detektierte Radioaktivität pro Zelle entspricht wahrscheinlich nicht der Aufnahme in die Zelle selbst. Die Stoffeigenschaften der Glukose-Konjugate ermöglichen eine direkte Bindung an die Lipiddoppelschicht, das die Messungen maßgeblich beeinflusst und die Interpretationen der Ergebnisse erschwert.

Die Stoffeigenschaften der Glukose-Konjugate (eine wahrscheinliche direkte Interaktion der hydrophoben Bereiche mit der Zellmembran) müssen ebenfalls bei der Interpretation der unerwarteten physikalischen Phänomene (insbesondere der Löslichkeit) berücksichtigt werden. Amphipathische Moleküle beinhalten sowohl hydrophile als auch hydrophobe Bereiche (wie die Glukose-Konjugate). Die Konjugation von Glukose an den hydrophoben Hemmstoff $\text{O}^6\text{BG/O}^6\text{BTG}$ sollte die Löslichkeit in wässrigen Lösungen steigern. Dies war jedoch nicht der Fall. Im Kompetitionsassay (Abbildung 20) wurde eine milchige Trübung bei einer Konzentration von 1 mM $\text{O}^6\text{BTG-Glu}$ (1 mM $\text{O}^6\text{BG-Glu}$ führte zur identischen milchigen Trübung) beobachtet. Zusätzlich wiesen die Glukose-Konjugate Schwierigkeiten im Lösungsverhalten bei den *in vivo*-Experimenten auf: die Glukose-Konjugate konnten nur in einem Verhältnis von 1:1:1 (DMSO:PEG:NaCl) gelöst werden; im Gegensatz zu O^6BG

oder O⁶BTG, die in einem PEG:NaCl-Verhältniss von 1:2 löslich waren. Die genaue Betrachtung der Strukturformeln (Abb. 4) offenbarte eine strukturelle Ähnlichkeit mit Glykolipiden oder Tensiden; insbesondere durch den langen hydrophoben C8-Linker. Amphiphile Moleküle wie Tenside oder Lipide bilden in wässrigen Lösungen Strukturen, u.a. Mizellen oder Liposomen. Die Art der gebildeten Strukturen ist vom amphiphilen Molekül, seiner Konzentration, der Temperatur und dem Druck abhängig. Bei sehr geringen Konzentrationen bilden amphiphile Moleküle eine monomolekulare Schicht an der Wasser-Luft-Grenzschicht. Wird eine bestimmte Konzentration erreicht, die sogenannte *critical aggregation concentration* (besser bekannt für die Bildung von Mizellen: *critical micelles concentration*, [CMC]), beginnt der Prozess der Selbstaggregation und die Bildung vieler unterschiedlicher Strukturen¹⁹⁹.

Milch ist eine kolloidale Dispersion, d.h. ein heterogenes Gemisch aus Teilchen (Fetttröpfchen) und Dispersionsmedium (Wasser). Aus diesem Grund war die milchige Trübung im wässrigen Medium bei einer hohen Konzentration von 1 mM das erste Anzeichen für eine Aggregation und Strukturbildung der Glukose-Konjugate. Um das Phänomen der Strukturbildung zu verifizieren, wurde für beide Glukose-Konjugate sowie die Inhibitoren O⁶BG und O⁶BTG die Methode der dynamischen Lichtstreuung (*dynamic light scattering*, [DLS]) verwendet. Die DLS detektiert Partikel in geringen Konzentrationen; für die Inhibitoren wurde ein Bereich von 1 µM bis 500 µM untersucht. Die hohe Sensitivität dieser Technik erlaubt nur eine vollständige Charakterisierung der Messwerte (sind echte strukturelle Partikel vorhanden, da Monomere nicht detektiert werden) nur bei Berücksichtigung folgender Parameter: (1) die Größe der Partikel (angegeben als Radius der am häufigsten vorkommt, da ebenfalls nur eine einzige Partikelgröße eine Größenverteilung anzeigt); (2) dem Polydispersitäts-Index [PdI], beschreibt die Homogenität der Partikel; (3) die Intensität des Streulichtes, ist ein Maß für die Häufigkeit der Partikel (gemessen in *kilo counts per seconds*, [kcps], Anzahl von Photonen pro Sekunde). Im Anhang Abbildung 38 wurden Messungen mit einer Positivkontrolle (Partikel mit Standardgröße) und dem Lösungsmittel PBS durchgeführt. Die Kriterien für die Anwesenheit von Partikeln wurden anhand dieser Resultate und den Instruktionen des Herstellers (Malvern Instruments) festgelegt: Radius variabel (auch die Größe von Luftblasen und Staub wird detektiert), Intensität des Streulichtes > 150 (mindestens 30 % mehr als das verwendete Lösungsmittel). Die Messungen der DLS bestätigten die Fähigkeit der Glukose-Konjugate zur Aggregat- und Partikelbildung (Abb. 22c und d). Für O⁶BG-Glu waren die Kriterien der Partikelbildung bei einer Konzentration von 5 µM erreicht; O⁶BTG-Glu zeigte eine deutliche Präsenz von Partikeln erst bei 25 µM. Für die Glukose-Konjugate nahm die Größe der Partikel und die Intensität des Streulichtes mit einer Erhöhung der Konzentration stetig zu; jedoch war für O⁶BTG-Glu der Anstieg in beiden Messwerten steiler. Des Weiteren war für 500 µM O⁶BTG-Glu keine Messung möglich, aufgrund einer milchigen Trübung der Lösung bei dieser Konzentration. Diese Unterschiede der Glukose-Konjugate deuten auf verschiedene

Fähigkeiten zur Aggregation und/oder der Formen ihrer Strukturen hin. Im Gegensatz dazu war für O⁶BG keine Partikelbildung nachweisbar (Abb. 22a). Bei O⁶BTG war bei einer Konzentration von 250 μ M eine Tendenz zur Partikelbildung erkennbar (Abb. 22b). Dies erklärt die leicht milchige Trübung von O⁶BTG bei einer Konzentration von 1 mM in PBS.

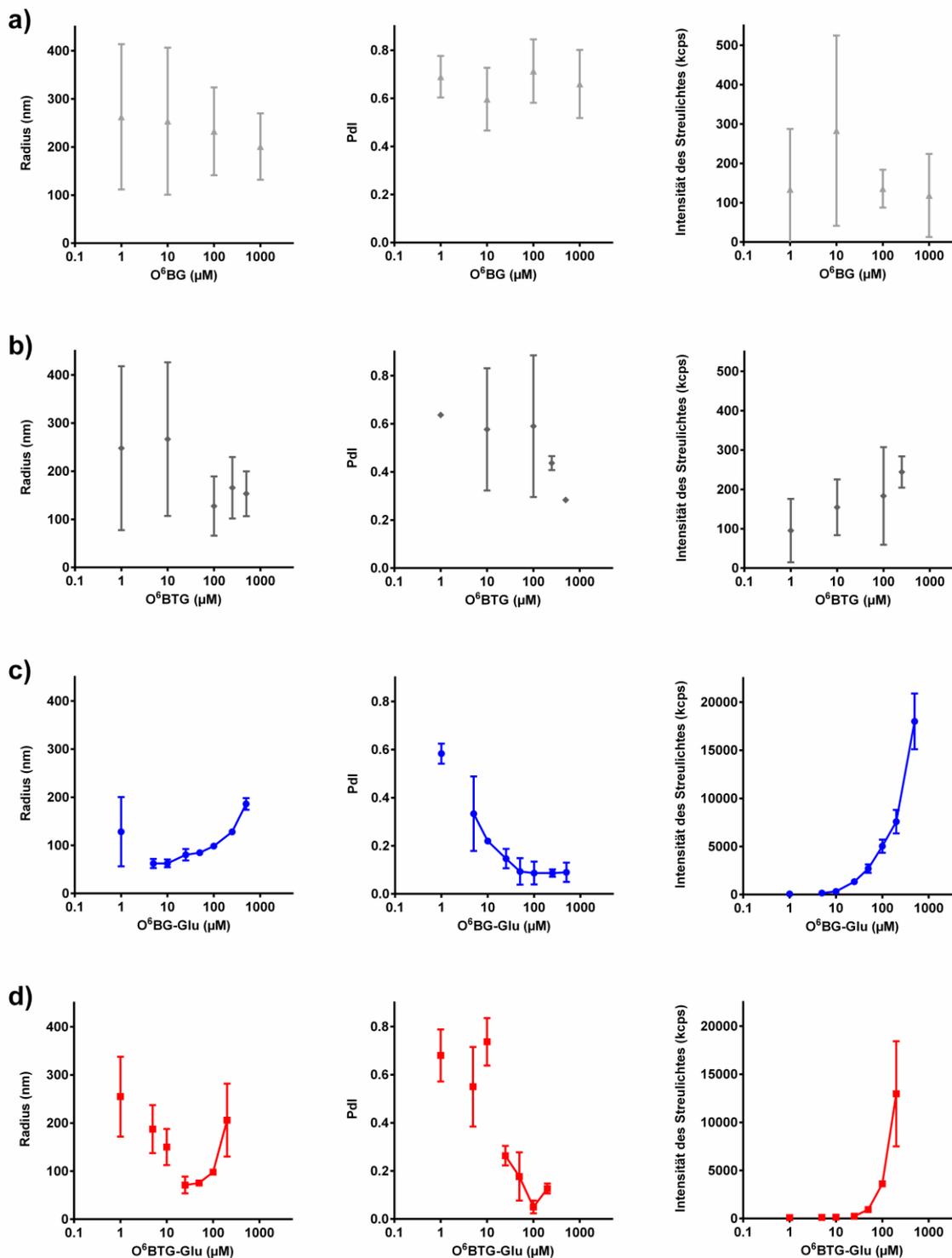


Abb. 22: Nachweis der Partikelbildung von MGMT-Hemmstoffen in wässriger Lösung
 Bestimmung der Messparameter Radius, Polydispersitäts-Index [PdI] und Intensität des Streulichtes von O⁶BG (▲) (a), O⁶BTG (◆) (b), O⁶BG-Glu (●) (c) und O⁶BTG-Glu (■) (d) für die angegebenen Konzentration in PBS mittels dynamische Lichtstreuung. Anhand dieser Parameter wurde die Existenz von Partikeln nachgewiesen; gekennzeichnet durch die Verbindung der einzelnen Messpunkte.

Zusammenfassend zeigten die Resultate eine wichtige unerwartete Stoffeigenschaft der Glukose-Konjugate. Aufgrund der amphiphilen Moleküleigenschaft bilden die Konjugate in wässrigen Lösungen Strukturen aus, die wahrscheinlich Mizellen-ähnlich sind. Dieses Phänomen ereignet sich schon bei niedrigen Konzentrationen, die in den *in vitro*-Experimenten verwendet wurden. Dies führt dazu, dass die effektive Dosis (Anzahl der Monomere in der Dispersion) reduziert wird, was einen großen Einfluss auf die Resultate ausübt und bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muss (siehe Diskussion).

3.3 Einfluss von ABC-Transportern auf die Effektivität der Wirkung von MGMT-Hemmstoffen

Parallel zur Effektivität der Glukose-Konjugate gegenüber Zytostatika (Teil 3.1.) und der Untersuchung des Aufnahmemechanismus (Teil 3.2.) wurde der Einfluss von ABC-Transportern auf die Glukose-Konjugate und den Ausgangssubstanzen O⁶BG und O⁶BTG untersucht. Efflux-Transporterproteine spielen eine wichtige Rolle in der Adsorption, Verteilung und Exkretion von Arzneimitteln. Sie werden als ein Hauptmechanismus der *multidrug resistance* [MDR] in Tumoren angesehen (1.4.2.). Trotz intensiver Forschung in diesem Gebiet der Krebstherapie wurden ABC-Transporter bis heute nie in Zusammenhang mit MGMT-Hemmstoffen gebracht bzw. deren Einfluss auf die MGMT-Targeting-Strategie untersucht. Eine Untersuchung von ABC-Transportern im Zusammenhang mit MGMT-Hemmstoffen ist aus den folgenden Gründen plausibel:

- (1) Die Mehrheit der heutigen Krebsmedikamente (auch lipophile Pharmaka) sind Substrate für einen oder mehrere ABC-Transporter. Aus diesem Grund ist eine Involvierung dieser Transporter für die Effektivität und Speicherung der MGMT-Inhibitoren (O⁶BG, O⁶BTG) im Tumor nicht ausgeschlossen.
- (2) Die Voraussetzung für ein MGMT-Targeting auf der Basis von O⁶BG/O⁶BTG ist die Konjugation eines hydrophilen Moleküls (z.B. Glukose, für die selektive Aufnahme unbedingt erforderlich) an den hydrophoben Inhibitor (O⁶BG/O⁶BTG). Dies führt zur Bildung eines amphipathischen Moleküls. Diese Art von Molekülen werden allerdings von ABC-Transportern bevorzugt erkannt und aus der Zelle ausgeschleust. Daher besitzen die Efflux-Transporter wahrscheinlich immer einen Effekt auf die Speicherung der intrazellulären wirksamen Konzentration bzw. dem Efflux von neu entwickelten Hemmstoffen (ebenfalls der Glukose-Konjugate), womit sie für das MGMT-Inhibitor-Targeting von zentraler Bedeutung werden.
- (3) Der aktive Export des Glukose-Konjugates O⁶BG-Glu durch die ABC-Transporter würde eine plausible Erklärung für dessen teilweise vorhandene Ineffektivität nach erfolgter TMZ-Behandlung liefern.

(4) Erste Hinweise auf eine Wirkung von ABC-Transportern auf die Speicherung von den Glukose-Konjugaten wurden schon in vorherigen Experimenten erhalten: (1) Bei der Aufnahme und intrazellulären Speicherung von $^3\text{H-O}^6\text{BTG-Glu}$ wurde eine schnelle Einstellung eines Gleichgewichtszustandes erreicht. Dies wird wahrscheinlich durch einen aktiven Efflux durch die ABC-Transporter vermittelt (Abb. 17). (2) Die schnellere Inhibition des MGMT-Proteins durch $\text{O}^6\text{BG-Glu}$ in Anwesenheit von Glukosetransporter-Hemmstoffen wie Phloretin und Phlorizin, welche zur Gruppe der Flavonoide gehören. Einige Substanzen dieser Stoffklasse weisen zusätzlich zur GLUT/SGLT-Hemmung eine hemmende Wirkung auf ABC-Transporter auf²⁰⁰.

3.3.1. ABC-Transporter in Tumorzelllinien

Die Transporter der ABC-Familie werden im Menschen gewebespezifisch und in einer Vielzahl von Tumorarten im unterschiedlichen Ausmaß exprimiert. Die drei ABC-Transporter P-Glykoprotein [P-gp], *multi resistance protein 1* [MRP1] und *breast cancer resistance protein* [BCRP] sind in Tumorzellen am häufigsten vorzufinden und werden als hauptverantwortliche Efflux-Transporter der MDR angesehen.

Zunächst wurde die Expression vom P-gp, MDR1 und BCRP in Tumorzellen, die in diesem Projekt verwendet wurden, mittels Western-Blot nachgewiesen und in Relation zur Zelllinie T98G gesetzt. Die Glioblastomzelllinie T98G exprimiert diese drei ABC-Transporter und wurde deshalb als Positivkontrolle angesehen²⁰¹. Im Vergleich zu den anderen Tumorzelllinien exprimiert T98G die Efflux-Transporter MDR1 und BCRP in hohem Ausmaße, dagegen war das Signal für P-gp nur marginal nachzuweisen. In der Kolonkarzinomzelllinie HT29 wurden ebenfalls alle drei ABC-Transporter nachgewiesen, wobei für die Melanomzelllinie A375 nur eine eindeutige Expression vom P-gp und BCRP detektiert wurde. In einer weiteren Kolonkarzinomzelllinie, Caco-2, wurde nur die Expression des Proteins P-gp detektiert und in den anderen Zelllinien GBP61 und D05 wurde kein Protein nachgewiesen (Abb. 23).

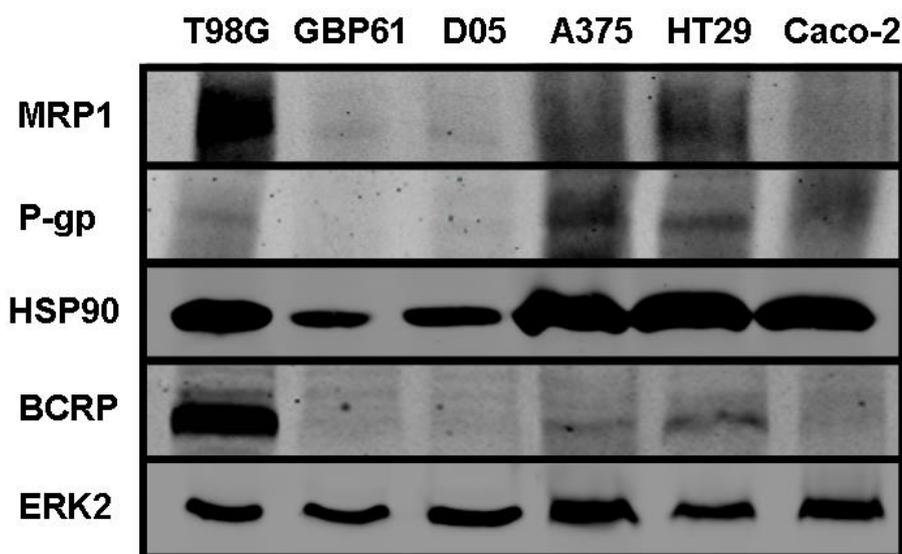


Abb. 23: Expression von ABC-Transportern in verschiedenen Tumorzelllinien
Analyse der Expression der ABC-Transporterproteine MRP1, P-gp und BCRP in verschiedenen Tumorzelllinien mittels Western-Blot. HSP90 und ERK2 dienten als Ladekontrollen.

Interessanterweise korrelieren die Expressionsdaten der ABC-Transporter mit den Sensibilisierungsexperimenten von O⁶BG-Glu und TMZ. Zelllinien mit hoher ABC-Transporterexpression (T98G, A375, HT29) wurden nicht oder nur mäßig durch die Kombinationsbehandlung O⁶BG-Glu + 50 µM TMZ sensibilisiert (Abb. 9). Die folgenden Experimente wurden vorwiegend mit der Glioblastomzelllinie T98G durchgeführt, da sie eine hohe Expression der ABC-Transporter P-gp, MRP1 und BCRP aufweist.

3.3.2. MGMT-Hemmstoffe fungieren als Substrate von ABC-Transportern

Zur Analyse der Involvierung von ABC-Transportern auf die Effektivität der Glukose-Konjugate wurde in einem ersten Ansatz die zeitliche Hemmung des Zielproteins MGMT in Anwesenheit verschiedener ABC-Transporter-Inhibitoren analysiert. Zu diesem Zweck wurden die klassischen Hemmstoffe Ko143 (inhibiert BCRP), Verapamil (inhibiert P-gp) und MK571 (inhibiert MRP's) verwendet ²⁰². Mit den Hemmstoffen der Efflux-Transporter (10 µM Verapamil, 10 µM MK571, 5 µM Ko143) fand eine 15-minütige Vorinkubation statt, gefolgt von einer 15- oder 30-minütigen Exposition mit dem Glukose-Konjugat O⁶BG-Glu (25 µM) oder O⁶BTG-Glu (5 µM). Die simultane Inaktivierung der ABC-Transporter führte nach 15 Minuten für O⁶BTG-Glu und 30 Minuten für O⁶BG-Glu zu einer kompletten Hemmung des MGMT-Proteins; die alleinige Präsenz der Glukose-Konjugate benötigte dafür 240 (für O⁶BG-Glu) oder 60 Minuten (für O⁶BTG-Glu)

(Vergleich Abb. 5 und Abb. 24). Die Behandlung mit dem Inhibitor MK571 zeigte für O⁶BG-Glu den größten Effekt der MGMT-Inaktivierung (Abb. 24a). Beim Glukose-Konjugat O⁶BTG-Glu wurde die MGMT-Hemmung in Anwesenheit jedes ABC-Transporter-Inhibitors signifikant verstärkt. Nach 15 Minuten führte die alleinige Behandlung mit Ko143, identisch zur simultanen Inaktivierung, zum kompletten Verlust der MGMT-Aktivität.

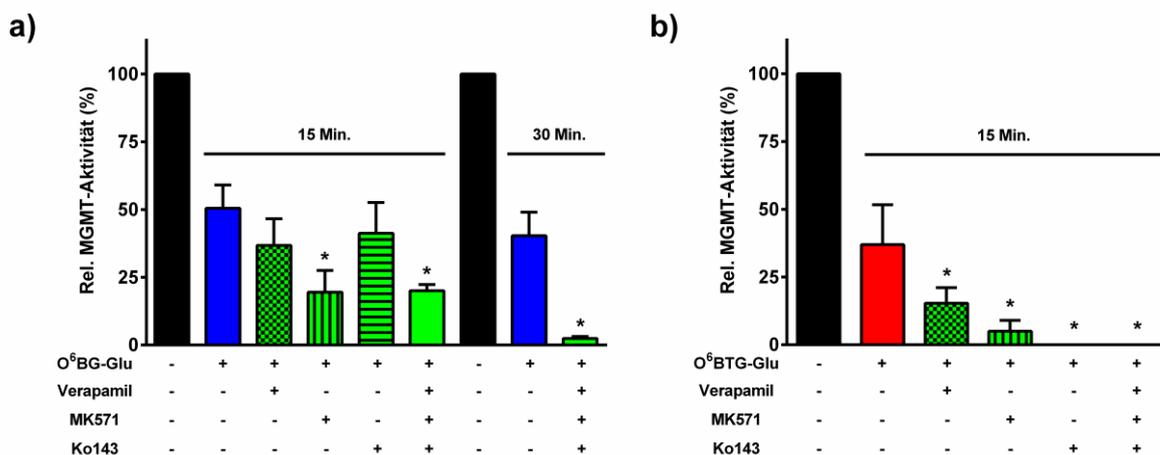


Abb. 24: Einfluss von ABC-Transporter-Hemmstoffen auf die zeitliche Hemmung des MGMT-Proteins durch die Glukose-Konjugate

T98G Zellen wurden mit 25 μ M O⁶BG-Glu (a) oder 5 μ M O⁶BTG-Glu (b) in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) verschiedener ABC-Transporter-Hemmstoffe für 15 oder 30 Minuten inkubiert. Für die Hemmstoffe der ABC-Transporter (10 μ M Verapamil (P-gp), 10 μ M MK571 (MRP), 5 μ M Ko143 (BCRP)) fand eine 15 minütige Vorinkubation statt, bevor die MGMT-Hemmstoffe zugesetzt wurden. Die relative MGMT-Aktivität wurde mittels MGMT-Assay bestimmt und relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Glukose-Konjugate als Substrat für einen oder mehrere ABC-Transporter fungieren. Dementsprechend bewirkte die Inhibition der ABC-Transporter eine Steigerung der Inhibitormoleküle im Zellinneren und somit eine schnellere Hemmung des MGMT-Proteins. Die Inhibition einzelner ABC-Transporter bewirkte unterschiedliche Effekte für die beiden Konjugate; MK571 (inhibiert MRP's) zeigte den größten Einfluss bei O⁶BG-Glu und Ko143 (inhibiert BCRP) bei O⁶BTG-Glu. Dies deutet auf eine gewisse Spezifität der Glukose-Konjugate für bestimmte Familien der Efflux-Transporter hin; was in den anschließenden Experimenten verifiziert werden sollte.

Die verstärkte Hemmung des MGMT-Proteins in Anwesenheit der ABC-Transporter-Inhibitoren stellt nur eine indirekte Messmethode dar. Dennoch zeigt sie, dass die Glukose-Konjugate als Substrate für ABC-Transporter fungieren. Die Inhibitoren O⁶BG und O⁶BTG gelangen per passiver Diffusion in die Zellen und hemmen die vollständige MGMT-Aktivität nach kurzen Inkubationszeiten (15 Minuten für O⁶BG und 1 Minute für O⁶BTG; Abb. 5). Aus diesem Grund konnte der MGMT-Assay nicht zur Analyse verwendet werden, ob ebenfalls die Inhibitoren O⁶BG oder O⁶BTG als Substrate für ABC-Transporter fungieren. Eine akzeptierte Methode zur Untersuchung der ABC-Transporter-Funktion ist der „Efflux-Assay“²⁰³. Zellen werden mit Fluoreszenzfarbstoffen beladen, die spezifisch von bestimmten ABC-Transporterproteinen erkannt und heraus transportiert werden. In Anwesenheit von Molekülen (Inhibitoren, Modulatoren, Substraten) erfolgt nach bestimmten Inkubationszeiten die Quantifizierung des Fluoreszenzsignales in den Zellen. Eine Abwandlung dieser Methode ist der Akkumulations-Assay. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden in Anwesenheit von Molekülen inkubiert und anschließend die Signalstärke des Fluoreszenzfarbstoffes analysiert. Diese Methoden sind Kompletions-Experimente und messen nicht den Efflux der Testsubstanzen, sondern nur die Beeinträchtigung des Transportes der jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe. Deshalb ist keine Unterscheidung möglich, ob eine Testsubstanz als Inhibitor oder Substrat fungiert. Trotzdem dienen diese Methoden zur Identifikation von Inhibitoren, Modulatoren oder Substraten der ABC-Transporter.

Als Positivkontrollen dienten die Hemmstoffe Verapamil (100 µM, für P-gp), MK571 (40 µM, für MRP1) und Ko143 (50 µM, für BCRP). Das detektierte Fluoreszenzsignal nach Behandlung mit den ABC-Transporter-Hemmstoffen wurde für die Efflux-Assays als maximale verbleibende Restmenge des Fluoreszenzfarbstoffes angesehen und dementsprechend als 100 %-ige Hemmung des jeweiligen Transporters gesetzt. Der Einfluss der MGMT-Hemmstoffe wurde immer in Relation zu den Positivkontrollen dargestellt. Für die Inhibitoren O⁶BG und O⁶BTG sowie den Glukose-Konjugaten wurden beide Assays mit jeweils 100 µM als Einsatzkonzentration durchgeführt. Als Fluoreszenzfarbstoffe der Efflux-Transporter wurden 30 µM Rhodamin 123 [Rho 123] (für P-gp), 20 µM 5(6)-Carboxy-2',7'-Dichlorfluorescein-Diacetat [CFDA] (für MRP1) und 0,5 µM Pheophorbid A [Pheo A] (für BCRP) verwendet^{163,204,205}. Obwohl Verapamil als kompetitive Substanz für den P-gp-Transporter beschrieben wird, stimuliert diese Substanz ebenfalls die Transportfähigkeit von MRP1²⁰⁶. Zusätzlich wurde experimentell bestätigt, dass Rho 123 auch von MRP1 erkannt und heraus transportiert wird; jedoch mit geringerer Affinität²⁰⁷. Diese Tatsachen, zusammen mit der enorm starken Expression von MRP1 (im Vergleich zu P-gp) in T98G Zellen, verlangten eine simultane Inhibition durch Verapamil und MK571 zur Analyse der P-gp-Funktion in den T98G Zellen. Die Analyse der MRP1-Funktion beim Akkumulations- und Efflux-Assay erfolgte in der Kolonkarzinomzelllinie HT29 (für P-gp und BCRP wurde T98G verwendet). Der Wechsel von T98G zu HT29 war aufgrund der zu hohen Expression

des MRP1-Transporters in den T98G Zellen nötig, da in den T98G Zellen der Fluoreszenzfarbstoff innerhalb kürzester Zeit (weniger als 5 Minuten) aus den Zellen heraustransportiert wurde.

