

Targeting RAD51:

Eine Verstärkung der Alkylanzien-induzierten
Zytotoxizität von Glioblastomzellen
durch Hemmung der
Homologen Rekombinationsreparatur

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES GRADES

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Nancy Patricia Berte

geb. am 15. März 1985 in Frankenthal (Pfalz)

Mainz, im August 2017

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2017

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2012 bis September 2016 am Institut für Toxikologie der Universitätsmedizin Mainz angefertigt und wird am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (D77) eingereicht.

*Wege, die in die Zukunft führen, liegen nie als Wege vor uns.
Sie werden zu Wegen erst dadurch, dass man sie geht.*

Franz Kafka, deutschsprachiger Schriftsteller (1883–1924)

INHALTSVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS.....	VIII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IX
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XI
ZUSAMMENFASSUNG	XV
ABSTRACT.....	XVII
1. EINLEITUNG	1
1.1. DNA-Schaden, DNA-Reparatur und Krebs.....	2
1.2. DNA-schädigende Agenzien in der Krebstherapie	5
1.2.1. Temozolomid und die Toxizität des O^6 -Methylguanins	5
1.2.2. Lomustin und die Toxizität des O^6 -Chlorethylguanins	8
1.2.3. Artesunat: DNA-Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies	9
1.3. DNA-Reparatur und DNA-Schadensantwort als Resistenzfaktor der Krebstherapie.....	11
1.3.1. DNA-Reparatur.....	11
1.3.2. DNA-Schadensantwort und Zelltod.....	22
1.4. DNA-Reparatur als <i>Target</i> in der Krebstherapie	27
1.4.1. <i>Targeting</i> der homologen Rekombination.....	28
1.5. Zielsetzung der Arbeit	31
2. MATERIAL UND METHODEN	33
2.1. Materialien	33
2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmittel.....	33
2.1.2. Geräte.....	33
2.1.3. Software	34
2.2. Methoden.....	35
2.2.1. Zellkultur	35
2.2.2. Behandlung von Zellen.....	38
2.2.3. Herstellung stabiler Zellklone.....	41
2.2.4. Proliferation, Zellzyklusbestimmungen und Replikation	43
2.2.5. Zytotoxizitätsbestimmungen.....	45
2.2.6. Bestimmung der Caspase-Aktivität	47
2.2.7. Homologer Rekombinations Reparatur-Assay.....	47
2.2.8. Autophagie	48
2.2.9. Seneszenz	48
2.2.10. Bestimmung der Interstrang- <i>Crosslinks</i> durch SCGE.....	49
2.2.11. Bestimmung von Chromosomenaberrationen.....	51
2.2.12. Proteinanalysen.....	52

2.2.13.	Xenograft-Experimente	55
3.	ERGEBNISSE	57
3.1.	Einfluss des Antimalariamittels Artesunat auf die Temozolomid-induzierte Sensitivität in Glioblastomzelllinien	58
3.1.1.	Charakterisierung des <i>in vitro</i> -Modells	58
3.1.2.	Untersuchung der Sensitivität von Glioblastomzellen gegenüber Temozolomid und Artesunat	59
3.1.3.	ART verbessert den TMZ-induzierten Zelltod.....	60
3.1.4.	Untersuchung der Zellzyklusverteilung nach kombinierter TMZ/ ART-Behandlung.....	68
3.1.5.	Untersuchung des Einflusses der ART-Nachbehandlung auf TMZ-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche	72
3.1.6.	Einfluss der ART-Nachbehandlung auf die DNA-Schadensantwort.....	74
3.1.7.	Einfluss der ART-Nachbehandlung auf die DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur	77
3.1.8.	Einfluss der ART-Nachbehandlung auf die TMZ-induzierte Autophagie	82
3.1.9.	Einfluss der ART-Nachbehandlung auf die TMZ-induzierte Seneszenz	83
3.1.10.	Einfluss der Inhibition von Ferroptose und ER-Stress auf den Behandlungs-induzierten Zelltod.....	90
3.1.11.	Einfluss der ART-Behandlung auf den TMZ-induzierten therapeutischen Effekt <i>in vivo</i> ..	92
3.2.	Gezielte Hemmung der homologen Rekombination-Reparatur: Pharmakologische HR-Inhibitoren in der <i>second-line</i> -Therapie maligner Gliome	94
3.2.1.	Charakterisierung des <i>in vitro</i> -Modells	94
3.2.2.	CCNU induziert Interstrang- <i>Crosslinks</i> in Abwesenheit von MGMT	95
3.2.3.	Die eingesetzten pharmakologischen Hemmstoffe der homologen Rekombination sind effektiv in Glioblastomzellen	97
3.2.4.	Der durch CCNU und die Hemmung der HR vermittelte Effekt auf die DNA-Replikation.	98
3.2.5.	Inhibition der homologen Rekombination erhöht den CCNU-induzierten Replikationsstress	103
3.2.6.	Einfluss der