Die Resultate der Akkumulation-Assays bestätigten einen Effekt der MGMT-Hemmstoffe auf einen oder mehrere ABC-Transporter, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. O⁶BG verstärkte nur die Akkumulation des BCRP-Substrates, wohingegen die anderen drei MGMT-Hemmstoffe die Akkumulation aller Fluoreszenzfarbstoffe deutlich erhöhten (Abb. 25b bis d). In Abbildung 25a war die stimulierende Eigenschaft von Verapamil auf den MRP1-vermittelten Rho 123-Efflux nachweisbar. Zusätzlich scheinen die MGMT-Hemmstoffe, mit Ausnahme von O⁶BG, ebenfalls einen Effekt auf die MRP1-Funktion auszuüben oder beeinflussen die Aufnahme des Farbstoffes auf eine andere Art und Weise. Die simultane Inhibition von P-gp und MRP1 führte dagegen zu einer Akkumulation von Rho 123. Diese Akkumulation war bei der Inhibition von MRP1 in Anwesenheit der MGMT-Hemmstoffe O⁶BTG, O⁶BG-Glu oder O⁶BTG-Glu sogar höher als mit der Positivkontrolle Verapamil.

Die Resultate des Efflux-Assays waren fast identisch mit den Akkumulations-Daten; O⁶BG beeinflusste den Transport des Pheo A im deutlichen Maße und ebenfalls den Export von Rho 123 bei simultaner Inhibition des MRP1-Transporters. Die Resultate der simultanen Inhibition vom MRP1 mit MK571 und P-gp (durch Verapamil oder den MGMT-Hemmstoffen) verweisen wieder auf einen Rho 123-vermittelten Efflux durch MRP1. Die anderen MGMT-Hemmstoffe führten zu einem verminderten Efflux aller drei Fluoreszenzfarbstoffe, wobei der Effekt von CFDA nur mäßig war. Zusätzlich war nachzuweisen, dass die Efflux-Kapazität der einzelnen ABC-Transporter in Präsenz der MGMT-Inhibitoren mit der Bromthiophengruppe stärker beeinflusst wurde als in Anwesenheit der Hemmstoffe mit der Benzylgruppe (Vergleich: O⁶BTG mit O⁶BG und O⁶BTG-Glu mit O⁶BG-Glu) (Abb. 26).

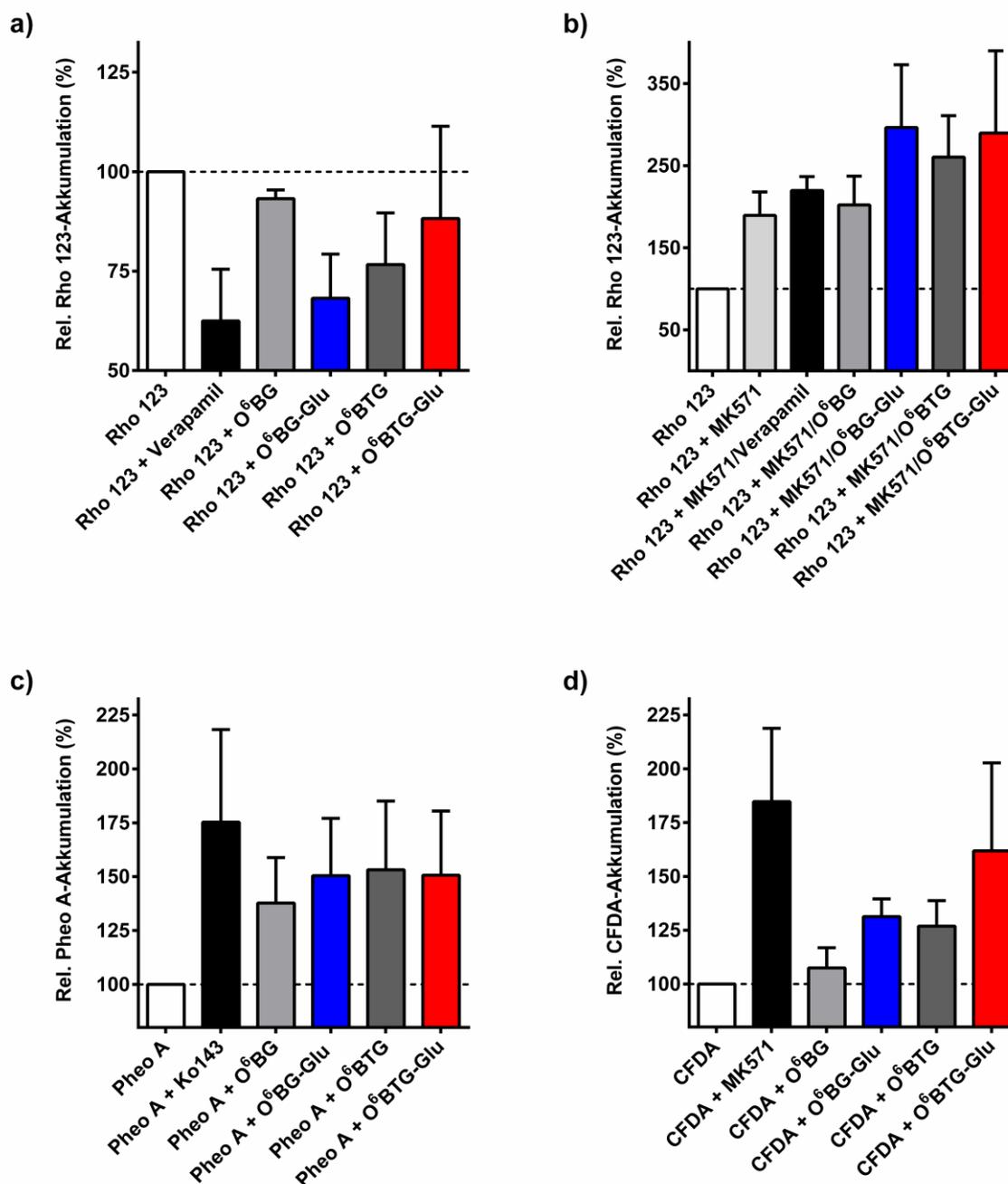


Abb. 25: Akkumulation von Fluoreszenzfarbstoffen in Abhängigkeit von MGMT-Inhibitoren
 Tumorzellen (HT29 für MRP1 (d), T98G für P-gp und BCRP) wurden mit 30 μ M Rho 123 (a und b), 0,5 μ M Pheo A (c) oder 20 μ M CFDA (d) für 30 Minuten bei 37°C in Abwesenheit (Kontrolle) oder Anwesenheit von 100 μ M des jeweiligen MGMT-Inhibitors inkubiert. Als Positivkontrollen dienten eine simultane Inkubation der jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe mit ABC-Transporter Hemmstoffen (100 μ M Verapamil (P-gp), 40 μ M MK571 (MRP1), 50 μ M Ko143 (BCRP)) bei identischen Bedingungen. Die Akkumulation der jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe wurde anhand der medianen Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie bestimmt und relativ zur Kontrolle dargestellt.

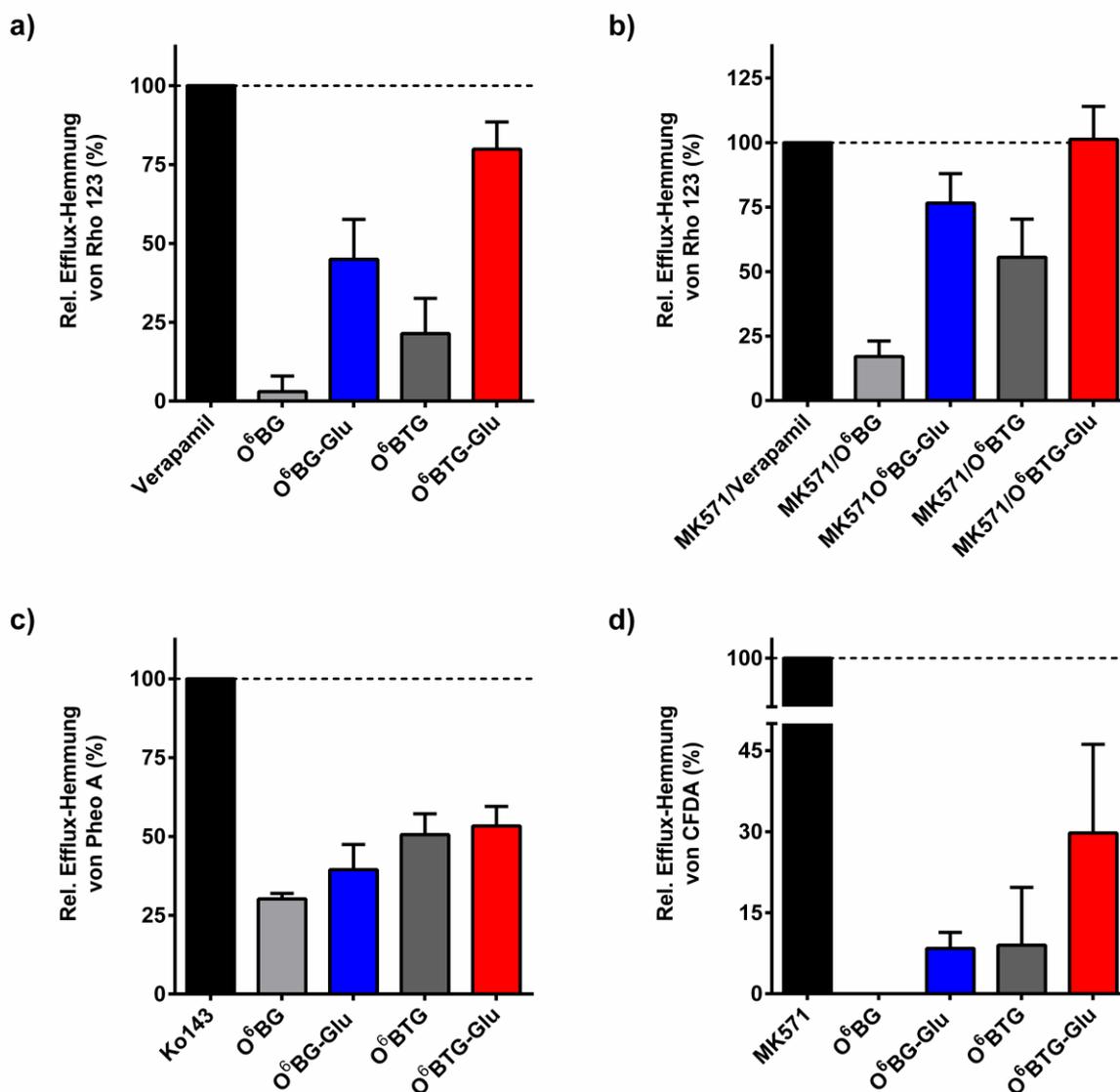


Abb. 26: Efflux von Fluoreszenzfarbstoffen in Abhängigkeit von MGMT-Inhibitoren
 Tumorzellen (HT29 für MRP1 (d), T98G für P-gp und BCRP) wurden mit 30 μ M Rho 123 (a und b), 0,5 μ M Pheo A (c) oder 20 μ M CFDA (d) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, gewaschen, und anschließend erfolgte eine weitere Inkubation für 120 (a, b und c) oder 20 Minuten (d) in Efflux-Puffer (Kontrolle) oder in Anwesenheit von 100 μ M des jeweiligen MGMT-Inhibitors. Für die Positivkontrollen der jeweiligen ABC-Transporter wurden anstatt der MGMT-Hemmstoffe unter identischen Bedingungen die spezifischen ABC-Transporter Hemmstoffe (100 μ M Verapamil (P-gp), 40 μ M MK571 (MRP), 50 μ M Ko143 (BCRP)) zugesetzt. Die verbliebende Restmenge der jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe wurde anhand der medianen Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie bestimmt und relativ zu den jeweiligen Positivkontrollen dargestellt.

Insgesamt bestätigen die bisherigen Daten einen aktiven Export von O⁶BG, O⁶BTG und den Glukose-Konjugaten durch einen oder mehrere ABC-Transporter. Unerwartet war die Tatsache, dass O⁶BTG-Glu den Efflux der Fluoreszenzfarbstoffe stärker inhibiert als O⁶BG-Glu. Da ein verstärkter Efflux von O⁶BG-Glu eine plausible Erklärung für dessen Unwirksamkeit gegenüber einigen Tumorzellen gewesen wäre. Einschränkungen der verwendeten Methoden erschweren jedoch einige Aussagen über den Einfluss der MGMT-Hemmstoffe auf ABC-Transporter (siehe Diskussion), z.B. ist keine Unterscheidung möglich, ob die jeweiligen Testsubstanzen als Substrate oder Inhibitoren fungieren.

3.3.3. Hemmung der ABC-Transporter zur Steigerung der Effektivität von MGMT-Inhibitoren

ABC-Transporter-Hemmstoffe werden seit Jahren in der Tumorthherapie eingesetzt. Die Blockierung der Efflux-Transporter steigert die intrazelluläre Konzentration der Chemotherapeutika und sensibilisiert somit Tumorzellen, die eine *multidrug resistance* aufgrund der Überexpression von ABC-Transportern aufweisen²⁰⁸.

Zur Überprüfung der Relevanz von Efflux-Transportern auf die Effektivität von MGMT-Hemmstoffen bei der Kombinationsbehandlung mit dem methylierenden Agens TMZ wurde vorerst für O⁶BG-Glu die Induktion des Zelltodes in Anwesenheit der einzelnen ABC-Transporter-Hemmstoffe analysiert. Die resistenten T98G Zellen (zumindest gegenüber O⁶BG-Glu) wurden mit verschiedenen Kombinationen aus 25 µM O⁶BG-Glu und ABC-Transporter-Hemmstoffen (10 µM Verapamil (P-gp), 10 µM MK571 (MRP1) oder 5 µM Ko143 (BCRP) für 4 Stunden inkubiert, gefolgt von einer Behandlung mit 50 µM TMZ. Es fand eine 24-stündige Behandlung mit den Efflux-Hemmstoffen statt und anschließend eine weitere Inhibition des MGMT-Proteins mit 25 µM O⁶BG-Glu oder 10 µM O⁶BG. Diese Strategie imitiert eine *in vivo*-Situation mit einer Puls-Behandlung der ABC-Transporter-Hemmstoffe und verdeutlicht die Relevanz der kompletten MGMT-Hemmung über einen längeren Zeitraum (ist eine 24-stündige Behandlung mit ABC-Transporter-Hemmstoffen ausreichend zur maximalen Induktion der Toxizität). Die alleinige Behandlung der Zellen mit den ABC-Hemmstoffen und dem Glukose-Konjugat wirkten nicht toxisch (Anhang Abb. 39). Die Ergebnisse bestätigten eine aktive Rolle der Efflux-Transporter an der Effektivität von O⁶BG-Glu (Abb. 27a und b). Die alleinige, duale oder komplette Hemmung der jeweiligen ABC-Transporter erhöhte die Apoptose nach Behandlung mit dem Glukose-Konjugat und TMZ. Jedoch führte nur die simultane Hemmung der drei ABC-Transporter zur Induktion der höchsten Toxizität. Dieses Ergebniss bestätigt, dass O⁶BG-Glu durch mehrere ABC-Transporter aus den Zellen heraustransportiert wird. Des Weiteren war eine komplette Hemmung des MGMT-Proteins nach 24 Stunden (Wechsel auf

O⁶BG, Abb. 27b) effektiver als die weitere Inkubation mit O⁶BG-Glu (Abb. 27a). Dies deutet auf eine noch vorhandene Reparaturkapazität der O⁶MeG-Läsion nach 24 Stunden hin (in Anwesenheit von O⁶BG-Glu) und bestätigt die Relevanz einer vollständigen MGMT-Hemmung über einen langen Zeitraum.

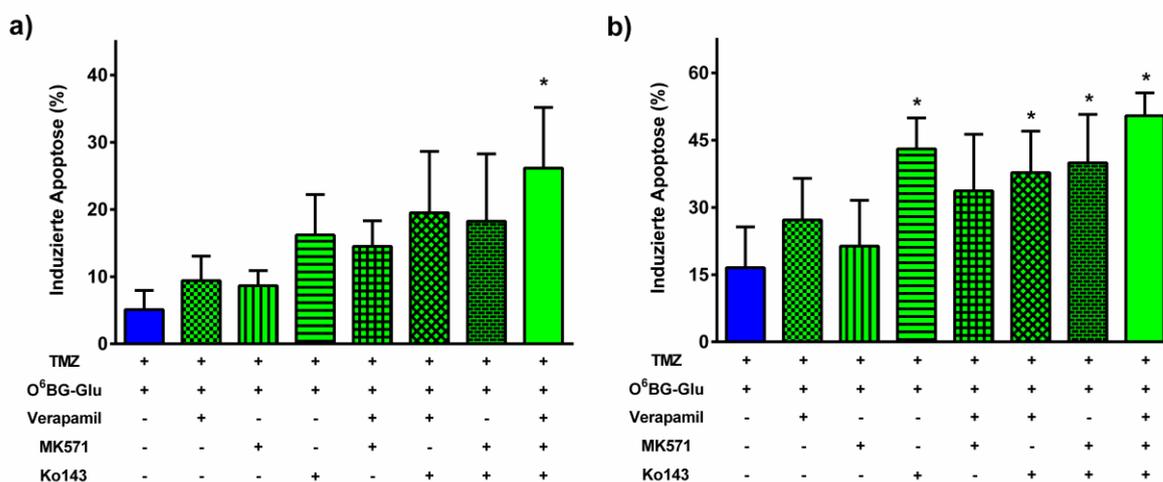


Abb. 27: Induktion des Zelltodes nach erfolgreicher Kombinationsbehandlung aus ABC-Transporter-Hemmstoffen, dem Glukose-Konjugat O⁶BG-Glu und TMZ in T98G Zellen
 Induktion der Apoptose nach 120 Stunden. Die Zellen wurden mit 25 µM O⁶BG-Glu in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) verschiedener ABC-Transporter-Hemmstoffe (10 µM Verapamil (P-gp), 10 µM MK571 (MRP1) oder 5 µM Ko143 (BCRP)) für 4 Stunden inkubiert, gefolgt von einer Behandlung mit 50 µM TMZ. Im Anschluss dieser 24-stündigen Behandlung wurden die Inhibitoren entfernt und es fand eine erneute Inkubation mit 25 µM O⁶BG-Glu (a) oder 10 µM O⁶BG (b) statt. Die Apoptose wurde mittels Sub-G1-Analyse ermittelt. Die p-Werte (*, p < 0,05) beziehen sich jeweils auf die alleinige O⁶BG-Glu-Behandlung mit TMZ.

Im nächsten Ansatz wurden weitere Tumorzelllinien, die ebenfalls resistent gegenüber der Kombination aus 25 µM O⁶BG-Glu und 50 µM TMZ waren, analysiert. Identisch zum vorherigen Experiment wurden die Zellen mit 25 µM O⁶BG-Glu in An- oder Abwesenheit der simultanen Hemmung der Efflux-Transporter (10 µM Verapamil, 10 µM MK571 und 5 µM Ko143) für 4 Stunden inkubiert, gefolgt von einer 50 µM TMZ-Behandlung. Nach 24 Stunden wurden die Hemmstoffe entfernt und es fand eine weitere Inkubation mit 10 µM O⁶BG statt. Die Induktion der Apoptose wurde nach 120 Stunden analysiert und mit der Behandlung aus ABC-Hemmstoffen und O⁶BG verglichen. In allen analysierten Zelllinien war für O⁶BG-Glu die Induktion der Apoptose in Anwesenheit der ABC-Transporter-Hemmstoffe signifikant erhöht (Abb. 28). In der Glioblastomzelllinie T98G und der Kolonkarzinomzelllinie HT29 war die induzierte Apoptose immer noch geringer als nach der O⁶BG-Behandlung; somit wurde nicht die maximale Induktion des Zelltodes durch die Anwesenheit der ABC-Transporter-Hemmstoffe im Falle einer Behandlung mit O⁶BG-Glu + TMZ erreicht.

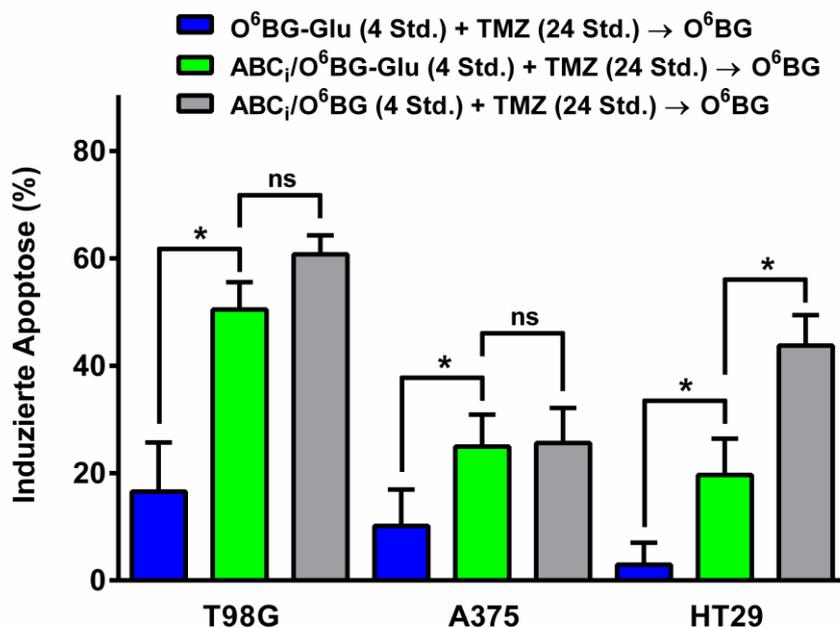


Abb. 28: Induktion des Zelltodes nach Kombinationsbehandlung aus ABC-Transporter-Hemmstoffen, MGMT-Inhibitoren und dem methylierenden Agens TMZ in Tumorzelllinien
 Induktion der Apoptose nach 120 Stunden. Die Zellen wurden mit 25 μM O⁶BG-Glu oder 10 μM O⁶BG in Anwesenheit oder Abwesenheit von den ABC-Transporter-Hemmstoffen [ABC_i] (10 μM Verapamil, 10 μM MK571, 5 μM Ko143) für 4 Stunden inkubiert, gefolgt von einer Behandlung mit 50 μM TMZ. Bei der Melanomzelllinie A375 fand eine 24-stündige Vorbehandlung mit 300 IU/ml IFN- β statt, um die Zellen zu sensibilisieren. Im Anschluss einer 24-stündigen Behandlung wurden die Inhibitoren entfernt und es fand eine erneute Inkubation mit 10 μM O⁶BG statt. Die Apoptose wurde mittels Sub-G1-Analyse ermittelt. Die p-Werte (*, $p < 0,05$; ns, nicht signifikant) beziehen sich jeweils auf die markierten Behandlungen.

Nachdem eine Rolle der ABC-Transporter für die Effektivität des O⁶BG-Glu-Konjugates bestätigt wurde, sollte der Einfluss auf die anderen MGMT-Hemmstoffe analysiert werden. Die Induktion der Apoptose in der T98G Zelllinie erlangte nach Behandlung mit 10 µM O⁶BG, 5 µM O⁶BTG oder 5 µM O⁶BTG-Glu und 50 µM TMZ ein maximales Niveau (Abb. 9). Demensprechend war für die Untersuchung des Einflusses der ABC-Transporter eine Reduktion der Dosis nötig, die zur identischen MGMT-Hemmung und Apoptoseinduktion führte wie die Behandlung mit 25 µM O⁶BG-Glu. In Abbildung 29 sind die Resultate der hohen und niedrigen Konzentrationen von O⁶BG, O⁶BTG und O⁶BTG-Glu bezüglich MGMT-Hemmung (nach 4 Stunden Exposition) und Apoptoseinduktion nach 120 Stunden in der T98G Zelllinie zusammengefasst. Die geringeren Dosen von O⁶BG, O⁶BTG und O⁶BTG-Glu führten zur selben MGMT-Hemmung wie die Behandlung mit 25 µM O⁶BG-Glu (über 90 %-ige Reduktion der MGMT-Aktivität) und einer vergleichbaren Effektivität in der Kombinationsbehandlung mit 50 µM TMZ (induzierte Apoptose von ca. 10 %).

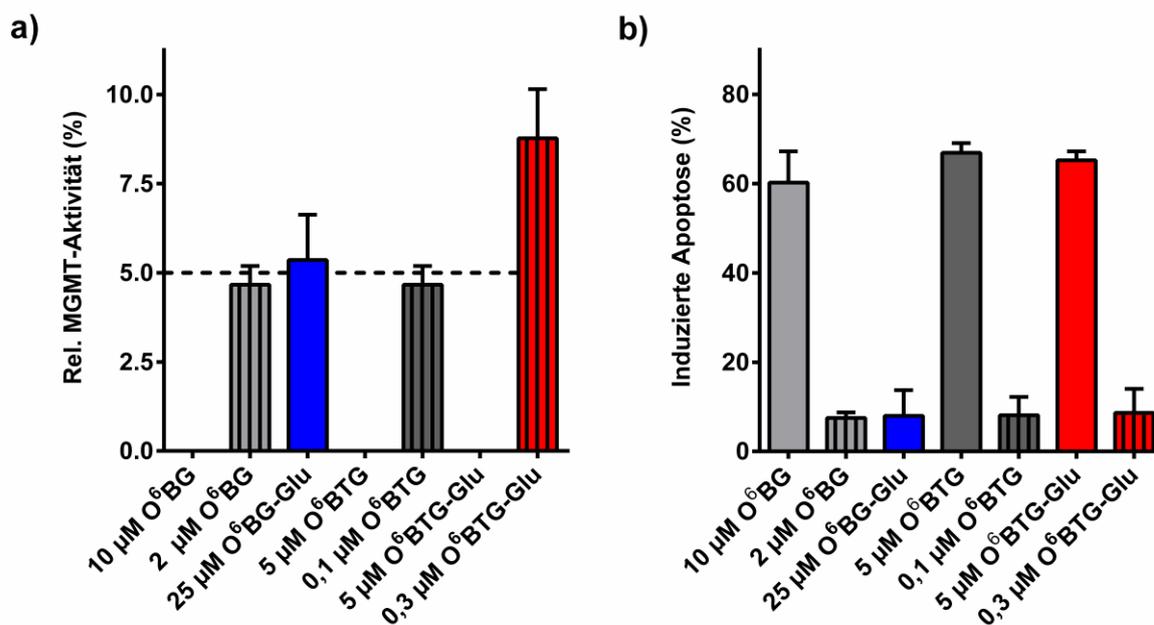


Abb. 29: MGMT-Hemmung und Apoptoseinduktion mit verschiedenen Dosen der MGMT-Inhibitoren und der Kombinationsbehandlung mit dem methylierenden Agens Temozolomid
a) Hemmung der MGMT-Aktivität nach 4 Stunden. T98G Zellen wurden mit 25 µM O⁶BG-Glu, einer hohen (10 µM O⁶BG, 5 µM O⁶BTG, 5 µM O⁶BTG-Glu) oder niedrigen Dosis (2 µM O⁶BG, 0,1 µM O⁶BTG, 0,3 µM O⁶BTG-Glu) der MGMT-Hemmstoffe behandelt. Die MGMT-Aktivität wurde mittels MGMT-Assay bestimmt und relativ zur unbehandelten Kontrolle analysiert. b) Nach Behandlung mit identischen Konzentrationen der MGMT-Hemmstoffe für 4 Stunden wurden T98G Zellen mit 50 µM TMZ behandelt und der Zelltod nach 120 Stunden bestimmt. Die Apoptose wurde mittels Sub-G1-Analyse ermittelt.

Im Anschluss wurde der Effekt der simultanen Inhibition der drei Efflux-Transporter (P-gp, MRP1, BCRP) auf die TMZ-induzierte Apoptose untersucht. T98G Zellen wurden mit geringen ($2 \mu\text{M}$ O⁶BG, $0,1 \mu\text{M}$ O⁶BTG, $0,3 \mu\text{M}$ O⁶BTG-Glu) oder hohen Konzentrationen ($10 \mu\text{M}$ O⁶BG, $5 \mu\text{M}$ O⁶BTG, $5 \mu\text{M}$ O⁶BTG-Glu) der MGMT-Hemmstoffe in An- oder Abwesenheit der ABC-Transporter-Inhibitoren ($10 \mu\text{M}$ Verapamil, $10 \mu\text{M}$ MK571 und $5 \mu\text{M}$ Ko143) für 4 Stunden inkubiert, gefolgt von einer Behandlung mit $50 \mu\text{M}$ TMZ und einer Apoptosemessung nach 120 Stunden. Es fand eine 24-stündige Behandlung mit den ABC-Transporter-Hemmstoffen statt und ein anschließender Wechsel auf $10 \mu\text{M}$ O⁶BG oder den geringen Dosen der jeweiligen MGMT-Inhibitoren. Die simultane Hemmung der Efflux-Transporter führte für die geringen Dosen von O⁶BG, O⁶BTG und O⁶BTG-Glu, identisch zu $25 \mu\text{M}$ O⁶BG-Glu, zu einer verstärkten Induktion der Apoptose; diese war im Anschluss des 24-stündigen Austausches auf O⁶BG für alle Hemmstoffe signifikant unterschiedlich (Abb. 30a bis d). Jedoch wurde nie die maximale Induktion der Apoptose erreicht, die nach der alleinigen Behandlung mit den jeweiligen hohen Dosen der MGMT-Hemmstoffe und TMZ beobachtet wurde. Für die niedrigen Dosen von O⁶BTG und O⁶BTG-Glu war die Behandlung mit den ABC-Transporter-Inhibitoren und die weitere Inkubation mit den reduzierten Konzentrationen nur bedingt wirksam, bei O⁶BG war der Unterschied ebenfalls signifikant. Die simultane Hemmung der Efflux-Transporter bei den hohen Konzentrationen von O⁶BG, O⁶BTG und O⁶BTG-Glu führte zu keiner zusätzlichen Steigerung in der Apoptoseinduktion, da die maximale Apoptosefrequenz bereits erreicht war.

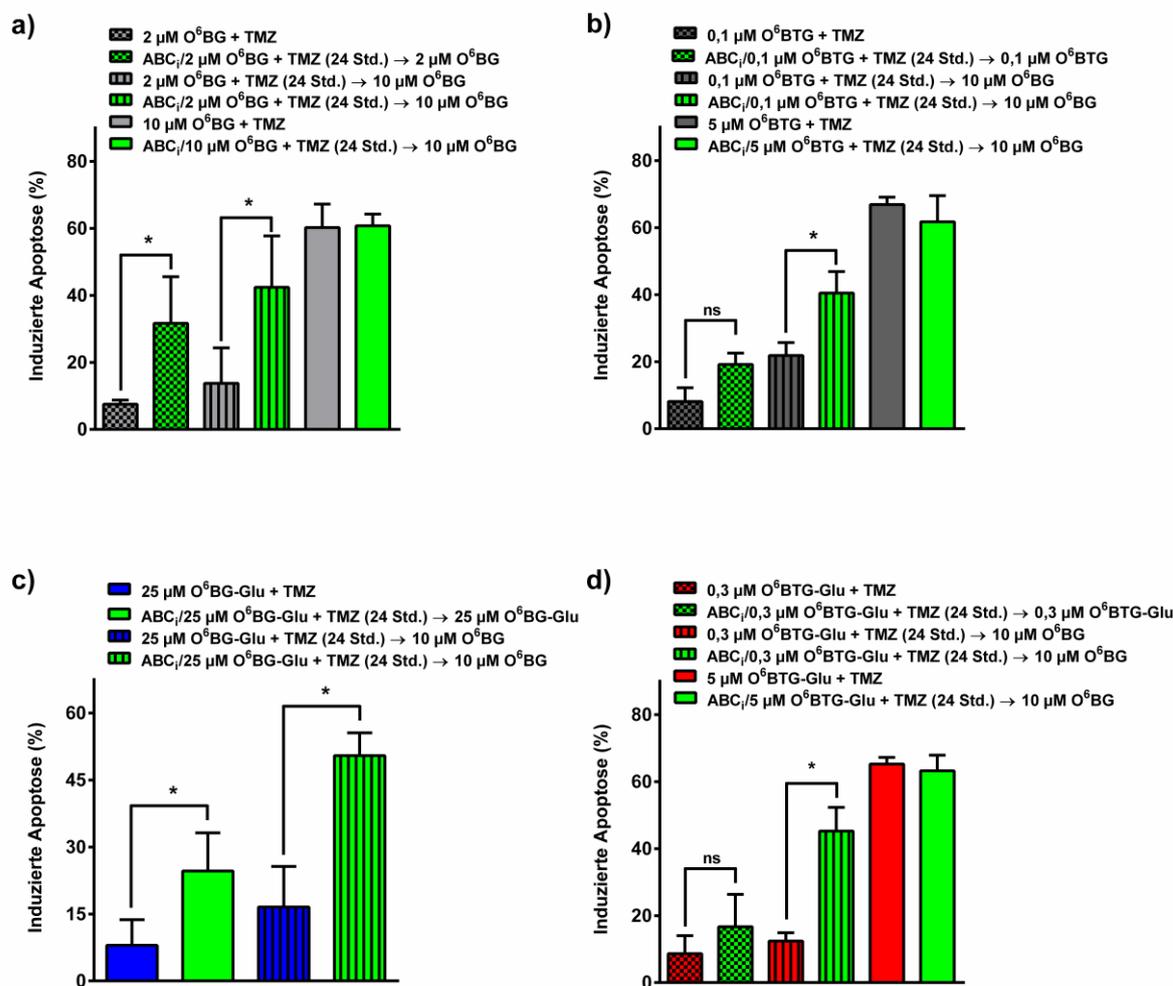


Abb. 30: Induktion des Zelltodes nach Kombinationsbehandlung aus ABC-Transporter-Hemmstoffen, MGMT-Inhibitoren und dem methylierenden Agens TMZ in T98G Zellen
 Induktion der Apoptose nach 120 Stunden. T98G Zellen wurden mit O⁶BG-Glu (c), einer hohen oder niedrigen Dosis O⁶BG (a), O⁶BTG (b) oder O⁶BTG-Glu (d) in An- oder Anwesenheit von ABC-Transporter-Hemmstoffen [ABC_i] (10 μM Verapamil, 10 μM MK571, 5 μM Ko143) für 4 Stunden inkubiert, gefolgt von einer Behandlung mit 50 μM TMZ. Im Anschluss einer 24-stündigen Behandlung wurden die Inhibitoren entfernt und es fand eine erneute Inkubation (gekennzeichnet durch den „→“) mit 10 μM O⁶BG oder einer geringen Konzentration der jeweiligen MGMT-Inhibitoren statt. Die Apoptose wurde mittels Sub-G1-Analyse ermittelt. Die p-Werte (*, $p < 0,05$; ns, nicht signifikant) beziehen sich jeweils auf die markierten Behandlungen.

Zusammenfassend bestätigen die Resultate, dass ABC-Transporter eine Relevanz auf die Effektivität von MGMT-Hemmstoffen aufweisen. Der aktive Export der MGMT-Hemmstoffe (insbesondere von O⁶BG-Glu) reduziert die intrazelluläre wirksame Konzentration und wirkt somit dem Alkylantien-induzierten Zelltod entgegen. Bei einer ausreichend hohen Konzentration der MGMT-Hemmstoffe O⁶BG, O⁶BTG und O⁶BTG-Glu, die eine 100 %-ige MGMT-Hemmung bewirkt, kann jedoch in den *in vitro*-Experimenten der Einfluss der ABC-Transporter vernachlässigt werden.

3.3.4. ABC-Transporter-Hemmung zur Steigerung des therapeutischen Effektes von O⁶BTG-Glu im A375-Xenograft-Modell

Das Glukose-Konjugat O⁶BTG-Glu zeigte in den *in vitro*-Experimenten eine identische Wirksamkeit hinsichtlich der Alkylantien-induzierten Toxizität wie die Inhibitoren O⁶BG und O⁶BTG (Abb. 9 und 11). Dennoch führte die intravenöse Applikation des Konjugates nicht zur kompletten Hemmung der MGMT-Aktivität im Tumor des A375-Xenograft-Modells (Abb. 12). Die Identifikation des aktiven Effluxes der Glukose-Konjugate durch die ABC-Transporter bot eine mögliche Erklärung für die unvollständige Hemmung im *in vivo*-System. Aus diesem Grund wurde die Auswirkung der ABC-Transporter-Hemmung hinsichtlich der Effektivität von O⁶BTG-Glu im Mausmodell untersucht.

Zuerst wurde die MGMT-Hemmung im A375-Tumor 2 Stunden nach einer intravenösen Applikation von 62,5 mg/kg O⁶BTG-Glu in An- oder Abwesenheit von Efflux-Hemmstoffen analysiert. Im Mausmodell wurden dafür die ABC-Transporter-Hemmstoffe Elacridar (10 mg/kg intraperitoneale Applikation, hemmt P-gp und BCRP) und Probenecid (200 mg/kg intraperitoneale Applikation, hemmt MRP1) verwendet ²⁰², die 30 Minuten vor den MGMT-Hemmstoffen verabreicht wurden. Wie in Abbildung 31a dargestellt, führte die Inhibition der ABC-Transporter zu einer verstärkten Hemmung von MGMT nach intravenöser Verabreichung von 62,5 mg/kg O⁶BTG-Glu. Anschließend wurde eine Kombinationsbehandlung im A375-Xenograft-Modell durchgeführt. Diese bestand aus einer 2-stündigen Inkubation der MGMT-Hemmstoffe (20 mg/kg O⁶BTG i.p. oder 62,5 mg/kg O⁶BTG-Glu i.v.) in An- oder Abwesenheit der ABC-Transporter-Hemmstoffe, gefolgt von einer intraperitonealen Verabreichung des chlorethylierenden Agens CCNU (16 mg/kg). In diesem Versuchsansatz wurde CCNU verwendet, da dem MGMT-Protein eine reduzierte Zeitdauer zur Verfügung steht, die toxische O⁶CIeTg-Läsion zu reparieren (Bildung des unreparierbaren ICL durch MGMT innerhalb von 8-12 Stunden) als die O⁶MeG-Läsion (Bildung des DSB im zweiten Zellzyklus, ca. 40 Stunden). Dementsprechend ist für die Induktion der maximalen CCNU-vermittelten Toxizität eine kürzere Hemmung von MGMT erforderlich, im Vergleich zu TMZ. Die Kombinationsbehandlung aus O⁶BTG und CCNU war extrem toxisch für die Mäuse, der Großteil der Mäuse starb innerhalb der ersten 5 Tage (Abb. 31b). Im Vergleich dazu wirkte eine Behandlung mit den verschiedenen Kombinationen aus ABC-Transporter-Hemmstoffen, O⁶BTG-Glu und CCNU nicht besonders toxisch auf den Mausorganismus; die maximale Abnahme des Gewichtes betrug 10 % (Abb. 31c und Anhang Abb. 40a). Die Präsenz der Efflux-Hemmstoffe führte bei der Kombinationsbehandlung aus O⁶BTG-Glu und CCNU allerdings auch zu keiner deutlichen Reduktion des Tumorwachstums (Abb. 31d).

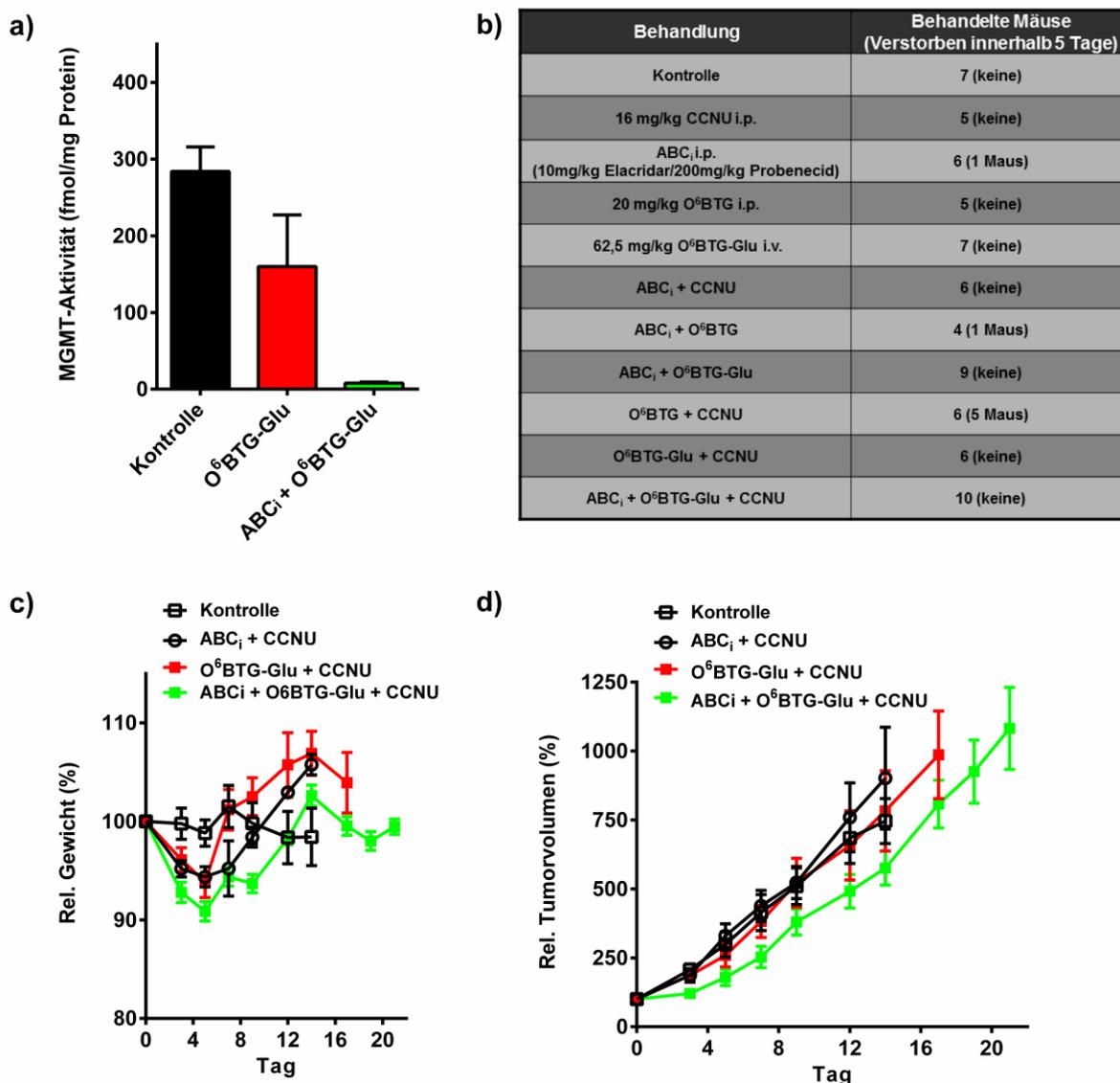


Abb. 31: Effekte von ABC-Transporter-Hemmstoffen im humanen A375-Xenograft-Modell
 a) Intravenöse Applikation von 62,5 mg/kg O⁶BTG-Glu für 2 Stunden in An- oder Abwesenheit einer 30-minütigen Vorinkubation mit ABC-Transporter-Hemmstoffen (10 mg/kg Elacridar, 200 mg/kg Probenecid i.p.). Anschließend wurde die MGMT-Aktivität im A375-Tumor mittels MGMT-Assay bestimmt. b) Zusammenfassung der Gesamtanzahl verwendeter A375-tragender Balb/c nude Mäuse für die jeweiligen Behandlungen und die Todesfälle innerhalb der ersten 5 Tage. Wachstumskurve und Toxizität des A375-Xenograft-Modells nach Kombinationsbehandlung. Intravenöse Applikation von 10 % DMSO in 0,9 % NaCl (□,○) oder 62,5 mg/kg O⁶BTG-Glu in Ab- (■) oder Anwesenheit (■) einer 30-minütigen Vorinkubation der ABC-Transporter-Hemmstoffe für eine Inkubationsdauer von 2 Stunden, gefolgt von einer Behandlung mit 16 mg/kg CCNU. Bestimmung des relativen Körpergewichtes (c) oder des Tumorwachstums (d) über die Zeit. Die Werte repräsentieren den Mittelwert +/- Standardfehler von mind. 5 Mäusen pro Gruppe und beziehen sich jeweils auf den Tag 0 (Tag der Behandlung).

Obwohl das erste *in vivo*-Experiment zu keinem positiven Ergebnis führte, sollte der Einfluss von ABC-Transporter-Hemmstoffen auf die Effektivität des MGMT-Inhibitors O⁶BTG-Glu in einem weiteren Versuch analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde die Strategie wie folgt verändert:

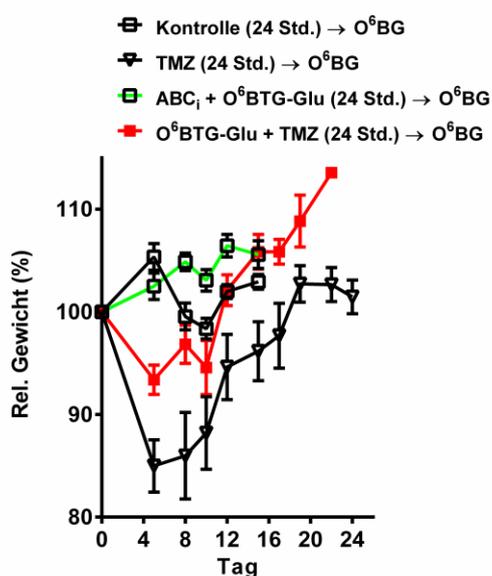
- (1) Es fand eine Behandlung mit 200 mg/kg TMZ anstelle vom CCNU statt. Diese Konzentration wurde in unabhängigen Experimenten bestimmt und lag sogar bei der intravenösen Verabreichung des Glukose-Konjugates höher als die maximale toxische Dosis nach intraperitonealer Injektion (Abb. 11).
- (2) 24 Stunden nach der TMZ-Injektion erfolgte eine zusätzliche Behandlung mit 30 mg/kg O⁶BG. Dies diente der Hemmung des MGMT-Proteins über einen längeren Zeitraum und imitierte die erfolgreiche Puls-Behandlung der *in vitro*-Experimente (Abb. 29)

Die alleinige Injektion von 200 mg/kg TMZ mit anschließender Applikation von O⁶BG nach 24 Stunden bewirkte eine starke Reduktion des Tumorwachstums bei einer akzeptablen Toxizität (Abb. 32b und c). Interessanterweise war der Verlauf des Tumorwachstums vergleichbar wie nach der Kombinationsbehandlung aus den MGMT-Hemmstoffen und der anschließenden Applikation von 150 mg/kg TMZ (Abb. 11). Diese Reduktion im Tumorwachstum wurde nicht durch eine zusätzliche Vorinkubation mit 62,5 mg/kg O⁶BTG-Glu *i.v.* gesteigert. Die Kombinationsbehandlung mit den ABC-Transporter-Hemmstoffen und O⁶BTG-Glu war unter diesen Bedingungen zu toxisch (4 von 6 Mäusen starben innerhalb 5 Tagen). Die Versuchsergebnisse zeigen, dass durch die Anwesenheit der Efflux-Hemmstoffe ebenfalls die Nebenwirkungen der Alkylantien-basierenden Therapie verstärkt werden. Diese sind unter anderem eine verstärkte Hemmung des MGMT-Proteins im Normalgewebe (siehe Diskussion).

a)

Behandlung	Behandelte Mäuse (Verstorben in 5 Tage)
Kontrolle (24 Std.) → 30 mg/kg O ⁶ BG	5 (1 Maus)
200 mg/kg TMZ i.p. (24 Std.) → 30 mg/kg O ⁶ BG	7 (keine)
ABC _i i.p. (10mg/kg Elacridar/200mg/kg Probenecid) + 62,5 mg/kg O ⁶ BTG-Glu i.v. (24 Std.) → 30 mg/kg O ⁶ BG	7 (keine)
O ⁶ BTG-Glu + TMZ (24 Std.) → 30 mg/kg O ⁶ BG	5 (keine)
ABC _i + O ⁶ BTG-Glu + TMZ (24 Std.) → 30 mg/kg O ⁶ BG	6 (4 Mäuse)

b)



c)

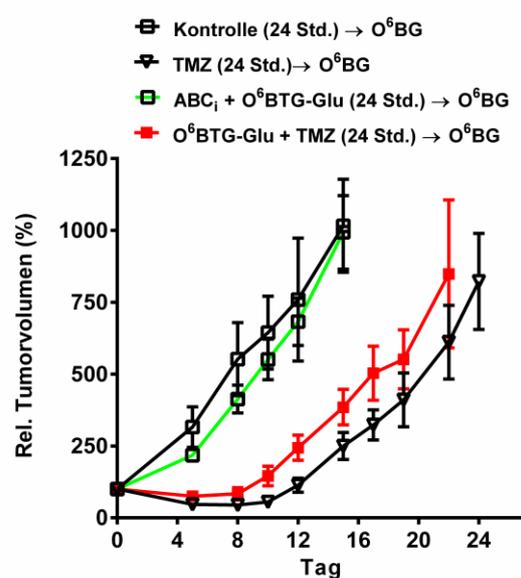


Abb. 32: Effekte von ABC-Transporter-Hemmstoffen im A375-Xenograft-Modell

a) Zusammenfassung der Gesamtanzahl verwendeter A375-tragender Balb/c nude Mäuse für die jeweiligen Behandlungen und die Todesfälle innerhalb der ersten 5 Tage. Wachstumskurve und Toxizität des A375-Xenograft-Modells nach Kombinationsbehandlung. Intravenöse Applikation von 10 % DMSO in 0,9 % NaCl (□, ▽) oder 62,5 mg/kg O⁶BTG-Glu in Ab- (■) oder Anwesenheit (■) einer 30-minütigen Vorinkubation der ABC-Transporter-Hemmstoffe (10 mg/kg Elacridar, 200 mg/kg Probenecid i.p.) für eine Inkubationsdauer von 2 Stunden, gefolgt von einer Behandlung mit 200 mg/kg TMZ. Nach 24 Stunden wurden alle Mäuse nochmals mit 30 mg/kg O⁶BG (gekennzeichnet durch den „→“) behandelt. Bestimmung des relativen Körperwichtes (b) oder des Tumorstadiums (c) über die Zeit. Die Werte repräsentieren den Mittelwert +/- Standardfehler von mind. 5 Mäusen pro Gruppe und beziehen sich jeweils auf den Tag 0 (Tag der Behandlung).

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die ABC-Transporter-Inhibitoren ebenfalls im Mausmodell eine Steigerung der MGMT-Hemmung durch das Glukose-Konjugat O⁶BTG-Glu im Tumor bewirken. Jedoch führte die Kombinationsbehandlungen mit den alkylierenden Agenzien nicht zum erwünschten Erfolg. Die unerwarteten Stoffeigenschaften des Glukose-Konjugates erschweren maßgeblich eine genaue Beurteilung der Auswirkung von Efflux-Hemmstoffen hinsichtlich der MGMT-Inhibitor-Targeting-Strategie im Mausmodell (siehe Diskussion).

4. Diskussion

4.1. Targeting-Strategie mit Glukose-konjugierten MGMT-Hemmstoffen

Krebs ist eine Krankheit, die über Veränderungen der Erbsubstanz DNA ausgelöst wird. Sie ist durch abnormales Wachstum von Körperzellen und deren Invasion in verschiedene Gewebe gekennzeichnet. Jedes Jahr erkranken 490.000 Menschen in Deutschland an dieser Krankheit und die Prognose sieht eine Steigerung der Neuerkrankungen um bis zu 30 % für das Jahr 2050 entgegen (www.krebshilfe.de). Trotz Behandlungserfolgen durch komplette Resektion des Tumors oder Strahlungstherapie (lokale Behandlungsvarianten) sind systemische Chemotherapeutika ein wichtiger Faktor der Tumorthherapie. Diese dienen der Behandlung von Metastasen, die die Hauptursache der Todesfälle darstellen ²⁰⁹. Chemotherapeutika beinhalten zytotoxische Agenzien sowie Substanzen, die eine Modulation von spezifischen Signalwegen in den Krebszellen bewirken (*targeted therapy*). Trotz der erfolgreichen Einführung neuer Substanzen in den letzten Jahren sind die Zytostatika, die eine Schädigung der DNA von Zellen bewirken, immer noch eine wichtige Behandlungsform (als Mono- oder Kombinationstherapie) von Tumoren ⁷.

Ein Problem der Tumorthherapie ist die Entwicklung von Resistenzmechanismen. Diese vermindern die Effektivität systemischer Chemotherapeutika in den Tumorzellen. Das DNA-Reparaturprotein O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase [MGMT] ist ein wichtiger Resistenzmechanismus gegenüber alkylierenden Zytostatika, deren Wirkung auf einer Alkylierungen der O⁶-Position des Guanins beruht. Die Zytostatika basierende Therapie von MGMT-exprimierenden Tumoren konnte durch den Einsatz konventioneller MGMT-Inhibitoren nicht verbessert werden. Die unselektive Hemmung von MGMT verursacht keine Steigerung des therapeutischen Indexes in der Kombinationsbehandlung (siehe 1.3.1.). Eine Alternative, die Kombination aus alkylierenden Zytostatika und MGMT-Hemmstoffen zu verbessern, besteht in der selektiven Akkumulation des Inhibitors im Tumorgewebe. Die Konjugation der Ausgangssubstanz an ein Glukosemolekül bietet eine Strategie, um ein aktives Tumor-Targeting zu erreichen ²¹⁰.

In vorherigen Studien wurden Glukose-Konjugate aus den MGMT-Inhibitoren O⁶-Benzylguanin [O⁶BG] und O⁶-(4-Bromothienyl)guanin [O⁶BTG] synthetisiert, die eine effektive MGMT-Hemmung aufweisen. Diese Zuckerkonjugate, O⁶BG-Glu und O⁶BTG-Glu, sind selbst nicht toxisch und benötigen keine metabolische Spaltung zur Hemmung des MGMT-Proteins ¹⁸⁰. Innerhalb dieses Projektes sollte die Effektivität der Glukose-Konjugate auf verschiedene Tumorzelllinien sowie in einem *in vivo*-Xenograft-Modell analysiert

werden. Die Konjugate O⁶BG-Glu und O⁶BTG-Glu inhibierten die MGMT-Aktivität verschiedener Tumorzelllinien für einen Zeitraum von 120 Stunden (Abb. 6 und 7). Des Weiteren reduzierte sich nach intraperitonealer Applikation von jeweils 100 mg/kg die MGMT-Aktivität (über 95 %) im humanen Xenograft-Modell; im Normalgewebe wurde nur eine ca. 50 %-ige Inaktivierung des MGMT-Proteins erreicht (Abb. 12). Die Behandlungen mit den Glukose-Konjugaten und dem methylierenden Agens Temozolomid [TMZ] reduzierte das Tumorwachstum im gleichen Ausmaß wie nach einer Vorbehandlung mit den unkonjugierten MGMT-Hemmstoffen. Eine Steigerung der Zytostatika-Dosis führte mit dem Glukose-Konjugat O⁶BTG-Glu nicht zum gewünschten Erfolg. Die höhere Konzentration, die für eine komplette MGMT-Hemmung notwendig war (ca. 2.5-fach höher als O⁶BTG), verstärkte die Alkylantien-induzierten Nebenwirkungen (Abb. 13).

Insgesamt ist die Verwendung des klassischen Xenograft-Mausmodells für diese Zwecke kritisch zu beurteilen. Speziesunterschiede in Expression und Funktion von Transportern erschweren die Voraussage der Effektivität in klinischen Studien, insbesondere für Targeting-Strategien, die auf einem aktiven Aufnahmemechanismus beruhen ²¹¹. Beim MGMT-Targeting müssen ebenfalls unterschiedliche Hemmwirkungen der Substanzen auf das murine und humane MGMT-Protein berücksichtigt werden. Dies wurde für die Glukose-Konjugate O⁶BG-Glu und O⁶BTG-Glu bestätigt (Abb. 8). Zurzeit existiert keine humanisierte MGMT-Maus, die das menschliche MGMT-Protein in allen Zellen exprimiert. Aber die Verwendung einer humanisierten Blutstammzellen-Maus zeigte eine unterschiedliche Sensitivität der murinen und humanen Blutstammzellen nach erfolgter Kombinationsbehandlung mit O⁶BG und TMZ ²¹². Dies zeigt die Notwendigkeit der Verwendung eines humanisierten Maussystems zur Beurteilung einer MGMT-Targeting-Strategie.

Das Hauptziel dieses Projektes bestand darin, eine selektive MGMT-Hemmung im Tumorgewebe zu erreichen, um somit die Reduktion der Zytostatika-Dosis in der Kombinationstherapie zu verhindern. Die Konjugation des hydrophilen Glukosemoleküls mit den MGMT-Inhibitoren O⁶BG oder O⁶BTG verhindert eine passive Diffusion der Glukose-Konjugate durch die Zellmembran. Deshalb ist die Involvierung eines aktiven Aufnahmemechanismus für die Konjugate Voraussetzung, um in die Zelle zu gelangen und das MGMT-Protein zu inhibieren. Eine Aufnahme durch den Glukosetransporter GLUT1, der in Tumorzellen überexprimiert wird, wurde für eine erfolgreiche Targeting-Strategie angestrebt. Die langsamere Hemmung des MGMT-Proteins durch die Glukose-Konjugate, im Vergleich zu den permeablen Inhibitoren O⁶BG und O⁶BTG (Abb. 5), sowie die fehlende Fähigkeit MGMT im reduzierten Temperaturbereich von 4°C zu inhibieren bestätigten die impermeablen Eigenschaften der Glukose-Konjugate O⁶BG-Glu und O⁶BTG-Glu. Zusätzlich wurde eine Rezeptor-vermittelte Aufnahme durch eine anschließende Überführung (nach

Vorinkubation bei 4°C und Entfernung des Inhibitors) in den standardisierten Temperaturbereich (37°C) ausgeschlossen (Abb. 14).

Zum Nachweis der Involvierung von Glukosetransportern in der Aufnahme der Glukose-Konjugate wurde für O⁶BG-Glu die Hemmung der MGMT-Aktivität und für das radioaktiv-markierte O⁶BTG-Glu die zelluläre Aufnahme in Anwesenheit spezifischer Hemmstoffe der Glukosetransporter (GLUT und SGLT) sowie unter veränderten Glukosekonzentrationen im Transportpuffer (Kompetition) analysiert. Die MGMT-Hemmung bzw. zelluläre Aufnahme wurde unter keinen Bedingungen reduziert (Abb. 15 und 18). Entgegen der Erwartung fand in Anwesenheit der GLUT- und SGLT-Inhibitoren eine schnellere MGMT-Hemmung statt. Dies liegt an den dualen Eigenschaften der Glukosetransporter-Inhibitoren. Flavonoide wie Phlorizin (inhibiert SGLT) und Phloretin (inhibiert GLUT) besitzen ebenfalls eine hemmende Wirkung auf ABC-Transporter. Somit ist der aktive Efflux von O⁶BG-Glu reduziert, was die schnellere MGMT-Hemmung bewirkt (siehe 3.2.). In einem weiteren Versuchansatz wurde die Rate der Glukoseaufnahme und des radioaktiven Glukose-Konjugates O⁶BTG-Glu in Fibroblasten und Tumorzellen analysiert. Die Tumorzelllinien zeigten im Vergleich zu den Fibroblastenzellen eine erhöhte Glukoseaufnahme. Bei der Aufnahme des ³H-O⁶BTG-Glu wurde kein Unterschied zwischen den Zelltypen festgestellt (Abb. 19). Die Gesamtheit der erzielten Resultate lassen darauf schließen, dass bei der aktiven Aufnahme der Glukose-Konjugate O⁶BG-Glu und O⁶BTG-Glu kein Glukosetransporter involviert ist.

Obwohl durch die Konjugation von Glukose an die klassischen MGMT-Hemmstoffe O⁶BG und O⁶BTG kein aktives Targeting über die Glukosetransporter stattfindet, blieb die Frage nach dem Aufnahmemechanismus offen. Dessen Identifikation könnte für zukünftige Strategien von Bedeutung sein. Die schnelle und effiziente Hemmung des MGMT-Proteins (innerhalb 60 Minuten für O⁶BTG-Glu und 240 Minuten für O⁶BG-Glu (Abb. 5)) in vielen humanen Zellen (Abb. 7) kann nur durch einen zelltyp-unabhängigen Aufnahmemechanismus oder die Involvierung von Transporter(n), die in verschiedenen Geweben vorkommen, erklärt werden.

Ein Transportmechanismus, der in allen Zellen stattfindet, ist der „Flip-Flop-Mechanismus“. Diese Art der Aufnahme über die Lipiddoppelschicht der Zellmembran (*transbilayer transport*) wird für eine Vielzahl von amphipathischen Molekülen beschrieben. Ein Molekül ist amphipatisch, wenn seine hydrophoben und hydrophilen Teile räumlich voneinander separiert sind. Diese molekulare Eigenschaft der Substanz ermöglicht den Transport durch die Zelle auf folgende Weise:

(1) Eine sofortige Bindung der Substanz an die äußere Schicht der Lipiddoppelschicht der Zellmembran. Der hydrophobe Bereich ragt in den hydrophoben Kern der Doppelschicht hinein und der hydrophile Teil interagiert mit den polaren Bereichen der Phospholipide und dem äußeren Milieu. Dieser Prozess geschieht in Millisekunden bis Sekunden^{213,214}. (2) Der Transport findet eher über eine Flip-Flop-Bewegung statt, anstatt durch passive Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten. (3) Im Inneren der Zelle besteht ein Konzentrationsgleichgewicht zwischen den Molekülen im Zytoplasma und den gebundenen Molekülen an der inneren Schicht der Plasmamembran.

Die Rate der Flip-Flop-Bewegung über die Lipiddoppelschicht variiert für die einzelnen Moleküle und beträgt Sekunden, Minuten, Stunden oder sogar Tage. Das Anthrazyklin Doxorubicin besitzt eine Flip-Flop-Rate mit einer Halbwertszeit von 0,7 Minuten, d.h. ein Molekül verbleibt 0,7 Minuten an der äußeren Membran, bevor es durch eine Flip-Flop-Bewegung ins Zellinnere transportiert wird. Die Flip-Flop-Rate der amphipathischen Moleküle ist von vielen Faktoren abhängig, u.a. Temperatur, Struktur und Eigenschaften der Moleküle, Bestandteile der Membran (Anteil von Proteinen, Cholesterol und Lipiden), Rate der initialen Bindung sowie die Stärke der Interaktionen mit der Zellmembran²¹⁵.

In den letzten Jahren wurde eine Involvierung von Carrier oder Transportern für die Aufnahme von Arzneistoffen intensiv diskutiert; besonders von Molekülen (lipophil, amphipatisch), die normalerweise keinen Transporter/Carrier benötigen um in die Zellen zu gelangen. Folgende Punkte stützen die Annahme, dass Arzneistoffe bevorzugt über Transporter aufgenommen werden:

(1) Moleküle akkumulieren bevorzugt in bestimmten Geweben, die nicht über eine passive Diffusion oder intrazelluläre Bindungen (Zielprotein) erklärt werden können. (2) Eine Vielzahl von Arzneimitteln werden durch einen oder mehrere Transporter aufgenommen. Die Transporterfamilien SLC21 (Organische-Anionentransporter) und SLC22 (Organische-Kationentransporter) weisen eine weite Gewebeverteilung auf und vermitteln den Transport von vielen Arzneistoffen. (3) Transporterproteine interagieren mit hydrophilen und/oder hydrophoben Bereiche der Substrate (identische Wechselwirkungen zu der Lipiddoppelschicht). (4) Die Existenz von Efflux-Transportern, die lipophile und amphipatische Moleküle transportieren, weist auf eine aktive Aufnahme derselben Moleküle durch diese oder ähnliche Transporterproteine hin²¹⁶.

Es sind über 400 Transporterproteine im menschlichen Genom identifiziert worden, deren komplettes Substratspektrum nicht bekannt ist. Deshalb ist eine Involvierung von Transportern für die aktive Aufnahme der Glukose-Konjugate nicht ausgeschlossen.

Zur Untersuchung des Aufnahmemechanismus der Glukose-Konjugate wurde eine Reihe von Experimenten durchgeführt und nur die Gesamtheit der Daten lässt eine sinnvolle Schlussfolgerung zu. **Insgesamt werden die Glukose-Konjugate O⁶BG-Glu und O⁶BTG-Glu bevorzugt über den Flip-Flop-Mechanismus aufgenommen:** Die Konjugate sind amphipathische Moleküle mit einem hydrophilen Glukosemolekül und einem großen hydrophoben Bereich, bestehend aus Linker und MGMT-Hemmstoff (Abb. 4). Die initiale Aufnahme nach 2 Minuten war in verschiedenen Zelllinien fast identisch (geringe Unterschiede sind aufgrund der unterschiedlichen Membranbestandteile der Zellen zu erklären) (Abb. 19) und eine Potenzierung der intrazellulären Akkumulation wurde aufgrund von Efflux-Transportern über die Zeit geringer (Abb. 17 und 19). Die Aufnahme der Glukose-Konjugate war temperaturabhängig (Abb. 14 und 20), gekennzeichnet durch eine schnelle initiale Bindung (an die Zellmembran oder Liposomen (Abb. 21)) und eine anschließende langsame Aufnahme durch den Flip-Flop-Mechanismus (Reaktion 1. Ordnung) (Abb. 5 und 17).

Die exakten Flip-Flop-Raten von O⁶BG-Glu und O⁶BTG-Glu konnten experimentell nicht analysiert werden. Jedoch wird aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten eine identische Geschwindigkeit vermutet. Obwohl der Flip-Flop-Mechanismus für die Hauptaufnahme verantwortlich ist, kann eine zusätzliche Involvierung von Transportern nicht ausgeschlossen werden.

Targeting-Strategien sind auf ein optimales Wirkstoffdesign angewiesen. Die Konjugation des Arzneistoffes an das Targeting-Molekül (z.B. Nährstoffe wie Glukose, Antikörper) sollte seine biologische Funktion nicht beeinträchtigen. Für die Glukose-Konjugate ist die Präsenz eines langen Linkers zwischen diesen Molekülen erforderlich (wahrscheinlich aufgrund sterischer Interaktionen), damit eine effiziente Hemmwirkung auf das MGMT-Protein bestehen bleibt ²¹⁷. Die Auswahl des Linkers (Länge, molekulare Eigenschaften) beeinflussen die pharmakokinetischen und –dynamischen Prozesse der Konjugate ^{218,219}. Im Falle der Glukose-Konjugate wurde ein hydrophober Linker mit 8 Alkylgruppen verwendet, der zu den amphipathischen Eigenschaften des Moleküls führte (Abb. 4). Diese amphipathische Stoffeigenschaft der Glukose-Konjugate O⁶BG-Glu und O⁶BTG-Glu bevorzugt die Aufnahme über den Flip-Flop-Mechanismus (siehe oben). Die Verwendung eines hydrophoben Linkers führt noch zu weiteren Eigenschaften der Glukose-Konjugate. Der starre Alkylgruppen-Linker führt zu strukturellen Ähnlichkeiten mit Glykolipiden oder Tensiden. Diese Moleküle besitzen in wässrigen Lösungen die Tendenz zur Partikelbildung in Form von Liposomen oder Mizellen ¹⁹⁹.

Für die Glukose Konjugate O⁶BG-Glu und O⁶BTG-Glu wurde ebenfalls eine Partikelbildung durch die dynamische Lichtstreuung bestätigt (Abb. 22). Die *critical micellen concentration* [CMC] wurde nicht bestimmt, jedoch ist eine Formierung der Mizellen-ähnlichen Partikeln schon bei *in vitro*-relevanten Konzentrationen zu beobachten (für O⁶BG-Glu ab 5 µM und für O⁶BTG-Glu ab 25 µM). Die Messungen weisen auf eine größere Tendenz zur Partikelbildung für O⁶BG-Glu hin (eventuell aufgrund der hydrophoben Benzylgruppe im Vergleich zur hydrophilen Bromthiophengruppe), die im Vergleich zu den Mizellen-ähnlichen Partikeln aus O⁶BTG-Glu wahrscheinlich auch stabiler sind. Die Anzahl der Monomere in Lösung steigt bis zur Partikelbildung (CMC) kontinuierlich an und eine weitere Konzentrationssteigerung der Substanz erhöht nur die Anzahl der Partikel bei identischen aktiven Monomeren. Die verwendeten *in vitro*-Konzentrationen betragen für O⁶BG-Glu 25 µM und O⁶BTG-Glu 5 µM. Da die CMC für O⁶BG-Glu bei 5 µM liegt, wird für die Glukose-Konjugate eine ähnliche Monomeranzahl in den *in vitro*-Experimente angenommen. Die exakten biophysikalischen Vorgänge der Glukose-Konjugate in wässrigen Lösungen können nicht analysiert werden, aber es ist eine plausible Annahme, dass vor der Formierung der messbaren Partikel schon intermediäre Strukturen vorliegen. Ob eine Adsorption dieser Zwischenprodukte an die Membran stattfindet ist spekulativ. Des Weiteren kann keine Aussage über die Stabilität der Partikel, die exakte Form oder ob ein dynamischer Austausch mit Monomeren in der Lösung stattfindet getroffen werden.

Vieles von den biophysikalischen Stoffeigenschaften der Glukose-Konjugate ist nicht bekannt. Aber die Fähigkeit zur Partikelbildung hat weitreichende Konsequenzen auf die Effektivität der Glukose-Konjugate. In allen durchgeführten *in vitro*-Experimenten entsprechen die eingesetzten Konzentrationen nicht der Anzahl an Monomeren in der Lösung (insbesondere für O⁶BG-Glu). Die Formierung der intermediären Strukturen und Mizellen-ähnlichen Partikeln reduzieren die Anzahl der aktiven Monomere. Somit wird die aktive Aufnahme der Glukose-Konjugate und damit ihre intrazelluläre Konzentration (Abhängig von der Konzentration in Lösung) beeinflusst. Beim Xenograft-Mausmodell wurden die Glukose-Konjugate bevorzugt als Mizellen-ähnliche Strukturen appliziert (intraperitoneal [i.p.] und intravenös). Dies erklärt die Notwendigkeit von hohen Konzentrationen für eine komplette MGMT-Hemmung. Die Applikation von hohen Dosen (i.p.), bei einem unselektiven Aufnahmemechanismus der Glukose-Konjugate, führte bei den Kombinationsbehandlungen mit TMZ zur identischen oder gesteigerten Toxizität im Vergleich zu den Inhibitoren O⁶BG und O⁶BTG. Bei der intravenösen Applikation der Glukose-Konjugate ist wahrscheinlich eine MGMT-Hemmung aufgrund einer passiven Targeting-Strategie zu erwarten. Die Mizellen-ähnlichen Strukturen (identisch zu Liposomen, Nanopartikeln) werden durch den Blutkreislauf zum Tumor transportiert und akkumulieren dort aufgrund der erhöhten Permeabilität und Retention [EPR-Effekt] im Tumorgewebe ¹⁴². Jedoch war mit dieser Strategie keine 100 %-ige MGMT-Hemmung im Tumor zu erreichen.

Eine Targeting-Strategie aufgrund des gesteigerten Glukoseverbrauchs der Tumorzellen ist ein wirkungsvoller Ansatz. Diese Strategie wird schon seit Jahren in der Diagnostik (18-FDG) und zur Behandlung einiger Tumorarten verwendet (u.a. Streptozotocin für Pankreaskarzinome)¹⁵⁹. Es muss jedoch sichergestellt werden, dass die Substanz von einem Glukosetransporter (der im Zielgewebe überexprimiert wird) aufgenommen wird. Dieses Ziel wird nicht durch eine simple Konjugation von Glukose an den Wirkstoff erreicht, sondern erfordert jahrelange Analysen zur Bestätigung der Targeting-Strategie und Vermeidung von Fehlerquellen. Deshalb sind weitere Targeting-Strategien, die eine Konjugation von Glukose an ein Arzneimittel beinhalten (z.B. Glukose-Paclitaxel), noch nicht erfolgreich in klinischen Studien getestet worden.

Das Hauptziel des Projektes wurde nicht erreicht: Die Glukose-Konjugate O⁶BG-Glu und O⁶BTG-Glu ermöglichen keine selektive Hemmung des MGMT-Proteins im Tumor. Dennoch wurden wichtige Erkenntnisse gesammelt, um für zukünftige Targeting-Strategien wichtige Fehlerquellen zu vermeiden. **Die Verwendung des hydrophoben Linkers war für das gesamte Projekt kontraproduktiv. Der hydrophobe Linker verursacht die stark amphipathischen Eigenschaften der Konjugate, was zur Aufnahme über den Flip-Flop-Mechanismus und zur Partikelbildung führt.** Ein hydrophiler Linker ist für eine zukünftige Strategie eine Notwendigkeit. Vorherige Versuche bestätigten den Austausch des hydrophoben Linkers durch eine flexiblere Variante, jedoch ist die Länge von entscheidender Bedeutung für die Inhibitionsfähigkeit des Konjugates. Eine Alternative wäre die Verwendung eines hydrophilen Polyethylenglykol-Linkers, der schon erfolgreich bei der Konjugation von Antikörpern verwendet wird²¹⁷. Eine weitere Änderung die unbedingt berücksichtigt werden sollte, ist die Verwendung von O⁶BTG als Ausgangssubstanz. Die Gründe dafür werden im nächsten Kapitel erläutert.

Abbildung 33 zeigt eine Zusammenfassung der Glukose-Konjugate, im Hinblick auf ihre Aufnahme, Partikelbildung und weiteren Einflussgrößen, die für eine erfolgreiche Targeting-Strategie berücksichtigt werden sollten.

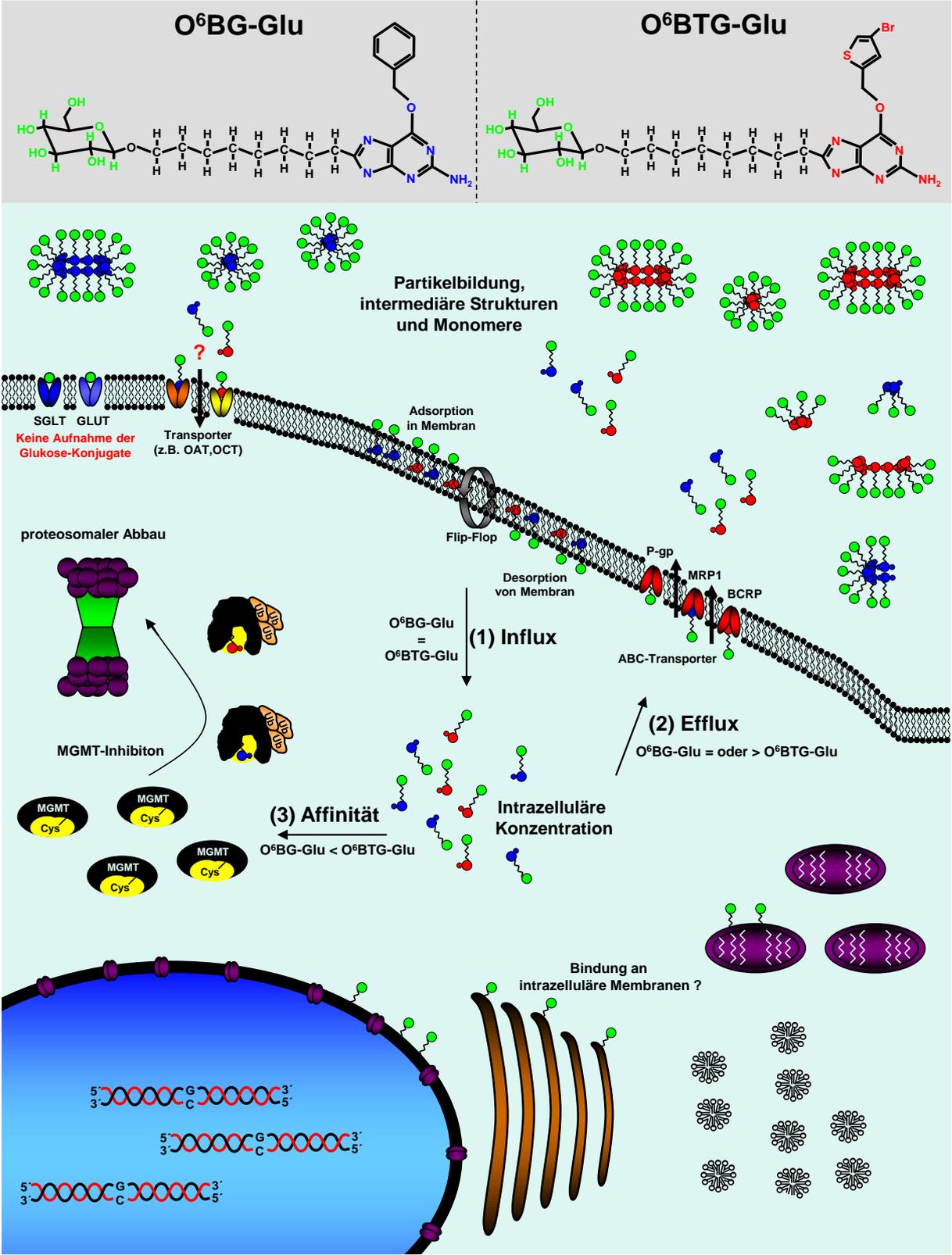


Abbildung 33: Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse hinsichtlich der Aufnahme, dem Efflux und den biophysikalischen Stoffeigenschaften der Glukose-Konjugate O⁶BG-Glu und O⁶BTG-Glu. Vergleich der Glukose-Konjugate hinsichtlich der wichtigen Parameter Influx, Efflux und Affinität zum MGMT-Protein, die eine erfolgreiche Targeting-Strategie beeinflussen. Details siehe Diskussion.

4.2. Einfluss von ABC-Transportern auf Targeting-Strategien mit MGMT-Hemmstoffen

Die Therapie mit systemisch verabreichten Chemotherapeutika ist aus verschiedenen Gründen nicht immer erfolgreich. Ein wichtiger Faktor ist die Entwicklung der *multidrug resistance* (MDR). Es existieren 3 Hauptmechanismen, die zur Resistenz in Tumorzellen führen: (1) reduzierte Aufnahme der hydrophilen Substanzen durch Transporter/Rezeptor. (2) Modulation der Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika; aufgrund gesteigerter DNA-Reparatur, Veränderungen im Zellzyklus oder Metabolismus, reduzierte Induktion des Zelltodes. (3) Aktiver Efflux der Substanzen durch ABC-Transporter, die eine Reduzierung der intrazellulären Konzentration bewirken²²⁰.

Die Involvierung von ABC-Transportern in der MDR ist schon seit Jahrzehnten bekannt. Während der letzten 20 Jahre wurden eine Vielzahl von Inhibitoren für die Efflux-Transporter (vorwiegend P-gp, MRP1, BCRP) entwickelt, um die Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika wieder herzustellen. Die vielversprechenden *in vitro*-Resultate der ABC-Hemmstoffe wurde in den anschließenden klinischen Studien nicht bestätigt¹⁶⁷. Die Hauptgründe liegen im schlechten Studiendesign (keine Analyse der ABC-Transporter-Expression in den Tumoren, Auswahl des falschen Chemotherapeutikums) und den veränderten pharmakokinetischen Eigenschaften des Arzneistoffes. Die veränderte Pharmakokinetik des Chemotherapeutikums führte zur Steigerung der Nebenwirkungen und erforderte eine Dosis-Reduktion, sodass der therapeutische Index nicht verbessert wurde. Im Laufe der Zeit wurden weitere Strategien entwickelt, die den Einfluss der MDR durch ABC-Transporter reduzieren sollen. Diese beinhalten eine Hemmung der Efflux-Transporter über Peptide oder Antikörper, eine gezielte Herunterregulierung der ABC-Transporter im Tumorgewebe, Schutz des Patienten vor den Nebenwirkungen durch eine Überexpression von ABC-Transportern in Stammzellen oder die Entwicklung/Modifikation von Arzneistoffen zur Reduktion des aktiven Effluxes¹⁶⁷.

Insgesamt besitzen ABC-Transporter einen großen Einfluss auf die pharmakokinetischen Eigenschaften der Arzneimittel, sind an vielen zellulären Prozessen beteiligt und führen zur MDR in Tumorzellen. Aus diesen Gründen sollte bei der Entwicklung neuer Arzneimittel und Targeting-Strategien die Analyse des aktiven Transportes (Influx und Efflux) eine notwendige Voraussetzung sein. Die Notwendigkeit dieser Analysen wurde von der *US Food and Drug Administration* [FDA] empfohlen²²¹.

Die Daten im ersten Teil der Diskussion widerlegen eine erfolgreiche Targeting-Strategie durch die Glukose-Konjugate O⁶BG-Glu und O⁶BTG-Glu. Der Grund ist die Verwendung des hydrophoben Alkylgruppen-Linkers, der eine Partikelbildung und die Aufnahme über den Flip-Flop-Mechanismus begünstigt (Diskussion 3.1.).

Dennoch blieb die Frage nach der unterschiedlichen Effektivität der Glukose-Konjugate offen. In vorherigen Studien wurde die Fähigkeit zur Sensibilisierung gegenüber alkylierenden Agenzien vorzugsweise mit dem Konjugat O⁶BTG-Glu analysiert. Jedoch besitzen beide Glukose-Konjugate eine akzeptable Inhibitionsfähigkeit. Der IC₅₀-Wert für HeLa S3-Zellextrakte beträgt für O⁶BG-Glu 1,1 µM und O⁶BTG-Glu 0,032 µM (im Vergleich zu O⁶BG und O⁶BTG von jeweils 0,3 und 0,009 µM). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit beide Glukose-Konjugate verwendet ¹⁸⁰.

Die ersten Experimente zeigten einen Unterschied der Effektivität zwischen den beiden Glukose-Konjugaten. Obwohl alle Hemmstoffe die MGMT-Aktivität von verschiedenen Zelllinien über einen langen Zeitraum inaktivierten (Abb. 5 bis 7), sensibilisierte nur das Glukose-Konjugat O⁶BTG-Glu die Tumorzellen im selben Ausmaß wie die Inhibitoren O⁶BG und O⁶BTG. Das Konjugat O⁶BG-Glu war bei der Verwendung von 50 µM TMZ und 20 µM Lomustin [CCNU] nur bei bestimmten Zelllinien wirksam, wobei die Behandlung mit dem chlorethylierenden Zytostatikum CCNU effektiver war (Abb. 9 und 11). Die Induktion der Apoptose wurde für O⁶BG-Glu in einigen Zelllinien (T98G, A375) über eine Dosis-Erhöhung des methylierenden Agens TMZ oder N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin [MNNG] gesteigert. Bei diesen hohen Konzentrationen der methylierenden Agenzien war das Apoptoseniveau identisch zur O⁶BG-Behandlung. Jedoch war dieser Effekt nur zelltypspezifisch, da die Kolonkarzinomzelllinie HT29 auch weiterhin resistent gegenüber der hohen Dosis TMZ blieb (Abb. 10).

Die reduzierte Induktion des Zelltodes nach Behandlung der Zellen mit 50 µM TMZ lässt sich durch eine geringe Restaktivität von MGMT erklären. Die DNA-Läsionen O⁶MeG und O⁶ClEtG führen zu pleiotropen Effekten (Einleitung Abb. 2 und 3). DNA-Schäden führen erst nach der Überschreitung eines kritischen Schwellenwertes (*DNA-damage threshold*) zur Induktion des Zelltodes. Das Ausmass des Zelltodes korreliert dabei mit der Menge an gebildeten Doppelstrangbrüchen [DSB]. Dieser *DNA damage threshold* variiert zwischen Zellen und ist von vielen Faktoren abhängig, u.a. der DNA-Reparaturkapazität, Zellzyklus, Expression von Proteinen der Zelltodmechanismen (1.1.1.). Für einen maximalen therapeutischen Effekt durch die Kombinationsbehandlung aus MGMT-Hemmstoff und alkylierendem Zytostatikum sollte die MGMT-Aktivität kontinuierlich inaktiviert sein ^{183,222}. Auf diese Weise ist sichergestellt, dass die O⁶-Alkylguanin-Läsionen über die Zeit nicht

repariert werden und somit die maximale Anzahl an DSB entsteht. Die Behandlung mit O⁶BG-Glu und die Verabreichung des Zytostatikums (das zusätzlich nochmal die MGMT-Aktivität reduziert) waren nicht effektiv genug, um eine kontinuierliche MGMT-Inaktivierung zu erreichen. Aufgrund der Resynthese des MGMT-Proteins (Abb. 5) wurden die O⁶-Alkylguanin-Läsionen über die Zeit entfernt und die Bildung der DSB reduziert. Dies bewirkte eine reduzierte (für T98G und A375) Induktion der Apoptose nach der Behandlung mit 50 µM TMZ. Erst über eine Dosis-Steigerung auf 150 µM TMZ wurden DSB in ausreichender Menge induziert, um die DNA-Reparaturkapazität zu sättigen und somit den Zelltodmechanismus der Zelle auszulösen.

Das chlorethylierende Agens CCNU war im Vergleich zu TMZ effektiver in der Induktion der Apoptose. Die meisten Tumorzelllinien wurden durch O⁶BG-Glu gegenüber dem chlorethylierenden Zytostatikum sensibilisiert (Ausnahme bilden die Kolonkarzinomzellen). Dies liegt an den folgenden Gründen:

(1) Die O⁶CIeTG-Läsion bildet in den ersten 12 Stunden einen *Interstrand-Crosslink* [ICL], der nicht mehr vom MGMT-Protein repariert werden kann. Im Gegensatz dazu ist die Persistenz der O⁶MeG über zwei Replikationszyklen erforderlich, um die Prozessierung der Läsion und die DSB-Bildung zu gewährleisten. Dies bietet dem MGMT-Protein eine lange Zeitspanne zur Reparatur der O⁶MeG im Vergleich zu O⁶CIeTG. (2) Das MGMT-Protein hat eine höhere Affinität zur Methylgruppe. (3) Für die Formierung eines DSB sind weniger O⁶CIeTG-Läsionen erforderlich als O⁶MeG-Läsionen.

Die Beobachtung, dass O⁶BG-Glu im Vergleich zu O⁶BTG-Glu nur eine unvollständige MGMT-Hemmung bewirkte, fordert eine kritische Beurteilung der Messdaten sowie die Identifikation des zugrundeliegenden Mechanismus. Jeder experimentelle Assay besitzt ein Detektionslimit; der des MGMT-Assays liegt bei 0,63 fmol/mg Protein³². Aus diesem Grund können Zelllinien, in denen keine MGMT-Expression nachgewiesen wird, dennoch eine geringe Reparaturkapazität aufweisen. Dies wurde in Mutationsanalysen gezeigt²²³. Desweiteren ist die Herstellung und Verwendung von Zellextrakten ein wichtiger Faktor bei der Analyse der MGMT-Aktivität. Es wurde jedoch festgestellt, dass die MGMT-Aktivität in lebenden Zellen bis zu 15 % höher ist als in Zellextrakten, die aus den selben Zellen hergestellt wurden²²⁴. Aus diesem Grund könnte nach der Behandlung mit den MGMT-Inhibitoren die verbleibende MGMT-Aktivität höher liegen als in den Experimenten bestimmt wurde. In der Gesamtheit würde eine höhere MGMT-Aktivität die geringere Sensibilisierung durch O⁶BG-Glu erklären.

Aber die Diskrepanz der gemessen und tatsächlich vorliegenden MGMT-Aktivitäten erklärt nicht die unterschiedliche Wirkung der Glukose-Konjugate. Die plausibelste Erklärung besteht in der Korrelation der MGMT-Aktivität mit dem Ausmaß der Apoptoseinduktion. O⁶BG-Glu besitzt im Vergleich zu O⁶BTG-Glu einen verminderten IC₅₀-Wert und könnte deshalb nur Tumorzellen mit einer niedrigen MGMT-Aktivität sensibilisieren. Aber wie in Abbildung 40 ersichtlich ist, besteht keine eindeutige Korrelation zwischen Sensibilisierung der Tumorzelllinien und ihrer MGMT-Aktivität nach Behandlung mit O⁶BG-Glu und den Zytostatika TMZ und CCNU. Eine Ursache für die fehlende Korrelation sind intrazelluläre Resistenzmechanismen der Tumorzelllinien, zu denen Faktoren wie der p53-Status der Zelllinie, endogene FasR-Expression und DNA-Reparaturkapazität gehören.

Ein weiterer Resistenzmechanismus von Tumorzellen sind ABC-Transporter (1.4.). Die Efflux-Transporter beeinflussen die therapeutische Effektivität von Arzneimitteln, indem sie die intrazelluläre Konzentration im Tumor reduzieren ²²⁰. Das Prinzip der verminderten intrazellulären Konzentration bietet eine plausible Erklärung für die Unwirksamkeit von O⁶BG-Glu. ABC-Transporter wurden bisher nie mit der Effektivität von MGMT-Hemmstoffen oder MGMT-Targeting-Strategien in Verbindung gebracht. Der Einfluss von ABC-Transporter auf die Glukose-Konjugate (O⁶BG-Glu, O⁶BTG-Glu) sowie auf die klassischen MGMT-Hemmstoffe (O⁶BG, O⁶BTG) wurde in dieser Arbeit untersucht.

Die Glukose-Konjugate O⁶BG-Glu und O⁶BTG-Glu zeigen beide die Fähigkeit zur Partikelbildung und verwenden den gleichen Aufnahmemechanismus, um in die Zellen zu gelangen. Die Flip-Flop-Raten und die Anzahl der Monomere der Glukose-Konjugate sollten bei den verwendeten *in vitro*-Konzentrationen annähernd identisch sein (siehe Diskussion 4.1.). Deshalb wurde eine verstärkte Aufnahme von O⁶BTG-Glu im Vergleich zu O⁶BG-Glu als unwahrscheinlich angesehen. Trotzdem blieb die Frage offen, ob ein verstärkter Efflux von O⁶BG-Glu stattfindet (unterschiedliche intrazelluläre Konzentrationen) oder die Affinitätsunterschiede zum MGMT-Protein (identische intrazelluläre Konzentration und Efflux) die Diskrepanz in der Effektivität bewirken.

Die Überprüfung dieser Hypothesen begann mit den Expressionsanalysen der drei ABC-Transporter, die am häufigsten mit einer MDR in Verbindung gebracht werden. Dabei wurde festgestellt, dass die Expressionsdaten der Efflux-Transporter mit den Daten der Sensibilisierung korrelieren (Abb. 23). Zelllinien, die nur eine geringe Induktion des Zelltodes nach O⁶BG-Glu-Behandlung aufwiesen (T98G, A375, HT29), exprimieren ABC-Transporter im höheren Ausmaß als die Zelllinien, die eine hohe Sensibilisierung gegenüber O⁶BG-Glu und 50 µM TMZ zeigten (D05). Jedoch ist zu beachten, dass die Efflux-Kapazität der ABC-Transporter enorm hoch ist. Jeder einzelne P-gp Transporter befördert in einer Sekunde

1-10 Substrate aus der Zelle ²²⁵. Deswegen ist bei den Zelllinien DO5 und GBP61, die im Vergleich zu T98G nur eine geringe Expression an ABC-Transporter aufweisen, immer noch ein aktiver Efflux der MGMT-Hemmstoffe möglich. In dieser Arbeit wurden nur die Efflux-Transporter P-gp, MRP1 und BCRP untersucht. Jedoch wurden bisher 15 ABC-Transporter mit einer MDR in Verbindung gebracht ²²⁶. Der Einfluss von zusätzlichen ABC-Transportern auf den Efflux der Glukose-Konjugate oder den Inhibitoren O⁶BG und O⁶BTG kann nicht ausgeschlossen werden.

Die simultane Inkubation der Glukose-Konjugate mit Hemmstoffen der ABC-Transporter bewirkte eine schnellere Inaktivierung des MGMT-Proteins (Abb. 24) und steigerte für O⁶BG-Glu die Induktion der Apoptose nach TMZ-Behandlung in den resistenten Zelllinien (Abb. 27 und 28). Für eine maximale Induktion der Apoptose durch O⁶BG-Glu war die Hemmung der drei ABC-Transporter P-gp, MRP1 und BCRP erforderlich, wobei die Inhibition jedes einzelnen Efflux-Transporters für sich schon eine gesteigerte Apoptose bewirkte. Des Weiteren bewirkte eine 24-stündige Puls-Behandlung von O⁶BG-Glu in Anwesenheit der ABC-Transporter-Hemmstoffe und der weiteren Inkubation mit O⁶BG-Glu nicht die maximale Induktion der Toxizität (Abb. 27a). Die geringe MGMT-Menge, die nach 24 Stunden wiedererlangt wurde, schützte die Zellen vor der Bildung zusätzlicher DSB. Die Kolonkarzinomzelllinie HT29 war auch in Gegenwart der drei ABC-Transporter-Hemmstoffe nicht im selben Ausmaß zu sensibilisieren wie mit den anderen MGMT-Hemmstoffen (Abb. 9 und 27). Dies könnte mit der erhöhten Expression des MGMT-Proteins und der Anwesenheit zusätzlicher ABC-Transporter zusammenhängen, die einen aktiven Efflux von O⁶BG-Glu bewirken und somit die intrazelluläre Konzentration auf ein unwirksames Niveau senken. Für das Glukose-Konjugat O⁶BTG-Glu und den beiden Inhibitoren O⁶BG und O⁶BTG musste die Konzentration in den *in vitro*-Experimenten reduziert werden, um den Einfluss der ABC-Transporter auf die Alkylantien-induzierte Toxizität zu analysieren. Die hohen Dosen inaktivierten das MGMT-Protein schon über einen langen Zeitraum, sodass die Präsenz der ABC-Transporter-Hemmstoffe keinen zusätzlichen Effekt bewirkte. Bei Verwendung der reduzierten Konzentrationen (die eine ca. 90 %-ige Hemmung der MGMT-Aktivität bewirkten) steigerte die simultane Hemmung der ABC-Transporter ebenfalls die Induktion der Apoptose. Identisch zu O⁶BG-Glu wurde die maximale Toxizität nur mit einer vollständigen MGMT-Hemmung nach 24 Stunden erreicht (Abb. 29 und 30). Dies weist darauf hin, dass eine dauerhafte Inhibition der ABC-Transporter benötigt wird (länger als 24 Stunden), um die vollständige Sensitivität wieder herzustellen. Erfolgt die Hemmungen der Efflux-Transporter nur für eine kurze Dauer erlangen die Tumorzellen, aufgrund der Resynthese des MGMT-Proteins, einen Teil ihrer Reparaturkapazität zurück. Die geringe MGMT-Aktivität entfernt die induzierten O⁶MeG-Läsionen und vermittelt somit die Resistenz der Tumorzellen gegenüber alkylierenden Zytostatika. Dieses Wissen ist für *in vivo*-Studien von Bedeutung, da identisch zu den MGMT-Inhibitoren die ABC-Transporter-Hemmstoffe über einen langen Zeitraum kontinuierlich appliziert werden sollten, um eine maximale Effektivität zu erreichen.

Die Messungen im Akkumulations- und Efflux-Experiment weisen darauf hin, dass alle MGMT-Hemmstoffe als Substrate für Efflux-Transporter fungieren (Abb. 25 und 28). Die Glukose-Konjugate sowie die Inhibitoren O⁶BG und O⁶BTG beeinflussten im unterschiedlichen Ausmaß die Efflux-Kapazität der ABC-Transporter P-gp, MRP1 und BCRP. Interessanterweise zeigen die Daten, dass O⁶BTG-Glu im Gegensatz zu O⁶BG-Glu einen höheren Einfluss auf die einzelnen ABC-Transporter ausübt.

Diese Ergebnisse widerlegen die anfängliche Hypothese, dass eine höhere Efflux-Rate von O⁶BG-Glu im Vergleich zu O⁶BTG-Glu die verminderte Effektivität von O⁶BG-Glu zur Sensibilisierung gegenüber Zytostatika darstellt. Eine exakte Interpretation der Resultate wird jedoch durch folgende Faktoren erschwert: (1) Die Anzahl der Monomere der Glukose-Konjugate könnte bei der Verwendung von 100 µM aufgrund der verschiedenen CMC unterschiedlich sein. Deshalb stehen bei O⁶BTG-Glu mehr Monomere zur Konkurrenz der Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung. (2) Beide Experimente lassen keine Unterscheidung zwischen Inhibitoren, Substraten oder Modulatoren der einzelnen ABC-Transporter zu. Es wird nur die Reduktion des Effluxes der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe analysiert ²²⁷.

Interessanterweise ist der Einfluss von O⁶BTG auf die drei ABC-Transporter ebenfalls höher als von O⁶BG (die beiden sollten eine identische Monomeranzahl aufweisen). Eine große Anzahl an Substanzen fungieren als Inhibitoren, Substrate oder Modulatoren der einzelnen ABC-Transporter ²²⁸. Geringe Veränderungen der Molekülstruktur beeinflussen die Efflux-Kapazität der Transporter ²²⁹, aufgrund von veränderten Interaktionen zwischen Molekül und Transporter. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Bromthiophengruppe andere Interaktionen mit den Efflux-Transportern bewirkt. Aus diesem Grund könnten die MGMT-Hemmstoffe O⁶BTG und O⁶BTG-Glu mit einer verminderten Efflux-Rate aus der Zelle ausgeschleust werden. Eine genaue Analyse der MGMT-Hemmstoffe hinsichtlich deren Einfluss auf die ABC-Transporter kann nur mit zusätzlichen Experimenten erfolgen, u.a. ATPase-Aktivitäts-Assay, bidirektionaler Transport-Assay ²³⁰. Die folgenden Fragestellungen könnten untersucht werden: (1) Bewirkt die Bromthiophengruppe im Vergleich zur Benzylgruppe eine Reduktion des Effluxes durch bestimmte ABC-Transporter. (2) Beurteilung der Substratstärke von MGMT-Hemmstoffen im Vergleich zu anderen Arzneimitteln (3) Werden MGMT-Hemmstoffe von mehreren ABC-Transportern erkannt und heraustransportiert (über P-gp, MDR1, BCRP hinaus). (4) Bewirken MGMT-Hemmstoffe (identisch zu Verapamil) eine Stimulation der Efflux-Kapazität von MRP1 (Abb. 25a).

Diese zusätzlichen Analysen sind jedoch nicht für die Glukose-Konjugate O⁶BG-Glu und O⁶BTG-Glu sinnvoll. Eine Targeting-Strategie ist mit den Glukose-Konjugaten in dieser Form nicht möglich. Eine Veränderung der Molekülstruktur (z.B. Austausch des Linkers) bewirkt neue Eigenschaften des Moleküls und somit muss der Einfluss auf die Efflux-Transporter von Grund auf neu untersucht werden.

Die Gesamtheit der Untersuchungen zeigte eindeutig, dass **die Glukose-Konjugate O⁶BG-Glu und O⁶BTG-Glu sowie die klassischen Inhibitoren O⁶BG und O⁶BTG als Substrate für einen oder mehrere ABC-Transporter dienen.**

In der vorliegenden Arbeit wurde das erste Mal eine Involvierung von ABC-Transportern auf die Effektivität von MGMT-Hemmstoffen nachgewiesen. Die Efflux-Transporter in Tumoren reduzieren die intrazelluläre Konzentration von MGMT-Inhibitoren und wirken somit der Entstehung einer therapeutisch wirksamen Dosis zur dauerhaften MGMT-Hemmung entgegen. Diese Annahme wird durch weitere Studien in der Literatur unterstützt.

Targeting-Strategien zur gezielten Hemmung des MGMT-Proteins in Tumorzellen waren bisher nicht erfolgreich. In allen Studien wurde O⁶BG (mit der geringeren Hemmwirkung) als Ausgangssubstanz verwendet. Die Konjugation an Folat¹³⁸ sowie ein Targeting aufgrund des hypoxischen Tumormilieus¹³⁹ sensibilisierten *in vitro* die Tumorzelllinien gegenüber chlorethylierenden Agenzien (1.3.1.). Daten für methylierende Agenzien oder *in vivo*-Mausmodelle wurden nicht gezeigt. Dies lässt die Spekulation zu, ob eine Sensibilisierung gegenüber methylierenden Zytostatika (wie bei O⁶BG-Glu) aufgrund des Einflusses von ABC-Transportern nicht erfolgreich war.

Die MGMT-Inhibitoren O⁶BG und O⁶BTG wurden in vielen klinischen Studien hinsichtlich ihrer Konzentration zur MGMT-Inaktivierung im Tumor analysiert. Die Applikation von verschiedenen Dosen führte bei Patienten mit gleichen oder unterschiedlichen Tumorarten zu unterschiedlichen Effektivität in der MGMT-Hemmung. Viele Faktoren können für diesen Effekt verantwortlich sein. Jedoch ist eine plausible Annahme, dass die unterschiedliche Expression der ABC-Transporter das Ausmaß der MGMT-Hemmung in den Tumoren beeinflusst. In diesen Studien wurde keine Analyse hinsichtlich einer bestehenden Korrelation zwischen MGMT-Hemmung und Expression von Efflux-Transportern durchgeführt^{231,232}.

Die unvollständige Inaktivierung des MGMT-Proteins im Tumor besitzt negative Auswirkungen auf die Therapie und könnte zusätzlich die Entwicklung von resistenten Tumoren aufgrund einer erhöhten Mutationsrate fördern. Die O⁶MeG-Läsion (hauptverantwortliche Läsion für die Toxizität von methylierenden Zytostatika) wird replikationsabhängig über die Basenfehlpaarungsreparatur [MMR] in Doppelstrangbrüche [DSB] prozessiert. Ein Teil der transienten DSB werden über die homologe Rekombination [HR] repariert und führen zur Entstehung von Schwesterchromatidaustauschen [SCE]. Die DSB, die nicht repariert wurden, führen zu chromosomale Abberationen [CA] oder zum Zelltod (bei Überschreitung des *DNA damage threshold*). In den folgenden Generationen werden die persistierenden O⁶MeG-Läsionen auf die Tochterzellen weitergegeben und es findet eine erneute Prozessierung zu DSB statt. Dabei wird der DNA-Schaden der Zelle über

die Generation hinaus potenziert. Zu den vorhandenen DNA-Schäden, aufgrund der Formierung der DSB und CA in der ersten Generation, entstehen immer wieder zusätzliche DSB und CA in den Zellen. Ist ein Ausmaß an DNA-Schäden erreicht, dass die Zellen nicht mehr tolerieren können, wird der Zelltod ausgelöst⁴² (Abbildung 2 Einleitung). Aus diesem Grund führt eine Behandlung mit methylierenden Agenzien erst nach mehreren Replikationszyklen zum Zelltod. Desweiteren ist für die maximale Induktion des Zelltodes eine komplette MGMT-Inaktivierung über einen langen Zeitraum nötig. In der Anwesenheit einer ausreichenden MGMT-Menge (200.000 Moleküle/Zelle³²) sind Tumore resistent gegenüber der O⁶MeG-induzierten Toxizität. In der Abwesenheit von MGMT wird, neben der Induktion des Zelltodes sowie der Formierung von SCE und CA, immer ein gewisser Anteil an Mutationen entstehen. In MGMT-defizienten Tumoren oder bei einer vollständigen MGMT-Hemmung ist jedoch die Induktion des Zelltodes der bevorzugte Mechanismus. Tumorzellen, die Mutation aufgrund der O⁶MeG-Läsion entwickeln, potenzieren ebenfalls über Generationen hinaus den DNA-Schaden. Nach Akkumulation eines hohen DNA-Schadens wird der Zelltod ausgelöst. Im Gegensatz dazu könnte eine unvollständige MGMT-Hemmung die Entstehung von Mutationen fördern und somit die Entwicklung von resistenten Tumoren. Nach Behandlung von Tumoren mit dem MGMT-Inhibitor und TMZ wird nach einer transienten Hemmung des MGMT-Proteins die endogene Resynthese der Zelle die MGMT-Aktivität wieder steigern (in dem Ausmaß wie groß der Einfluss der ABC-Transporter wirkt). Die Resynthese der MGMT-Moleküle bewirkt eine Entfernung der O⁶MeG-Läsionen über die Generationen hinaus. Dies reduziert die Bildung von neuen DSB und vermindert die Induktion des Zelltodes. Gleichzeitig wird die Mutationsrate aufgrund der Reparatur der O⁶MeG:Thymidin Paarung gesteigert; die Guanin:Thymidin-Fehlpaarung führt letzten Endes zur Transition von Adenin:Thymidin. Die erhöhte Mutationsrate könnte die Entwicklung von resistenten Tumorzellen fördern.

Aus diesem Grund sind Strategien erforderlich, die eine unvollständige MGMT-Hemmung vermeiden und den Einfluss der ABC-Transporter entgegen wirken. Es ist zu beachten, dass sich der Status der ABC-Transporter während der Therapie ändern kann und somit auch die Effektivität der MGMT-Hemmung durch einen veränderten Efflux der MGMT-Inhibitoren. Obwohl TMZ kein Substrat für ABC-Transporter darstellt, bestätigten Studien eine Stress-induzierte Hochregulation der Efflux-Transporter oder eine Selektion von Zellen (*side population*) mit erhöhter Expression an ABC-Transportern^{233,234}. Dementsprechend kann der Therapieerfolg im Laufe der Behandlung durch eine gesteigerte Efflux-Transporter-Expression reduziert werden.

Der Einsatz von Hemmstoffen für ABC-Transporter wird seit Jahren in der Tumorthherapie verfolgt. In den *in vitro*-Studien wurde für die Glukose-Konjugate durch eine komplette Hemmung der Efflux-Transporter eine erhöhte Sensibilisierung gegenüber Zytostatika erreicht. Obwohl im *in vivo*-Mausmodell nur eine passive Targeting-Strategie durch die

intravenöse Applikation von O⁶BTG-Glu stattfindet (aufgrund der Partikelbildung), wurde dennoch der Einfluss der Efflux-Hemmung auf die Effektivität des Glukose-Konjugates analysiert. Die simultane Inhibition der ABC-Transporter führte zu einer gesteigerten Inaktivierung des MGMT-Proteins im Tumor. Die Kombinationsbehandlungen mit CCNU (Abb. 31) oder TMZ (Abb. 32) waren jedoch ineffektiv oder zu toxisch. Die geringe Auswirkung der CCNU-Behandlung auf das Tumorstadium könnte in einer schlechten Sensibilisierung der Melanomzelllinie A375 gegenüber chlorethylierenden Agenzien liegen (Abb. 11). Dennoch ist ein großes Problem die Beeinflussung der pharmakologischen Eigenschaften von O⁶BTG-Glu durch den Einsatz von ABC-Transporter-Hemmstoffen. Die Veränderungen der pharmakokinetischen Eigenschaften von O⁶BTG-Glu sind schlecht voraussehbar und führen eventuell zur Unterdosierung (bei CCNU) oder Überdosierung (bei TMZ). Die Überdosierung ist nicht identisch zu beurteilen wie die Studien mit dem Zytostatikum Doxorubicin. In diesem Fall führten die ABC-Hemmstoffe zur reduzierten Exkretion von Doxorubicin, was eine höhere Schädigung des Normalgewebes bewirkte²⁰⁸. Für O⁶BTG-Glu kann eine reduzierte Exkretion durch die Hemmung der Efflux-Transporter von Vorteil sein, da es selbst nicht toxisch wirkt. Jedoch exprimieren die hämatopoetischen Stammzellen ebenfalls ABC-Transporter zu ihrem Schutz vor toxischen Molekülen²³⁵. Eine Hemmung der ABC-Transporter führt zur Inaktivierung des MGMT-Proteins in hämatopoetischen Stammzellen (was ohne ABC-Transporter-Hemmstoffe nicht oder nur teilweise passieren würde) und somit zur Entwicklung der Myelosuppression. Aus diesem Grund ist die Inhibition von ABC-Transportern im ganzen Organismus wahrscheinlich keine geeignete Strategie, um die Effektivität von MGMT-Hemmstoffen zu verbessern. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von ABC-Transporter-Hemmstoffen auf die Effektivität von O⁶BTG-Glu im Mausmodell untersucht. Das Glukose-Konjugat wird jedoch unselektiv in die Zellen aufgenommen. Deshalb ist eine Voraussage des Einflusses von ABC-Transporter-Hemmstoffen auf eine erfolgreiche MGMT-Targeting-Strategie schwierig. Wird ein MGMT-Inhibitor selektiv vom Tumor aufgenommen (z.B. über Glukosetransporter), so sollte die simultane Applikation von ABC-Transporter-Hemmstoffen zur Steigerung der Alkylantien-induzierten Toxizität unbedingt experimentell untersucht werden.

Wichtige Voraussetzungen für die Effektivität einer therapeutischen Substanz sind gute pharmakologische Eigenschaften, die eine hohe Aufnahme, eine wirksame intrazelluläre Konzentration und einen reduzierten Efflux aus dem Tumor garantieren. Derzeit wird die Strategie verfolgt, Substanzen zu synthetisieren, die schlechte Substrate für ABC-Transporter sind oder über Modifikation der Moleküle den Einfluss der Efflux-Transporter reduzieren. MGMT-Targeting-Strategien, die eine Konjugation des MGMT-Inhibitors an ein Targeting-Molekül anstreben, müssen immer den Einfluss von ABC-Transportern berücksichtigen, da amphipatische Moleküle bevorzugt von Efflux-Transportern erkannt werden. In zukünftigen MGMT-Targeting-Strategien sollte O⁶BTG als Ausgangssubstanz verwendet werden. Dies wäre sinnvoll zur Steigerung der Effektivität von konjugierten

MGMT-Hemmstoffen, die eine erfolgreiche Hemmung des DNA-Reparaturproteins in den Tumorzellen anstreben. Der Grund liegt in der höheren Inhibitionsfähigkeit von O⁶BTG im Vergleich zu O⁶BG. Bei identischen Efflux-Raten der O⁶BG- und O⁶BTG-Konjugate durch die ABC-Transporter, ist die Anzahl der O⁶BTG-konjugierten MGMT-Hemmstoffe in der Zelle für eine 100 %-ige MGMT-Inhibition ausreichend. Im Falle des O⁶BG-Konjugates wird die intrazelluläre Konzentration auf ein Maß reduziert das keine vollständige MGMT-Hemmung gewährleistet. Aus diesem Grund ist der Einfluss der ABC-Transporter beim O⁶BTG-konjugierten MGMT-Hemmstoff geringer als bei dem O⁶BG-konjugierten MGMT-Hemmstoff. Die verschiedene Inhibitionsfähigkeit der Glukose-Konjugate O⁶BG-Glu und O⁶BTG-Glu für das MGMT-Protein, bei identischem Aufnahmemechanismus (Flip-Flop) und einer vergleichbaren Efflux-Rate durch die ABC-Transporter, wird als Grund für die unterschiedliche Effektivität zur Sensibilisierung gegenüber alkylierenden Zytostatika angesehen. Ob weitere Mechanismen bei der O⁶BTG-Glu-Aufnahme und Speicherung involviert sind, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. Eine sinnvolle Untersuchung wäre die Analyse der veränderten Interaktion von ABC-Transportern mit MGMT-Hemmstoffen mit einer Bromthiophengruppe anstatt der Benzylgruppe. Erste Hinweise deuten auf eine verminderte Efflux-Rate von Bromthiophenmolekülen bei bestimmten ABC-Transportern hin ²²⁹.

5. Zusammenfassung

Das DNA-Reparaturprotein O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) ist der Hauptresistenzfaktor gegenüber der zytotoxischen Wirkung von S_N1-alkylierenden Zytostatika in der Tumorthherapie. Die Verwendung der MGMT-Hemmstoffe O⁶-Benzylguanin [O⁶BG] und O⁶-(4-Bromophenyl)guanin [O⁶BTG] führte zu einer Sensibilisierung des Normalgewebes, was eine Dosis-Reduktion der Zytostatika erforderlich machte und die erhoffte Therapieverbesserung verhinderte. Aus diesem Grund ist eine Strategie des Targetings dieser MGMT-Inhibitoren erforderlich, um Tumore selektiv zu erreichen und die systemische Toxizität in der Kombinationsbehandlung zu reduzieren. In vorherigen Studien wurden Glukose-Konjugate aus den Inhibitoren O⁶BG und O⁶BTG synthetisiert. Gedanklicher Ausgangspunkt dafür war die Tatsache, dass Tumorzellen einen erhöhten Glukoseverbrauch aufweisen und demzufolge Glukosetransporter überexprimieren. Die Anwendbarkeit der Zuckerkonjugate, O⁶BG-Glu und O⁶BTG-Glu, für eine Targeting-Strategie wurde in dieser Arbeit untersucht.

Folgende wichtige Resultate wurden in dieser Arbeit erzielt: (1) Die Glukose-Konjugate inaktivieren das MGMT-Protein in Tumorzellen und im Tumor eines Xenograft-Mausmodells, was zur Sensibilisierung gegenüber alkylierenden Zytostatika führt. (2) Die Glukose-Konjugate O⁶BG-Glu und O⁶BTG-Glu werden nicht über einen Glukosetransporter in die Zelle aufgenommen. (3) Die Konjugation eines hydrophoben Linkers führt zur Partikelbildung der Konjugate. (4) ABC-Transporter exportieren MGMT-Hemmstoffe (O⁶BG, O⁶BTG sowie die Zuckerkonjugate O⁶BG-Glu, O⁶BTG-Glu) aus den Zellen und vermindern damit die therapeutisch wirksame Konzentration. (5) Die Verwendung von O⁶BTG als Ausgangssubstanz einer MGMT-Targeting-Strategie könnte den Einfluss von ABC-Transportern reduzieren.

Die anfänglichen *in vitro*-Experimente zeigten, dass die Glukose-Konjugate O⁶BG-Glu und O⁶BTG-Glu im niedrigen Dosisbereich das MGMT-Protein in einer Vielzahl von Tumorzellen inaktivieren und diese Zellen gegenüber den alkylierenden Agenzien Temozolomid [TMZ] und Lomustin [CCNU] sensibilisierten. Im Xenograft-Mausmodell inaktivierten die Glukose-Konjugate nach intraperitonealer Verabreichung die MGMT-Aktivität im Tumor und reduzierten das Tumorwachstum nach einer TMZ-Behandlung im gleichen Ausmass wie die Inhibitoren O⁶BG und O⁶BTG. Trotzdem war auch mit den Glukosen-Konjugaten keine Steigerung der Zytostatika-Dosis im Mausmodell möglich. Die Untersuchungen der Aufnahme von O⁶BG-Glu und O⁶BTG-Glu widerlegten eine Involvierung der Glukosetransporter. Der Einsatz von spezifischen Glukosetransporter-Inhibitoren und Kompetitions-Experimenten führte zu keiner

Verminderung der MGMT-Hemmung oder Aufnahme vom radioaktiven $^3\text{H-O}^6\text{BTG-Glu}$ in die Zelle. Dies legt nahe, dass die Glukose-Konjugate über einen unspezifischen Mechanismus (aktiv) in die Zellen gelangen. Der Grund für eine mögliche unselektive Aufnahme könnte im hydrophoben Alkylanker, der für die Konjugation des Glukosemoleküls verwendet wurde, begründet sein. Dies führt zur Generierung von amphipathischen Konjugaten, die eine initiale Bindung an die Plasmamembran aufweisen und eine Aufnahme über den Flip-Flop-Mechanismus (*transbilayer transport*) wahrscheinlich machen. Die amphipathische Molekülstruktur der Glukose-Konjugate führte zu einer Partikelbildung in wässrigen Lösungen, die eine Reduktion der Menge an aktiven Monomeren von $\text{O}^6\text{BG-Glu}$ und $\text{O}^6\text{BTG-Glu}$ bewirken, die zur Hemmung von MGMT zur Verfügung stehen.

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit der Rolle von ABC-Transportern hinsichtlich einer Targeting-Strategie von MGMT-Hemmstoffen. Obwohl seit Jahren bekannt ist, dass eine hohe Expression dieser Efflux-Transporter in Tumoren zur Resistenzentwicklung gegenüber einer Vielzahl von Chemotherapeutika führt (*multi drug resistance*), wurde ihr Einfluss auf MGMT-Hemmstoffe oder einer MGMT-Targeting-Strategie niemals untersucht. Die Resultate dieser Arbeit zeigten zum ersten Mal einen aktiven Efflux der MGMT-Hemmstoffe durch ABC-Transporter. Die Inhibition von ABC-Transportern bewirkte eine schnellere Inaktivierung von MGMT durch die Glukose-Konjugate. Des Weiteren zeigten Kompetitions-Experimente mit den MGMT-Hemmstoffen eine verminderte Efflux-Rate von Fluoreszenzfarbstoffen, die spezifisch von ABC-Transportern exportiert werden. ABC-Transporter reduzieren die wirksame Konzentration des Hemmstoffes in der Zelle und beeinträchtigen somit die Effektivität der MGMT-Inhibition. Diese Tatsache bewirkt die unterschiedliche Sensibilisierung der Tumorzellen gegenüber Zytostatika durch die Glukose-Konjugate, trotz identischem Aufnahmemechanismus. Eine simultane Hemmung der ABC-Transporter P-gp, MRP1 und BCRP wirkte der reduzierten Effektivität von $\text{O}^6\text{BG-Glu}$ gegenüber methylierenden Chemotherapeutika entgegen, dadurch können diese Tumorzellen wieder mit einer geringen Dosis TMZ sensibilisiert werden. Die pharmakologische Inhibition der ABC-Transporter verstärkte identisch zu $\text{O}^6\text{BG-Glu}$ auch die TMZ-induzierte Toxizität für niedrige Dosisbereiche der MGMT-Hemmstoffe O^6BG , O^6BTG und $\text{O}^6\text{BTG-Glu}$. Die Tatsache des aktiven Effluxes von MGMT-Hemmstoffen weist auf eine mögliche Problematik in der Krebstherapie hin. In Tumoren mit einer erhöhten Expression von ABC-Transportern würde nur eine unvollständige Inaktivierung und eine schnellere Resynthese des MGMT-Proteins stattfinden; dies bewirkt eine Reduktion des Therapieerfolges und fördert die Entwicklung von resistenten Tumorzellen aufgrund einer gesteigerten Mutationsrate. Eine Strategie, den Einfluss von ABC-Transportern zu reduzieren und zukünftliche MGMT-Targeting-Strategien effizienter umzusetzen, ist die Verwendung von O^6BTG als Ausgangssubstanz. Die höhere Inhibitionsfähigkeit der Bromthiophenmoleküle (O^6BTG und $\text{O}^6\text{BTG-Glu}$) könnte die erforderliche intrazelluläre

Konzentration für eine vollständige MGMT-Hemmung vermindern und auf diese Weise den Einfluss von Efflux-Transportern reduzieren.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass eine Targeting-Strategie mit den Glukose-Konjugaten O⁶BG-Glu und O⁶BTG-Glu über spezifische Glukose-Transporter nicht zu realisieren ist. Es wurden aber wichtige Erkenntnisse für zukünftige MGMT-Targeting-Strategien erworben: (1) Die Verwendung eines hydrophilen Linkers ist Voraussetzung, damit die negativen Folgen der Partikelbildung und die unselektive Aufnahme über den Flip-Flop-Mechanismus vermieden werden. (2) ABC-Transporter befördern MGMT-Hemmstoffe aus den Tumorzellen, was die Effektivität der Therapie beeinflusst. (3) Die Verwendung von O⁶BTG als Ausgangssubstanz steigert die Effektivität zukünftiger Targeting-Strategien, da Efflux-Transporter einen geringeren Einfluss haben als bei der Verwendung von O⁶BG als Ausgangssubstanz.

Anhang

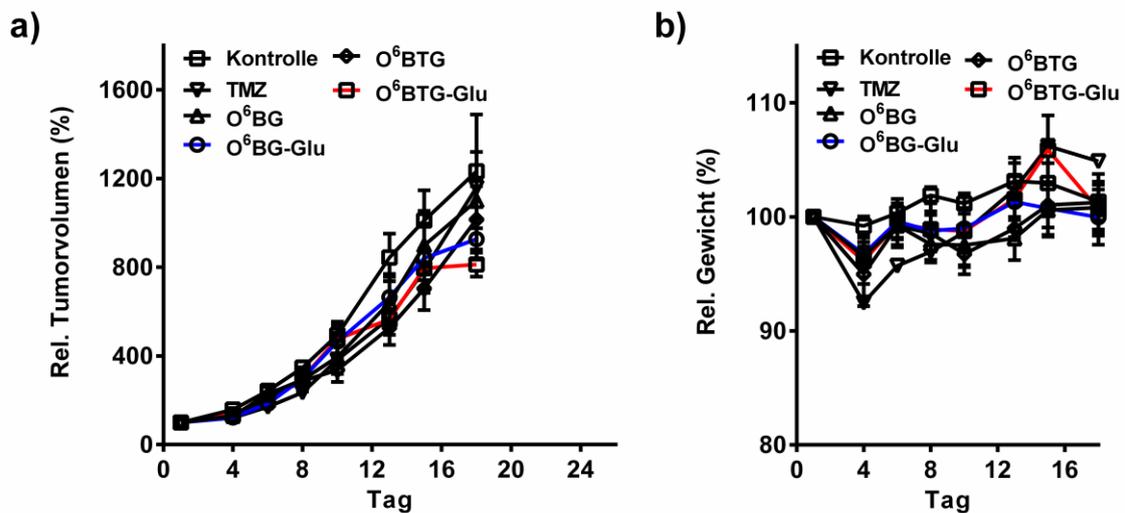


Abb. 34: Wachstumskurve und Toxizität des humanen A375-Xenograft-Modells nach Behandlung mit den MGMT-Hemmstoffen oder dem methylierendem Agens Temozolomid Intraperitoneale Applikation von 30 % DMSO in 0,9 % NaCl und PEG (□), 150 mg/kg TMZ (∇), 20 mg/kg O⁶BG (Δ), 100 mg/kg O⁶BG-Glu (○), 20 mg/kg O⁶BTG (◇) oder 100 mg/kg O⁶BTG-Glu (◻). Bestimmung des relativen Tumorwachstums (a) und des Körpergewichtes (b) über die Zeit. Die Werte repräsentieren den Mittelwert +/- Standardfehler von mind. 6 Mäusen pro Gruppe und beziehen sich jeweils auf den Tag 0 (Tag der Behandlung).

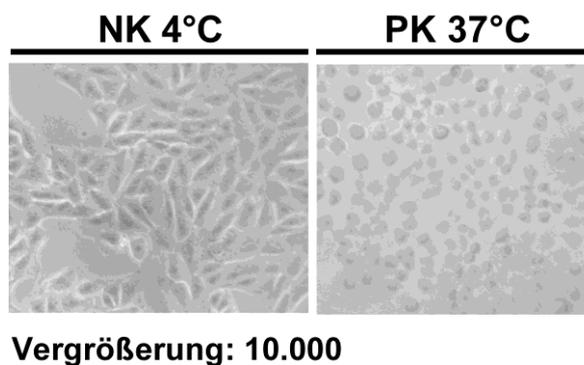


Abb. 35: Positivkontrolle für die Rezeptor-vermittelte Aufnahme in T98G Zellen T98G Zellen wurden für 30 Minuten bei 4°C mit dem bakteriellen Toxin B vom Erreger *Clostridium difficile* ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Entfernung des Toxins aus dem Medium und die Überführung der Zellen in 4°C (keine Rezeptor-vermittelte Aufnahme) oder in 37°C (Rezeptor-vermittelte Aufnahme) für 90 Minuten. Eine Beurteilung der Zellstruktur wurde mittels lichtmikroskopischer Aufnahme bei 10.000-facher Vergrößerung durchgeführt.

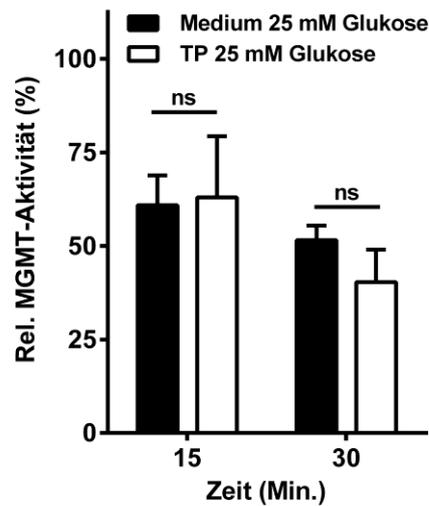


Abb. 36: MGMT-Hemmung mit dem Konjugat O⁶BG-Glu in Medium und Transportpuffer Behandlung von T98G Glioblastomzellen mit 25 μ M O⁶BG-Glu in Kulturmedium (DMEM + 10 % FCS) oder Transportpuffer für die dargestellten Zeitpunkte. Die Hemmung der MGMT-Aktivität wurde mittels MGMT-Assay bestimmt und relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Die p-Werte (*, $p < 0.05$; ns, nicht signifikant) beziehen sich jeweils auf die markierten Behandlungen.

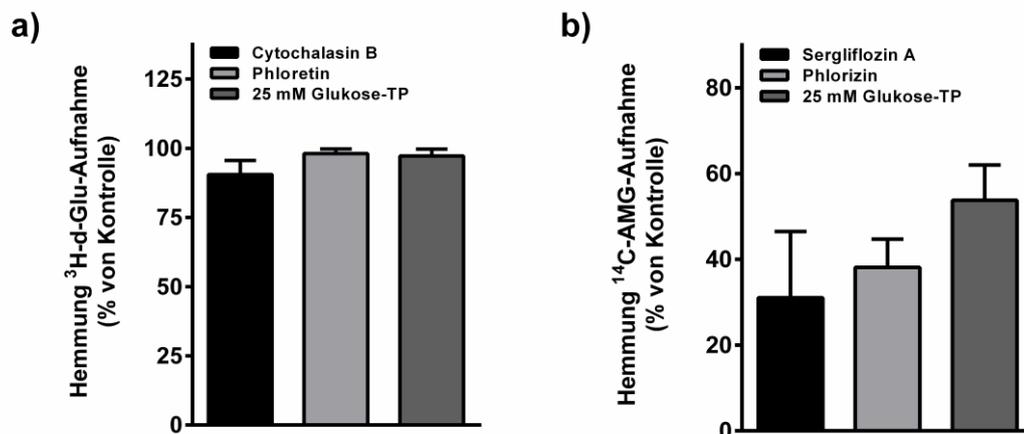


Abb. 37: Effektivität von Glukosetransporter-Inhibitoren und hohen Glukosekonzentrationen auf die Aufnahme von ³H-d-Glu in T98G Zellen und ¹⁴C-AMG in Caco-2 Zellen
 a) Hemmung der ³H-d-Glu-Aufnahme über die GLUT-Transporter. T98G Zellen wurden für 15 Minuten mit 5 μ M H³-d-Glu in Saccharose-TP inkubiert (Kontrolle). Zur Bestimmung des Inhibitionseffektes fand die Aufnahme in Anwesenheit von 10 μ M Cytochalasin B, 500 μ M Phloretin oder in einem 25 mM Glukose-TP statt. b) Hemmung der ¹⁴C-AMG-Aufnahme über die SGLT-Transporter. Caco-2 Zellen wurden für 60 Minuten mit 20 μ M ¹⁴C-AMG in Saccharose-TP inkubiert (Kontrolle). Zur Bestimmung des Inhibitionseffektes fand die Aufnahme in Anwesenheit von 100 μ M Sergliflozin A, 100 μ M Phlorizin oder in einem 25 mM Glukose-TP statt. Nach der Inkubation wurde die Radioaktivität mittels Szintillationszähler detektiert und die prozentuale Hemmung zur Kontrolle kalkuliert.

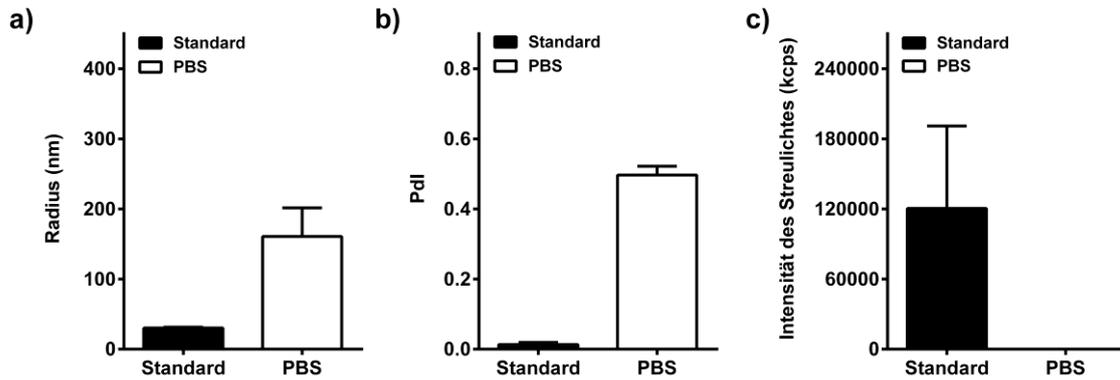


Abb. 38: Dynamische Lichtstreuungs-Messung der Positiv- und Negativkontrollen
Bestimmung der Messwerte Radius (a), Polydispersitäts-Index [PdI] (b) und Intensität des Streulichtes (c) von standardisierten Kalibrierungspartikeln (Positivkontrolle, [Standard]) und dem Lösungsmittel PBS (Negativkontrolle) mittels dynamische Lichtstreuung. Anhand dieser Werte wurden die Bedingungen für die Existenz von Partikeln festgelegt (siehe Text).

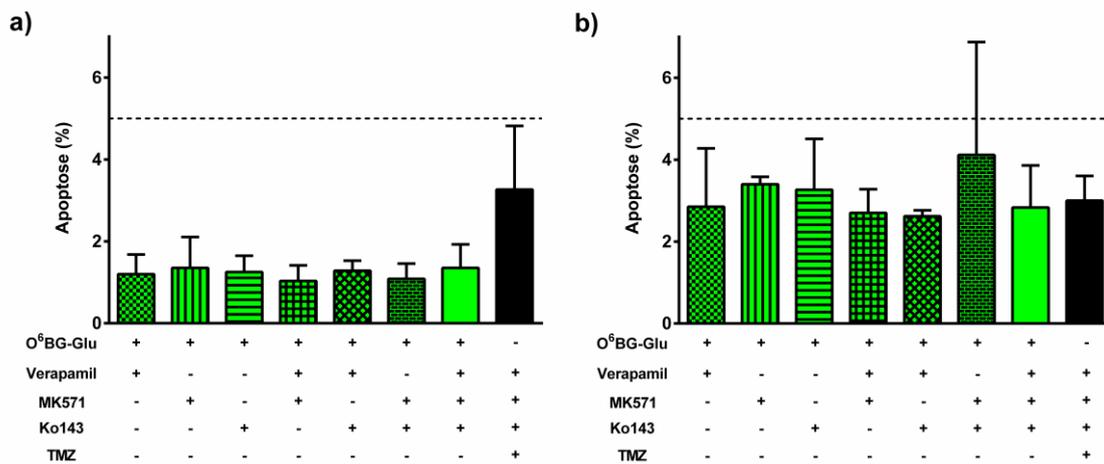


Abb. 39: Toxizität nach Kombinationsbehandlung mit ABC-Transporter-Hemmstoffen
Induktion der Apoptose nach 120 Stunden. T98G Zellen wurden mit 25 µM O⁶BG-Glu oder 50 µM TMZ in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) verschiedener ABC-Transporter-Hemmstoffe (10 µM Verapamil (P-gp), 10 µM MK571 (MRP1) oder 5 µM Ko143 (BCRP)) behandelt. Im Anschluss dieser 24-stündigen Behandlung wurden die Inhibitoren entfernt und es fand eine erneute Inkubation mit 25 µM O⁶BG-Glu (a) oder 10 µM O⁶BG (b) statt. Die Apoptose wurde mittels Sub-G1-Analyse ermittelt.

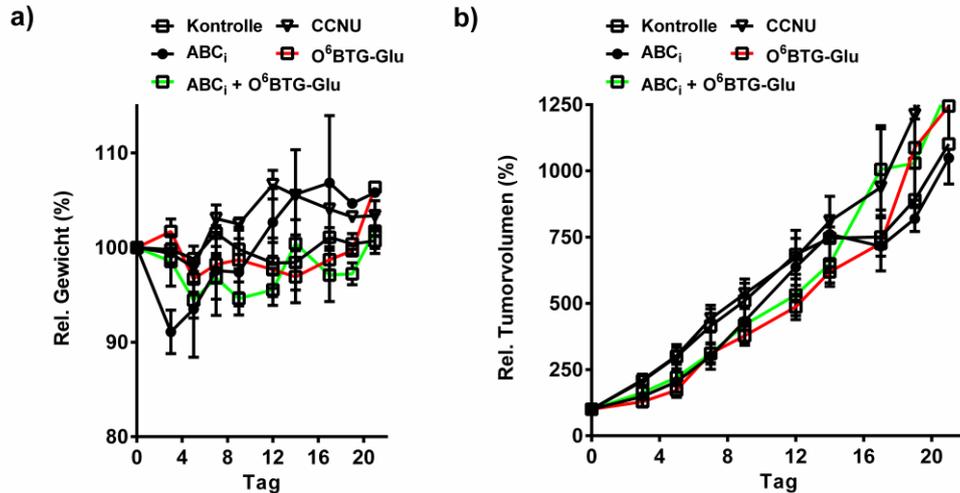


Abb. 40: Wachstumskurve des Tumors und Toxizität des A375-Xenograft-Modells nach Kombinationsbehandlung

Folgende Behandlungen wurden durchgeführt: alleinige intravenöse Applikation von 10 % DMSO in 0,9 % NaCl (□) oder 62,5 mg/kg O⁶BTG-Glu (◻); alleinige intraperitoneale Applikation der ABC-Transporter-Hemmstoffe (10 mg/kg Elacridar, 200 mg/kg Probenecid i.p.) (●) oder 16 mg/kg CCNU (▽) sowie die intravenöse Applikation von O⁶BTG-Glu bei einer 30-minütigen Vorinkubation mit den ABC-Transporter-Hemmstoffen (◻). Bestimmung des relativen Körpergewichtes (a) oder des Tumorzunahmes (b) über die Zeit. Die Werte repräsentieren den Mittelwert +/- Standardfehler von mind. 5 Mäusen pro Gruppe und beziehen sich jeweils auf den Tag 0 (Tag der Behandlung).

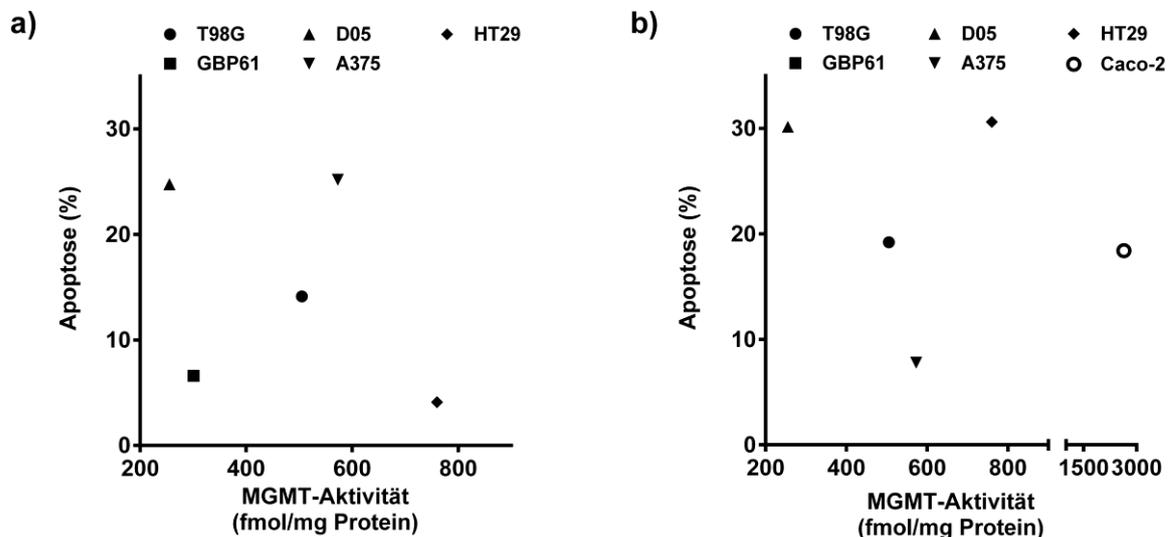


Abb. 41: Einfluss der MGMT-Aktivität auf die Effektivität von O⁶BG-Glu nach Alkylantien-Behandlung

Darstellung des Apoptoselevels nach Behandlung der Tumorzelllinien mit 25 μ M O⁶BG-Glu für 4 Stunden, gefolgt von 50 μ M TMZ (a) oder 20 μ M CCNU (b) als Funktion zur MGMT-Aktivität. Es besteht keine eindeutige Korrelation.

Literaturverzeichnis

- 1 Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* **49**, 1374–1403, doi:10.1016/j.ejca.2012.12.027 (2013).
- 2 Chin, L. & Gray, J. W. Translating insights from the cancer genome into clinical practice. *Nature* **452**, 553–563, doi:10.1038/nature06914 (2008).
- 3 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
- 4 Marnett, L. J. & Burcham, P. C. Endogenous DNA adducts: potential and paradox. *Chem Res Toxicol* **6**, 771–785 (1993).
- 5 Hecht, S. S. DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. *Mutat Res* **424**, 127–142 (1999).
- 6 Jagerstad, M. & Skog, K. Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutat Res* **574**, 156–172, doi:10.1016/j.mrfimm.2005.01.030 (2005).
- 7 Kufe DW, Pollock RE, W. R. *Cancer Medicine, 6th edn* (BC Decker, Hamilton, Canada). (2003).
- 8 Shrivastav, N., Li, D. & Essigmann, J. M. Chemical biology of mutagenesis and DNA repair: cellular responses to DNA alkylation. *Carcinogenesis* **31**, 59–70, doi:10.1093/carcin/bgp262 (2010).
- 9 Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S. & Roos, W. P. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)* **6**, 1079–1099, doi:10.1016/j.dnarep.2007.03.008 (2007).
- 10 Drablos, F. *et al.* Alkylation damage in DNA and RNA—repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)* **3**, 1389–1407, doi:10.1016/j.dnarep.2004.05.004 (2004).
- 11 Engelward, B. P. *et al.* A chemical and genetic approach together define the biological consequences of 3-methyladenine lesions in the mammalian genome. *J Biol Chem* **273**, 5412–5418 (1998).
- 12 Gorla-Gatti, L., Iannone, A., Tomasi, A., Poli, G. & Albano, E. In vitro and in vivo evidence for the formation of methyl radical from procarbazine: a spin-trapping study. *Carcinogenesis* **13**, 799–805 (1992).
- 13 Reid, J. M., Kuffel, M. J., Miller, J. K., Rios, R. & Ames, M. M. Metabolic activation of dacarbazine by human cytochromes P450: the role of CYP1A1, CYP1A2, and CYP2E1. *Clin Cancer Res* **5**, 2192–2197 (1999).
- 14 Bolzan, A. D. & Bianchi, M. S. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res* **512**, 121–134 (2002).
- 15 Ostermann, S. *et al.* Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients. *Clin Cancer Res* **10**, 3728–3736, doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0807 (2004).
- 16 Goth-Goldstein, R. Inability of Chinese hamster ovary cells to excise O6-alkylguanine. *Cancer Res* **40**, 2623–2624 (1980).
- 17 Toorchen, D. & Topal, M. D. Mechanisms of chemical mutagenesis and carcinogenesis: effects on DNA replication of methylation at the O6-guanine position of dGTP. *Carcinogenesis* **4**, 1591–1597 (1983).
- 18 Choi, J. Y. *et al.* Translesion synthesis across O6-alkylguanine DNA adducts by recombinant human DNA polymerases. *J Biol Chem* **281**, 38244–38256, doi:10.1074/jbc.M608369200 (2006).
- 19 Abbott, P. J. & Saffhill, R. DNA synthesis with methylated poly(dC–dG) templates. Evidence for a competitive nature to miscoding by O(6)-methylguanine. *Biochim Biophys Acta* **562**, 51–61 (1979).
- 20 Branch, P., Aquilina, G., Bignami, M. & Karran, P. Defective mismatch binding and a mutator phenotype in cells tolerant to DNA damage. *Nature* **362**, 652–654, doi:10.1038/362652a0 (1993).

- 21 Hansen, R. J., Nagasubramanian, R., Delaney, S. M., Samson, L. D. & Dolan, M. E. Role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in protecting from alkylating agent-induced toxicity and mutations in mice. *Carcinogenesis* **28**, 1111-1116, doi:10.1093/carcin/bgl218 (2007).
- 22 Karran, P. & Bignami, M. DNA damage tolerance, mismatch repair and genome instability. *Bioessays* **16**, 833-839, doi:10.1002/bies.950161110 (1994).
- 23 Margison, G. P. & Kleihues, P. Chemical carcinogenesis in the nervous system. Preferential accumulation of O6-methylguanine in rat brain deoxyribonucleic acid during repetitive administration of N-methyl-N-nitrosourea. *Biochem J* **148**, 521-525 (1975).
- 24 Jun, G. J. *et al.* Studies on the distribution of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in rat. *Biochem Pharmacol* **35**, 377-384 (1986).
- 25 Liu, L., Qin, X. & Gerson, S. L. Reduced lung tumorigenesis in human methylguanine DNA--methyltransferase transgenic mice achieved by expression of transgene within the target cell. *Carcinogenesis* **20**, 279-284 (1999).
- 26 Becker, K., Dosch, J., Gregel, C. M., Martin, B. A. & Kaina, B. Targeted expression of human O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in transgenic mice protects against tumor initiation in two-stage skin carcinogenesis. *Cancer Res* **56**, 3244-3249 (1996).
- 27 Becker, K. *et al.* DNA repair protein MGMT protects against N-methyl-N-nitrosourea-induced conversion of benign into malignant tumors. *Carcinogenesis* **24**, 541-546 (2003).
- 28 Nakatsuru, Y. *et al.* O6-methylguanine-DNA methyltransferase protects against nitrosamine-induced hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6468-6472 (1993).
- 29 Dumenco, L. L., Allay, E., Norton, K. & Gerson, S. L. The prevention of thymic lymphomas in transgenic mice by human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Science* **259**, 219-222 (1993).
- 30 Wirtz, S. *et al.* Both base excision repair and O6-methylguanine-DNA methyltransferase protect against methylation-induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* **31**, 2111-2117, doi:10.1093/carcin/bgq174 (2010).
- 31 Sakumi, K. *et al.* Methylnitrosourea-induced tumorigenesis in MGMT gene knockout mice. *Cancer Res* **57**, 2415-2418 (1997).
- 32 Kaina, B., Fritz, G., Mitra, S. & Coquerelle, T. Transfection and expression of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) cDNA in Chinese hamster cells: the role of MGMT in protection against the genotoxic effects of alkylating agents. *Carcinogenesis* **12**, 1857-1867 (1991).
- 33 Kaina, B. The interrelationship between SCE induction, cell survival, mutagenesis, aberration formation and DNA synthesis inhibition in V79 cells treated with N-methyl-N-nitrosourea or N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Mutat Res* **142**, 49-54 (1985).
- 34 Kaina, B., Ziouta, A., Ochs, K. & Coquerelle, T. Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex-, Mex+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models. *Mutat Res* **381**, 227-241 (1997).
- 35 Armstrong, M. J. & Galloway, S. M. Mismatch repair provokes chromosome aberrations in hamster cells treated with methylating agents or 6-thioguanine, but not with ethylating agents. *Mutat Res* **373**, 167-178 (1997).
- 36 Galloway, S. M., Greenwood, S. K., Hill, R. B., Bradt, C. I. & Bean, C. L. A role for mismatch repair in production of chromosome aberrations by methylating agents in human cells. *Mutat Res* **346**, 231-245 (1995).
- 37 Kroemer, G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* **16**, 3-11, doi:10.1038/cdd.2008.150 (2009).
- 38 Galluzzi, L. *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* **19**, 107-120, doi:10.1038/cdd.2011.96 (2012).

- 39 Roos, W. P. & Kaina, B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* **12**, 440–450, doi:10.1016/j.molmed.2006.07.007 (2006).
- 40 Tominaga, Y., Tsuzuki, T., Shiraiishi, A., Kawate, H. & Sekiguchi, M. Alkylation-induced apoptosis of embryonic stem cells in which the gene for DNA-repair, methyltransferase, had been disrupted by gene targeting. *Carcinogenesis* **18**, 889–896 (1997).
- 41 Roos, W., Baumgartner, M. & Kaina, B. Apoptosis triggered by DNA damage O6-methylguanine in human lymphocytes requires DNA replication and is mediated by p53 and Fas/CD95/Apo-1. *Oncogene* **23**, 359–367, doi:10.1038/sj.onc.1207080 (2004).
- 42 Quiros, S., Roos, W. P. & Kaina, B. Processing of O6-methylguanine into DNA double-strand breaks requires two rounds of replication whereas apoptosis is also induced in subsequent cell cycles. *Cell Cycle* **9**, 168–178 (2010).
- 43 Pepponi, R. *et al.* The effect of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and mismatch repair activities on the sensitivity of human melanoma cells to temozolomide, 1,3-bis(2-chloroethyl)1-nitrosourea, and cisplatin. *J Pharmacol Exp Ther* **304**, 661–668, doi:10.1124/jpet.102.043950 (2003).
- 44 Hickman, M. J. & Samson, L. D. Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10764–10769 (1999).
- 45 Mojas, N., Lopes, M. & Jiricny, J. Mismatch repair-dependent processing of methylation damage gives rise to persistent single-stranded gaps in newly replicated DNA. *Genes Dev* **21**, 3342–3355, doi:10.1101/gad.455407 (2007).
- 46 Ochs, K. & Kaina, B. Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent. *Cancer Res* **60**, 5815–5824 (2000).
- 47 Roos, W. P. *et al.* Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene* **26**, 186–197, doi:10.1038/sj.onc.1209785 (2007).
- 48 Ismail, I. H., Nystrom, S., Nygren, J. & Hammarsten, O. Activation of ataxia telangiectasia mutated by DNA strand break-inducing agents correlates closely with the number of DNA double strand breaks. *J Biol Chem* **280**, 4649–4655, doi:10.1074/jbc.M411588200 (2005).
- 49 Roos, W. P. & Kaina, B. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer letters* **332**, 237–248, doi:10.1016/j.canlet.2012.01.007 (2013).
- 50 Dunkern, T., Roos, W. & Kaina, B. Apoptosis induced by MNNG in human TK6 lymphoblastoid cells is p53 and Fas/CD95/Apo-1 related. *Mutat Res* **544**, 167–172 (2003).
- 51 Quereux, G. & Dreno, B. Fotemustine for the treatment of melanoma. *Expert Opin Pharmacother* **12**, 2891–2904, doi:10.1517/14656566.2011.633513 (2011).
- 52 Rutkauskiene, G. & Labanauskas, L. Treatment of patients of high-risk group of medulloblastoma with the adjuvant lomustine, cisplatin, and vincristine chemotherapy. *Medicina (Kaunas)* **41**, 1026–1034 (2005).
- 53 Lemoine, A., Lucas, C. & Ings, R. M. Metabolism of the chloroethylnitrosoureas. *Xenobiotica* **21**, 775–791, doi:10.3109/00498259109039517 (1991).
- 54 Inga, A. *et al.* N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea tethered to lexitropsin induces minor groove lesions at the p53 cDNA that are more cytotoxic than mutagenic. *Cancer Res* **59**, 689–695 (1999).
- 55 Matijasevic, Z., Precopio, M. L., Snyder, J. E. & Ludlum, D. B. Repair of sulfur mustard-induced DNA damage in mammalian cells measured by a host cell reactivation assay. *Carcinogenesis* **22**, 661–664 (2001).
- 56 Ludlum, D. B. DNA alkylation by the haloethylnitrosoureas: nature of modifications produced and their enzymatic repair or removal. *Mutat Res* **233**, 117–126 (1990).
- 57 Preuss, I., Thust, R. & Kaina, B. Protective effect of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) on the cytotoxic and recombinogenic activity of different antineoplastic drugs. *Int J Cancer* **65**, 506–512, doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19960208)65:4<506::AID-IJC19>3.0.CO;2-7 (1996).

- 58 Nikolova, T., Hennekes, F., Bhatti, A. & Kaina, B. Chloroethylnitrosourea-induced cell death and genotoxicity: cell cycle dependence and the role of DNA double-strand breaks, HR and NHEJ. *Cell Cycle* **11**, 2606-2619, doi:10.4161/cc.20862 (2012).
- 59 Fox, M. & Margison, G. P. Expression of an E.coli O6-alkylguanine DNA alkyltransferase gene in Chinese hamster cells protects against N-methyl and N-ethylnitrosourea induced reverse mutation at the hypoxanthine phosphoribosyl transferase locus. *Mutagenesis* **3**, 409-413 (1988).
- 60 Becker, K., Gregel, C. M. & Kaina, B. The DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase protects against skin tumor formation induced by antineoplastic chloroethylnitrosourea. *Cancer Res* **57**, 3335-3338 (1997).
- 61 Tong, W. P., Kirk, M. C. & Ludlum, D. B. Formation of the cross-link 1-[N3-deoxycytidyl],2-[N1-deoxyguanosinyl]ethane in DNA treated with N,N'-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea. *Cancer Res* **42**, 3102-3105 (1982).
- 62 Gonzaga, P. E. *et al.* Identification of the cross-link between human O6-methylguanine-DNA methyltransferase and chloroethylnitrosourea-treated DNA. *Cancer Res* **52**, 6052-6058 (1992).
- 63 Lawley, P. D. & Phillips, D. H. DNA adducts from chemotherapeutic agents. *Mutat Res* **355**, 13-40 (1996).
- 64 Batista, L. F., Roos, W. P., Christmann, M., Menck, C. F. & Kaina, B. Differential sensitivity of malignant glioma cells to methylating and chloroethylating anticancer drugs: p53 determines the switch by regulating xpc, ddb2, and DNA double-strand breaks. *Cancer Res* **67**, 11886-11895, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2964 (2007).
- 65 Deans, A. J. & West, S. C. DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nature reviews. Cancer* **11**, 467-480, doi:10.1038/nrc3088 (2011).
- 66 Bessho, T. Induction of DNA replication-mediated double strand breaks by psoralen DNA interstrand cross-links. *J Biol Chem* **278**, 5250-5254, doi:10.1074/jbc.M212323200 (2003).
- 67 Barckhausen, C., Roos, W. P., Naumann, S. C. & Kaina, B. Malignant melanoma cells acquire resistance to DNA interstrand cross-linking chemotherapeutics by p53-triggered upregulation of DDB2/XPC-mediated DNA repair. *Oncogene*, doi:10.1038/onc.2013.141 (2013).
- 68 Curtin, N. J. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nature reviews. Cancer* **12**, 801-817, doi:10.1038/nrc3399 (2012).
- 69 McKinnon, P. J. DNA repair deficiency and neurological disease. *Nat Rev Neurosci* **10**, 100-112, doi:10.1038/nrn2559 (2009).
- 70 Eker, A. P., Quayle, C., Chaves, I. & van der Horst, G. T. DNA repair in mammalian cells: Direct DNA damage reversal: elegant solutions for nasty problems. *Cell Mol Life Sci* **66**, 968-980, doi:10.1007/s00018-009-8735-0 (2009).
- 71 Olsson, M. & Lindahl, T. Repair of alkylated DNA in Escherichia coli. Methyl group transfer from O6-methylguanine to a protein cysteine residue. *J Biol Chem* **255**, 10569-10571 (1980).
- 72 Lindahl, T., Demple, B. & Robins, P. Suicide inactivation of the E. coli O6-methylguanine-DNA methyltransferase. *EMBO J* **1**, 1359-1363 (1982).
- 73 Lim, A. & Li, B. F. The nuclear targeting and nuclear retention properties of a human DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase are both required for its nuclear localization: the possible implications. *EMBO J* **15**, 4050-4060 (1996).
- 74 Daniels, D. S. *et al.* DNA binding and nucleotide flipping by the human DNA repair protein AGT. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 714-720, doi:10.1038/nsmb791 (2004).
- 75 Fang, Q., Kanugula, S. & Pegg, A. E. Function of domains of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Biochemistry* **44**, 15396-15405, doi:10.1021/bi051460d (2005).

- 76 Hu, J., Ma, A. & Dinner, A. R. A two-step nucleotide-flipping mechanism enables kinetic discrimination of DNA lesions by AGT. *Proc Natl Acad Sci US A* **105**, 4615–4620, doi:10.1073/pnas.0708058105 (2008).
- 77 Lin, Y. *et al.* Using the bias from flow to elucidate single DNA repair protein sliding and interactions with DNA. *Biophys J* **96**, 1911–1917, doi:10.1016/j.bpj.2008.11.021 (2009).
- 78 Xu-Welliver, M. & Pegg, A. E. Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis* **23**, 823–830 (2002).
- 79 Lips, J. & Kaina, B. Repair of O(6)-methylguanine is not affected by thymine base pairing and the presence of MMR proteins. *Mutat Res* **487**, 59–66 (2001).
- 80 Pegg, A. E., Morimoto, K. & Dolan, M. E. Investigation of the specificity of O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase. *Chem Biol Interact* **65**, 275–281 (1988).
- 81 Coulter, R. *et al.* Differences in the rate of repair of O6-alkylguanines in different sequence contexts by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Chem Res Toxicol* **20**, 1966–1971, doi:10.1021/tx700271j (2007).
- 82 Mijal, R. S. *et al.* The repair of the tobacco specific nitrosamine derived adduct O6-[4-Oxo-4-(3-pyridyl)butyl]guanine by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase variants. *Chem Res Toxicol* **17**, 424–434, doi:10.1021/tx0342417 (2004).
- 83 Pegg, A. E. Multifaceted roles of alkyltransferase and related proteins in DNA repair, DNA damage, resistance to chemotherapy, and research tools. *Chem Res Toxicol* **24**, 618–639, doi:10.1021/tx200031q (2011).
- 84 Gerson, S. L., Trey, J. E., Miller, K. & Berger, N. A. Comparison of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity based on cellular DNA content in human, rat and mouse tissues. *Carcinogenesis* **7**, 745–749 (1986).
- 85 Gerson, S. L., Phillips, W., Kastan, M., Dumenco, L. L. & Donovan, C. Human CD34+ hematopoietic progenitors have low, cytokine-unresponsive O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and are sensitive to O6-benzylguanine plus BCNU. *Blood* **88**, 1649–1655 (1996).
- 86 Preuss, I. *et al.* Activity of the DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human tumor and corresponding normal tissue. *Cancer Detect Prev* **20**, 130–136 (1996).
- 87 Fritz, G., Tano, K., Mitra, S. & Kaina, B. Inducibility of the DNA repair gene encoding O6-methylguanine-DNA methyltransferase in mammalian cells by DNA-damaging treatments. *Mol Cell Biol* **11**, 4660–4668 (1991).
- 88 Fritz, G. & Kaina, B. Stress factors affecting expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase mRNA in rat hepatoma cells. *Biochim Biophys Acta* **1171**, 35–40 (1992).
- 89 Bocangel, D., Sengupta, S., Mitra, S. & Bhakat, K. K. p53-Mediated down-regulation of the human DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) via interaction with Sp1 transcription factor. *Anticancer Res* **29**, 3741–3750 (2009).
- 90 Harris, L. C., Remack, J. S. & Brent, T. P. In vitro methylation of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter reduces transcription. *Biochim Biophys Acta* **1217**, 141–146 (1994).
- 91 Hegi, M. E. *et al.* MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* **352**, 997–1003, doi:10.1056/NEJMoa043331 (2005).
- 92 Weller, M. *et al.* Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol* **27**, 5743–5750, doi:10.1200/JCO.2009.23.0805 (2009).
- 93 Weller, M. *et al.* MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neuro* **6**, 39–51, doi:10.1038/nrneuro.2009.197 (2010).
- 94 Chakravarti, D., Ibeanu, G. C., Tano, K. & Mitra, S. Cloning and expression in Escherichia coli of a human cDNA encoding the DNA repair protein N-methylpurine-DNA glycosylase. *J Biol Chem* **266**, 15710–15715 (1991).

- 95 Zharikov, D. O. Base excision DNA repair. *Cell Mol Life Sci* **65**, 1544–1565, doi:10.1007/s00018-008-7543-2 (2008).
- 96 Svilar, D., Goellner, E. M., Almeida, K. H. & Sobol, R. W. Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. *Antioxid Redox Signal* **14**, 2491–2507, doi:10.1089/ars.2010.3466 (2011).
- 97 Robertson, A. B., Klungland, A., Rognes, T. & Leiros, I. DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci* **66**, 981–993, doi:10.1007/s00018-009-8736-z (2009).
- 98 Cappelli, E. *et al.* Involvement of XRCC1 and DNA ligase III gene products in DNA base excision repair. *J Biol Chem* **272**, 23970–23975 (1997).
- 99 Rouleau, M., Aubin, R. A. & Poirier, G. G. Poly(ADP-ribosyl)ated chromatin domains: access granted. *J Cell Sci* **117**, 815–825, doi:10.1242/jcs.01080 (2004).
- 100 Hassa, P. O., Haenni, S. S., Elser, M. & Hotzger, M. O. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 789–829, doi:10.1128/MMBR.00040-05 (2006).
- 101 Modrich, P. & Lahue, R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem* **65**, 101–133, doi:10.1146/annurev.bi.65.070196.000533 (1996).
- 102 Umar, A. & Kunkel, T. A. DNA-replication fidelity, mismatch repair and genome instability in cancer cells. *Eur J Biochem* **238**, 297–307 (1996).
- 103 Berardini, M., Mazurek, A. & Fishel, R. The effect of O⁶-methylguanine DNA adducts on the adenosine nucleotide switch functions of hMSH2-hMSH6 and hMSH2-hMSH3. *J Biol Chem* **275**, 27851–27857, doi:10.1074/jbc.M003589200 (2000).
- 104 Casorelli, I., Russo, M. T. & Bignami, M. Role of mismatch repair and MGMT in response to anticancer therapies. *Anticancer Agents Med Chem* **8**, 368–380 (2008).
- 105 Jiricny, J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 335–346, doi:10.1038/nrm1907 (2006).
- 106 Martin, S. A., Lord, C. J. & Ashworth, A. Therapeutic targeting of the DNA mismatch repair pathway. *Clin Cancer Res* **16**, 5107–5113, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0821 (2010).
- 107 Bohgaki, T., Bohgaki, M. & Hakem, R. DNA double-strand break signaling and human disorders. *Genome Integr* **1**, 15, doi:10.1186/2041-9414-1-15 (2010).
- 108 Heyer, W. D., Ehmsen, K. T. & Liu, J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet* **44**, 113–139, doi:10.1146/annurev-genet-051710-150955 (2010).
- 109 San Filippo, J., Sung, P. & Klein, H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* **77**, 229–257, doi:10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255 (2008).
- 110 Helleday, T., Lo, J., van Gent, D. C. & Engelward, B. P. DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)* **6**, 923–935, doi:10.1016/j.dnarep.2007.02.006 (2007).
- 111 Sung, P. & Klein, H. Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 739–750, doi:10.1038/nrm2008 (2006).
- 112 Shibata, A. *et al.* Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G₂ phase. *EMBO J* **30**, 1079–1092, doi:10.1038/emboj.2011.27 (2011).
- 113 Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U. & Schwarz, K. The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA Repair (Amst)* **3**, 817–826, doi:10.1016/j.dnarep.2004.03.015 (2004).
- 114 Fulop, G. M. & Phillips, R. A. The scid mutation in mice causes a general defect in DNA repair. *Nature* **347**, 479–482, doi:10.1038/347479a0 (1990).

- 115 Mahaney, B. L., Meek, K. & Lees-Miller, S. P. Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J* **417**, 639–650, doi:10.1042/BJ20080413 (2009).
- 116 Lieber, M. R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* **79**, 181–211, doi:10.1146/annurev.biochem.052308.093131 (2010).
- 117 Iliakis, G. Backup pathways of NHEJ in cells of higher eukaryotes: cell cycle dependence. *Radiother Oncol* **92**, 310–315, doi:10.1016/j.radonc.2009.06.024 (2009).
- 118 Hlavin, E. M., Smeaton, M. B. & Miller, P. S. Initiation of DNA interstrand cross-link repair in mammalian cells. *Environ Mol Mutagen* **51**, 604–624, doi:10.1002/em.20559 (2010).
- 119 Shukla, P., Solanki, A., Ghosh, K. & Vundinti, B. R. DNA interstrand cross-link repair: understanding role of Fanconi anemia pathway and therapeutic implications. *Eur J Haematol*, doi:10.1111/ejh.12169 (2013).
- 120 Lange, S. S., Takata, K. & Wood, R. D. DNA polymerases and cancer. *Nature reviews. Cancer* **11**, 96–110, doi:10.1038/nrc2998 (2011).
- 121 Roos, W. P. *et al.* The translesion polymerase Rev3L in the tolerance of alkylating anticancer drugs. *Mol Pharmacol* **76**, 927–934, doi:10.1124/mol.109.058131 (2009).
- 122 Bristow, R. G. & Hill, R. P. Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nature reviews. Cancer* **8**, 180–192, doi:10.1038/nrc2344 (2008).
- 123 Farmer, H. *et al.* Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **434**, 917–921, doi:10.1038/nature03445 (2005).
- 124 McCabe, N. *et al.* Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Res* **66**, 8109–8115, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0140 (2006).
- 125 Huhn, D., Bolck, H. A. & Sartori, A. A. Targeting DNA double-strand break signalling and repair: recent advances in cancer therapy. *Swiss Med Wkly* **143**, w13837, doi:10.4414/sm.w.2013.13837 (2013).
- 126 Furgason, J. M. & Bahassi el, M. Targeting DNA repair mechanisms in cancer. *Pharmacol Ther* **137**, 298–308, doi:10.1016/j.pharmthera.2012.10.009 (2013).
- 127 Alexander, B. M., Pinnell, N., Wen, P. Y. & D'Andrea, A. Targeting DNA repair and the cell cycle in glioblastoma. *J Neurooncol* **107**, 463–477, doi:10.1007/s11060-011-0765-4 (2012).
- 128 Zlotogorski, C. & Erickson, L. C. Pretreatment of normal human fibroblasts and human colon carcinoma cells with MNNG allows chloroethylnitrosourea to produce DNA interstrand crosslinks not observed in cells treated with chloroethylnitrosourea alone. *Carcinogenesis* **4**, 759–763 (1983).
- 129 Gerson, S. L., Berger, N. A., Arce, C., Petzold, S. J. & Willson, J. K. Modulation of nitrosourea resistance in human colon cancer by O6-methylguanine. *Biochem Pharmacol* **43**, 1101–1107 (1992).
- 130 Moschel, R. C., McDougall, M. G., Dolan, M. E., Stine, L. & Pegg, A. E. Structural features of substituted purine derivatives compatible with depletion of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *J Med Chem* **35**, 4486–4491 (1992).
- 131 Shibata, T. *et al.* Novel synthesis of O6-alkylguanine containing oligodeoxyribonucleotides as substrates for the human DNA repair protein, O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT). *Nucleic Acids Res* **34**, 1884–1891, doi:10.1093/nar/gkl117 (2006).
- 132 Ranson, M. *et al.* Lomeguatrib, a potent inhibitor of O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase: phase I safety, pharmacodynamic, and pharmacokinetic trial and evaluation in combination with temozolomide in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* **12**, 1577–1584, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2198 (2006).
- 133 Kefford, R. F. *et al.* A phase I study of extended dosing with lomeguatrib with temozolomide in patients with advanced melanoma. *Br J Cancer* **100**, 1245–1249, doi:10.1038/sj.bjc.6605016 (2009).

- 134 Kaina, B., Margison, G. P. & Christmann, M. Targeting O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* **67**, 3663-3681, doi:10.1007/s00018-010-0491-7 (2010).
- 135 Koch, D., Hundsberger, T., Boor, S. & Kaina, B. Local intracerebral administration of O(6)-benzylguanine combined with systemic chemotherapy with temozolomide of a patient suffering from a recurrent glioblastoma. *J Neurooncol* **82**, 85-89, doi:10.1007/s11060-006-9244-8 (2007).
- 136 Xu-Welliver, M., Kanugula, S. & Pegg, A. E. Isolation of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase mutants highly resistant to inactivation by O6-benzylguanine. *Cancer Res* **58**, 1936-1945 (1998).
- 137 Adair, J. E. *et al.* Extended survival of glioblastoma patients after chemoprotective HSC gene therapy. *Sci Transl Med* **4**, 133ra157, doi:10.1126/scitranslmed.3003425 (2012).
- 138 Javanmard, S. *et al.* Inactivation of O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase by folate esters of O(6)-benzyl-2'-deoxyguanosine and of O(6)-[4-(hydroxymethyl)benzyl]guanine. *J Med Chem* **50**, 5193-5201, doi:10.1021/jm0705859 (2007).
- 139 Penketh, P. G. *et al.* A strategy for selective O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase depletion under hypoxic conditions. *Chem Biol Drug Des* **80**, 279-290, doi:10.1111/j.1747-0285.2012.01401.x (2012).
- 140 Skeel, R., editor. *Handbook of Cancer Chemotherapy*. (2007).
- 141 Torchilin, V. P. Drug targeting. *Eur J Pharm Sci* **11 Suppl 2**, S81-91 (2000).
- 142 Duncan, R. Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. *Nature reviews. Cancer* **6**, 688-701, doi:10.1038/nrc1958 (2006).
- 143 Schrama, D., Reisfeld, R. A. & Becker, J. C. Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. *Nature reviews. Drug discovery* **5**, 147-159, doi:10.1038/nrd1957 (2006).
- 144 Allen, T. M. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nature reviews. Cancer* **2**, 750-763, doi:10.1038/nrc903 (2002).
- 145 Venter, J. C. *et al.* The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351, doi:10.1126/science.1058040 (2001).
- 146 Mizuno, N., Niwa, T., Yotsumoto, Y. & Sugiyama, Y. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol Rev* **55**, 425-461, doi:10.1124/pr.55.3.1 (2003).
- 147 International Transporter, C. *et al.* Membrane transporters in drug development. *Nature reviews. Drug discovery* **9**, 215-236, doi:10.1038/nrd3028 (2010).
- 148 Nakanishi, T. Drug transporters as targets for cancer chemotherapy. *Cancer Genomics Proteomics* **4**, 241-254 (2007).
- 149 Scheepers, A., Joost, H. G. & Schurmann, A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPENJ Parenter Enteral Nutr* **28**, 364-371 (2004).
- 150 Wood, I. S. & Trayhurn, P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* **89**, 3-9, doi:10.1079/BJN2002763 (2003).
- 151 Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309-314 (1956).
- 152 Altenberg, B. & Greulich, K. O. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics* **84**, 1014-1020, doi:10.1016/j.ygeno.2004.08.010 (2004).
- 153 Medina, R. A. & Owen, G. I. Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biol Res* **35**, 9-26 (2002).
- 154 Younes, M., Juarez, D., Lechago, L. V. & Lerner, S. P. Glut 1 expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder is associated with poor patient survival. *Anticancer Res* **21**, 575-578 (2001).
- 155 Ayala, F. R. *et al.* GLUT1 and GLUT3 as potential prognostic markers for Oral Squamous Cell Carcinoma. *Molecules* **15**, 2374-2387, doi:10.3390/molecules15042374 (2010).

- 156 Vander Heiden, M. G. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nature reviews. Drug discovery* **10**, 671–684, doi:10.1038/nrd3504 (2011).
- 157 Granchi, C. & Minutolo, F. Anticancer agents that counteract tumor glycolysis. *ChemMedChem* **7**, 1318–1350, doi:10.1002/cmdc.201200176 (2012).
- 158 Brentjens, R. & Saltz, L. Islet cell tumors of the pancreas: the medical oncologist's perspective. *Surg Clin North Am* **81**, 527–542 (2001).
- 159 Herrmann, K. *et al.* (18)F-FDG-PET/CT in evaluating response to therapy in solid tumors: where we are and where we can go. *QJ Nucl Med Mol Imaging* **55**, 620–632 (2011).
- 160 Dean, M., Rzhetsky, A. & Allikmets, R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* **11**, 1156–1166, doi:10.1101/gr.184901 (2001).
- 161 Choudhuri, S. & Klaassen, C. D. Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int J Toxicol* **25**, 231–259, doi:10.1080/10915810600746023 (2006).
- 162 Callaghan, R., Ford, R. C. & Kerr, I. D. The translocation mechanism of P-glycoprotein. *FEBS Lett* **580**, 1056–1063, doi:10.1016/j.febslet.2005.11.083 (2006).
- 163 Schinkel, A. H. & Jonker, J. W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* **55**, 3–29 (2003).
- 164 Ambudkar, S. V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z. E. & Gottesman, M. M. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* **22**, 7468–7485, doi:10.1038/sj.onc.1206948 (2003).
- 165 Munoz, M., Henderson, M., Haber, M. & Norris, M. Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. *IUBMB Life* **59**, 752–757, doi:10.1080/15216540701736285 (2007).
- 166 Robey, R. W., Polgar, O., Deeken, J., To, K. W. & Bates, S. E. ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer Metastasis Rev* **26**, 39–57, doi:10.1007/s10555-007-9042-6 (2007).
- 167 Szakacs, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C. & Gottesman, M. M. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature reviews. Drug discovery* **5**, 219–234, doi:10.1038/nrd1984 (2006).
- 168 Litman, T., Druley, T. E., Stein, W. D. & Bates, S. E. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell Mol Life Sci* **58**, 931–959 (2001).
- 169 Gottesman, M. M. & Pastan, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* **62**, 385–427, doi:10.1146/annurev.bi.62.070193.002125 (1993).
- 170 van Zuylen, L., Nooter, K., Sparreboom, A. & Verweij, J. Development of multidrug-resistance convertors: sense or nonsense? *Invest New Drugs* **18**, 205–220 (2000).
- 171 Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254 (1976).
- 172 Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
- 173 Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci US A* **76**, 4350–4354 (1979).
- 174 Myrnes, B., Norstrand, K., Giercksky, K. E., Sjunneskog, C. & Krokan, H. A simplified assay for O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity and its application to human neoplastic and non-neoplastic tissues. *Carcinogenesis* **5**, 1061–1064 (1984).
- 175 Homolya, L. *et al.* Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein. *J Biol Chem* **268**, 21493–21496 (1993).

- 176 Hollo, Z., Homolya, L., Davis, C. W. & Sarkadi, B. Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter. *Biochim Biophys Acta* **1191**, 384–388 (1994).
- 177 Nakanishi, T., Ross, D. D. & Mitsuoka, K. Methods to evaluate transporter activity in cancer. *Methods Mol Biol* **637**, 105–120, doi:10.1007/978-1-60761-700-6_5 (2010).
- 178 Budai, L. *et al.* Liposomes for topical use: a physico-chemical comparison of vesicles prepared from egg or soy lecithin. *Scientia pharmaceutica* **81**, 1151–1166, doi:10.3797/scipharm.1305-11 (2013).
- 179 Hallett, F. R., Watton, J. & Krygsmann, P. Vesicle sizing: Number distributions by dynamic light scattering. *Biophys J* **59**, 357–362 (1991).
- 180 Kaina, B. *et al.* Inhibition of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase by glucose-conjugated inhibitors: comparison with nonconjugated inhibitors and effect on fotemustine and temozolomide-induced cell death. *J Pharmacol Exp Ther* **311**, 585–593, doi:10.1124/jpet.104.071316 (2004).
- 181 Hermisson, M. *et al.* O⁶-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. *J Neurochem* **96**, 766–776, doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03583.x (2006).
- 182 Nakayama, T., Mikoshiba, K., Yamamori, T. & Akagawa, K. Activation of syntaxin 1C, an alternative splice variant of HPC-1/syntaxin 1A, by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) suppresses glucose transport into astrogloma cells via the glucose transporter-1 (GLUT-1). *J Biol Chem* **279**, 23728–23739, doi:10.1074/jbc.M314297200 (2004).
- 183 Kreklau, E. L., Kurpad, C., Williams, D. A. & Erickson, L. C. Prolonged inhibition of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase in human tumor cells by O⁶-benzylguanine in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **291**, 1269–1275 (1999).
- 184 Srivenugopal, K. S., Yuan, X. H., Friedman, H. S. & Ali-Osman, F. Ubiquitination-dependent proteolysis of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O⁶-benzylguanine or 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Biochemistry* **35**, 1328–1334, doi:10.1021/bi9518205 (1996).
- 185 Liu, L., Lee, K., Wasan, E. & Gerson, S. L. Differential sensitivity of human and mouse alkyltransferase to O⁶-benzylguanine using a transgenic model. *Cancer Res* **56**, 1880–1885 (1996).
- 186 Roos, W. P. *et al.* Intrinsic anticancer drug resistance of malignant melanoma cells is abrogated by IFN-beta and valproic acid. *Cancer Res* **71**, 4150–4160, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3498 (2011).
- 187 Surova, O. & Zhivotovsky, B. Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene* **32**, 3789–3797, doi:10.1038/onc.2012.556 (2013).
- 188 Knizhnik, A. V. *et al.* Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. *PLoS One* **8**, e55665, doi:10.1371/journal.pone.0055665 (2013).
- 189 Brown, J. M. & Attardi, L. D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nature reviews. Cancer* **5**, 231–237, doi:10.1038/nrc1560 (2005).
- 190 Naumann, S. C. *et al.* Temozolomide- and fotemustine-induced apoptosis in human malignant melanoma cells: response related to MGMT, MMR, DSBs, and p53. *Br J Cancer* **100**, 322–333, doi:10.1038/sj.bjc.6604856 (2009).
- 191 Frese, K. K. & Tuveson, D. A. Maximizing mouse cancer models. *Nature reviews. Cancer* **7**, 645–658, doi:10.1038/nrc2192 (2007).
- 192 Middleton, M. R. *et al.* O⁶-(4-bromophenyl)guanine improves the therapeutic index of temozolomide against A375M melanoma xenografts. *Int J Cancer* **85**, 248–252 (2000).
- 193 Harvey Lodish, A. B., Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell. *Molecular Cell Biology, 4th edition.* (2000).

- 194 Just, I. *et al.* Glucosylation of Rho proteins by Clostridium difficile toxin B. *Nature* **375**, 500–503, doi:10.1038/375500a0 (1995).
- 195 Marathe, P. H., Shyu, W. C. & Humphreys, W. G. The use of radiolabeled compounds for ADME studies in discovery and exploratory development. *Curr Pharm Des* **10**, 2991–3008 (2004).
- 196 Martel, F., Goncalves, P. & Azevedo, I. Absorption of folate by Caco-2 cells is not affected by high glucose concentration. *Eur J Pharmacol* **551**, 19–26, doi:10.1016/j.ejphar.2006.09.004 (2006).
- 197 Martel, F., Grundemann, D., Calhau, C. & Schomig, E. Apical uptake of organic cations by human intestinal Caco-2 cells: putative involvement of ASF transporters. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **363**, 40–49 (2001).
- 198 Zheng, Y., Scow, J. S., Duenes, J. A. & Sarr, M. G. Mechanisms of glucose uptake in intestinal cell lines: role of GLUT2. *Surgery* **151**, 13–25, doi:10.1016/j.surg.2011.07.010 (2012).
- 199 Rangel-Yagui, C. O., Pessoa, A., Jr. & Tavares, L. C. Micellar solubilization of drugs. *J Pharm Pharm Sci* **8**, 147–165 (2005).
- 200 Alvarez, A. I. *et al.* Modulation of the activity of ABC transporters (P-glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoids and drug response. *J Pharm Sci* **99**, 598–617, doi:10.1002/jps.21851 (2010).
- 201 Peignan, L. *et al.* Combined use of anticancer drugs and an inhibitor of multiple drug resistance-associated protein-1 increases sensitivity and decreases survival of glioblastoma multiforme cells in vitro. *Neurochem Res* **36**, 1397–1406, doi:10.1007/s11064-011-0464-8 (2011).
- 202 Choi, C. H. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int* **5**, 30, doi:10.1186/1475-2867-5-30 (2005).
- 203 Lebedeva, I. V., Pande, P. & Patton, W. F. Sensitive and specific fluorescent probes for functional analysis of the three major types of mammalian ABC transporters. *PLoS One* **6**, e22429, doi:10.1371/journal.pone.0022429 (2011).
- 204 Lee, L. S. *et al.* Darunavir/tritonavir and efavirenz exert differential effects on MRP1 transporter expression and function in healthy volunteers. *Antivir Ther* **15**, 275–279, doi:10.3851/IMP1505 (2010).
- 205 Robey, R. W. *et al.* Pheophorbide a is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. *Cancer Res* **64**, 1242–1246 (2004).
- 206 Loe, D. W., Deeley, R. G. & Cole, S. P. Verapamil stimulates glutathione transport by the 190-kDa multidrug resistance protein 1 (MRP1). *J Pharmacol Exp Ther* **293**, 530–538 (2000).
- 207 Saengkhae, C., Loetchutinat, C. & Garnier-Suillerot, A. Kinetic analysis of rhodamines efflux mediated by the multidrug resistance protein (MRP1). *Biophys J* **85**, 2006–2014, doi:10.1016/S0006-3495(03)74628-1 (2003).
- 208 Shukla, S., Ohnuma, S. & Ambudkar, S. V. Improving cancer chemotherapy with modulators of ABC drug transporters. *Curr Drug Targets* **12**, 621–630 (2011).
- 209 Steeg, P. S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* **12**, 895–904, doi:10.1038/nm1469 (2006).
- 210 Calvaresi, E. C. & Hergenrother, P. J. Glucose conjugation for the specific targeting and treatment of cancer. *Chem Sci* **4**, 2319–2333, doi:10.1039/C3SC22205E (2013).
- 211 DeGorter, M. K., Xia, C. Q., Yang, J. J. & Kim, R. B. Drug transporters in drug efficacy and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **52**, 249–273, doi:10.1146/annurev-pharmtox-010611-134529 (2012).
- 212 Cai, S. *et al.* Humanized bone marrow mouse model as a preclinical tool to assess therapy-mediated hematotoxicity. *Clin Cancer Res* **17**, 2195–2206, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1959 (2011).
- 213 Cabrini, G. & Verkman, A. S. Localization of cyanine dye binding to brush-border membranes by quenching of n-(9-anthroyloxy) fatty acid probes. *Biochim Biophys Acta* **862**, 285–293 (1986).

- 214 Marx, U., Lassmann, G., Wimalasena, K., Muller, P. & Herrmann, A. Rapid kinetics of insertion and accessibility of spin-labeled phospholipid analogs in lipid membranes: a stopped-flow electron paramagnetic resonance approach. *Biophys J* **73**, 1645–1654, doi:10.1016/S0006-3495(97)78196-7 (1997).
- 215 Regev, R., Yeheskely-Hayon, D., Katzir, H. & Eytan, G. D. Transport of anthracyclines and mitoxantrone across membranes by a flip-flop mechanism. *Biochem Pharmacol* **70**, 161–169, doi:10.1016/j.bcp.2005.03.032 (2005).
- 216 Dobson, P. D. & Kell, D. B. Carrier-mediated cellular uptake of pharmaceutical drugs: an exception or the rule? *Nature reviews. Drug discovery* **7**, 205–220, doi:10.1038/nrd2438 (2008).
- 217 Reinhard, J., Eichhorn, U., Wiessler, M. & Kaina, B. Inactivation of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase by glucose-conjugated inhibitors. *Int J Cancer* **93**, 373–379 (2001).
- 218 Chung, S., Parker, J. B., Bianchet, M., Amzel, L. M. & Stivers, J. T. Impact of linker strain and flexibility in the design of a fragment-based inhibitor. *Nat Chem Biol* **5**, 407–413, doi:10.1038/nchembio.163 (2009).
- 219 Zhao, R. Y. *et al.* Synthesis and evaluation of hydrophilic linkers for antibody-maytansinoid conjugates. *J Med Chem* **54**, 3606–3623, doi:10.1021/jm2002958 (2011).
- 220 Gottesman, M. M., Fojo, T. & Bates, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature reviews. Cancer* **2**, 48–58, doi:10.1038/nrc706 (2002).
- 221 Marquez, B. & Van Bambeke, F. ABC multidrug transporters: target for modulation of drug pharmacokinetics and drug-drug interactions. *Curr Drug Targets* **12**, 600–620 (2011).
- 222 Bobola, M. S. *et al.* O6-methylguanine-DNA methyltransferase, O6-benzylguanine, and resistance to clinical alkylators in pediatric primary brain tumor cell lines. *Clin Cancer Res* **11**, 2747–2755, doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2045 (2005).
- 223 Thomas, A. D. *et al.* Influence of DNA repair on nonlinear dose-responses for mutation. *Toxicol Sci* **132**, 87–95, doi:10.1093/toxsci/kfs341 (2013).
- 224 Ishiguro, K., Shyam, K., Penketh, P. G. & Sartorelli, A. C. Development of an O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase assay based on covalent transfer of the benzyl moiety from [benzene-3H]O(6)-benzylguanine to the protein. *Anal Biochem* **383**, 44–51, doi:10.1016/j.ab.2008.08.009 (2008).
- 225 Ambudkar, S. V., Cardarelli, C. O., Pashinsky, I. & Stein, W. D. Relation between the turnover number for vinblastine transport and for vinblastine-stimulated ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. *J Biol Chem* **272**, 21160–21166 (1997).
- 226 Huang, Y. & Sadee, W. Membrane transporters and channels in chemoresistance and -sensitivity of tumor cells. *Cancer letters* **239**, 168–182, doi:10.1016/j.canlet.2005.07.032 (2006).
- 227 Demel, M. A. *et al.* In silico prediction of substrate properties for ABC-multidrug transporters. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**, 1167–1180, doi:10.1517/17425255.4.9.1167 (2008).
- 228 Eckford, P. D. & Sharom, F. J. ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs. *Chem Rev* **109**, 2989–3011, doi:10.1021/cr9000226 (2009).
- 229 Strouse, J. J. *et al.* A selective ATP-binding cassette subfamily G member 2 efflux inhibitor revealed via high-throughput flow cytometry. *J Biomol Screen* **18**, 26–38, doi:10.1177/1087057112456875 (2013).
- 230 Polli, J. W. *et al.* Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery. *J Pharmacol Exp Ther* **299**, 620–628 (2001).
- 231 Watson, A. J. *et al.* Tumor O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase inactivation by oral lomeguatrib. *Clin Cancer Res* **16**, 743–749, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1389 (2010).
- 232 Hegi, M. E. *et al.* Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol* **26**, 4189–4199, doi:10.1200/JCO.2007.11.5964 (2008).

- 233 Luo, Y. *et al.* Side population cells from human melanoma tumors reveal diverse mechanisms for chemoresistance. *J Invest Dermatol* **132**, 2440–2450, doi:10.1038/jid.2012.161 (2012).
- 234 Scotto, K. W. Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene* **22**, 7496–7511, doi:10.1038/sj.onc.1206950 (2003).
- 235 Raaijmakers, M. H. ATP-binding-cassette transporters in hematopoietic stem cells and their utility as therapeutical targets in acute and chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **21**, 2094–2102, doi:10.1038/sj.leu.2404859 (2007).

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
AAG	3-Alkyladenin-DNA-Glykosylase
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ABH2	<i>AlkB homolog 2</i>
ABH3	<i>AlkB homolog 3</i>
AGT	O ⁶ -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase
AIC	<i>5-Aminoimidazole-4-carboxamide</i>
AP	apurinische/apyrimidinische Stelle
Apaf-1	apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1
APE1	<i>apurinic Endonulcease I</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ataxia telangiectasia and Rad3-related</i>
ATRIP	<i>ATR-interacting protein</i>
BCRP	<i>breast cancer resistance protein</i>
BER	Basenexzisionsreparatur
BLM	<i>Bloom syndrome protein</i>
BRCA1	<i>breast cancer 1</i>
BRCA2	<i>breast cancer 2</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C¹⁴-AMG	C ¹⁴ -alpha-Methyl-Glucopyranosid
CA	Chromosomenaberration
ca.	circa
CCNU	Lomustin
CFA	Koloniebildungsassay (<i>colony formation assay</i>)
CFDA	5(6)-Carboxy-2',7'-Dichlorfluorescein-Diacetat

CHK1	<i>checkpoint kinase 1</i>
CHK2	<i>checkpoint kinase 2</i>
Ci	Curie
CMC	<i>critical micelles concentration</i>
CSA	<i>Cockayne syndrome A</i>
CSB	<i>Cockayne syndrome B</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
CtIP	<i>CtBP-interacting protein</i>
Cyt B	Cytochalasin B
DDR	DNA-Schadensantwort (<i>DNA damage response</i>)
DLS	Dynamische Lichtstreuung (<i>dynamic light scattering</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNA-PKcs	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>
dRP	5´desoxyribose-Phosphat
DSB	DNA-Doppelstrangbruch (<i>DNA double strand break</i>)
DSBR	Doppelstrangbruch-Reparatur
dsDNA	doppelsträngige DNA (<i>double stranded DNA</i>)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EME1	<i>essential meiotic structure-specific endonuclease 1</i>
ERCC1	<i>excision repair cross complementation group 1</i>
ERK2	<i>extracellular signal-regulated kinase 2</i>
EXO1	Exonuklease I
f	femto
FA	<i>Fanconi anaemia</i>
FAN1	<i>FANCD2/FANCI-associated nuclease 1</i>
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FDG	18-Fluor-Desoxyglukose
FEN1	<i>Flap endonuclease 1</i>
g	Gramm

GEN1	<i>Flap endonuclease GEN homolog 1</i>
GGR	<i>global genome repair</i>
GLUT	<i>facilitative glucose transporter</i>
GLUTi	GLUT-Inhibitoren
GSH	Glutathion
³H-d-Glu	³ H-desoxy-Glukose
³H-DNA	Tritium-markierte DNA
³H-O⁶BTG-Glu	Tritium-markiertes O ⁶ BTG-Glu
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HJ	Holliday-Struktur (<i>holliday junction</i>)
HPPS	<i>High Particle Performance Sizer</i>
HR	Homologe Rekombination
HSP90	<i>heat shock protein 90</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICL	<i>Interstrand-Crosslink</i>
IFN-β	Interferon-β
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
kg	kilogramm
kcps	<i>kilo counts per seconds</i>
kDA	Kilodalton
Ku70	<i>X-ray repair cross complementing protein 6 (XRCC6)</i>
Ku80	<i>X-ray repair cross complementing protein 5 (XRCC5)</i>
LIG1	DNA-Ligase I
LIG3	DNA-Ligase III
μ	mikro
m	milli
M	Molar
MDR	<i>multidrug resistance</i>
MDR1	<i>multidrug resistance protein 1</i>
MFI	mediane Fluoreszenzintensität

MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
Min.	Minute
MITC	Monomethyl-triazenoimidazol-carboxamid
MLH1	<i>MutL homolog 1</i>
MLV	multilamellaren (mehrschichtigen) Vesikel
MMR	Basenfehlpaarungsreparatur (<i>DNA mismatch repair</i>)
MNNG	N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin
MPG	N-Methylpurin-DNA-Glykosylase
MRE11	<i>meiotic recombination 11 homolog 1</i>
MRP1	<i>multi resistance protein 1</i>
MSH2	<i>MutS homolog 2</i>
MSH6	<i>MutS homolog 6</i>
Mt	mutiert
MUS81	<i>Mus81 structure-specific endonuclease subunit (SLX3)</i>
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBD	Nukleotid-Bindungsdomänen
NBS	Nijmegen-Breakage-Syndrom
NER	Nukleotidexzisionsreperatur
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NHEJ	Nicht-Homologe-Endverknüpfung (<i>Non-homologous end joining</i>)
N₃MeA	N ₃ -Methyladenin
N₇MeG	N ₇ -Methylguanin
NNK	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
O⁶BG	O ⁶ -Benzylguanin
O⁶BG-Glu	<i>2-amino-6-(benzyloxy)-9-(octyl-β-D-glycosyl)-purine</i>
O⁶BTG	O ⁶ -(4-Bromothienyl)guanin
O⁶BTG-Glu	<i>2-amino-6-(4-bromotiophen-2-yl-methoxy)-9-(octyl-β-D-glycosyl)-purine</i>
O⁶CIeTG	O ⁶ -Chlorethylguanin
O⁶MeG	O ⁶ -Methylguanin

p	piko
PALB2	<i>partner and localizer of BRCA2</i>
PARP1	Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PEG	Polyethylenglycol
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
P-gp	P-Glykoprotein
Pheo A	Pheophorbid A
PI	Propidiumjodid
PK	Positivkontrolle
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMS2	<i>postmeiotic segregation increased 2</i>
PNKP	Polynukleotid-Kinase/Phosphatase
POL β	DNA-Polymerase β
POL δ	DNA-Polymerase δ
POL ϵ	DNA-Polymerase ϵ
POL η	DNA-Polymerase η
POL κ	DNA-Polymerase κ
POL ν	DNA-Polymerase ν
POL ζ	DNA-Polymerase ζ
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
RAD23B	<i>RAD23 homolog B</i>
RAD50	<i>RAD50 homolog</i>
RAD51	<i>RAD51 homolog</i>
Rel.	Relativ
RFC	Replikationsfaktor C
Rho 123	Rhodamin 123
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAP	RNA-Polymerasen II
RPA	Replikationsprotein A
rpm	Umdrehungen per Minute (<i>revolutions per minute</i>)

RT	Raumtemperatur
SCE	Schwesterchromatidaustausch (<i>sister chromatid exchange</i>)
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SDSA	<i>synthesis-dependent strand annealing</i>
Sek.	Sekunden
Sergli A	Sergliflozin A
SGLT	Natrium-abhängiger Glukosetransporter (<i>sodium dependent glucose transporter</i>)
SGLTi	SGLT-Inhibitoren
SLC	<i>solute carrier</i>
SLX1	<i>strucutre-specific endonuclease subunit 1</i>
SLX4	<i>strucutre-specific endonuclease subunit 4</i>
S_N	Nucleophile Substitution
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismen (<i>single nucleotide polymorphisms</i>)
SSB	DNA-Einzelstrangbruch (<i>DNA single strand break</i>)
ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>single stranded DNA</i>)
Std.	Stunde
STZ	Streptozotocin
Sub-G1	<i>sub-diploid DNA content</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCR	<i>transcription coupled repair</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFIIH	Transkriptionsfaktor II H
TLS	Transläsionssynthese
TMZ	Temozolomid
TOPO3	DNA-Topoisomerase III
TP	Transportpuffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units, Einheiten für Enzymaktivität
Wt	Wildtyp

XLF	<i>XRCC4-like factor</i>
XRCC1	<i>X-ray repair cross-complementing protein 1</i>
XRCC4	<i>X-ray repair cross-complementing protein 4</i>
XPA	<i>Xeroderma pigmentosum protein A</i>
XPB	<i>Xeroderma pigmentosum protein B</i>
XPC	<i>Xeroderma pigmentosum protein C</i>
XPD	<i>Xeroderma pigmentosum protein D</i>
XPF	<i>Xeroderma pigmentosum protein F</i>
XPG	<i>Xeroderma pigmentosum protein G</i>
ZVTE	Zentrale Versuchstiereinrichtung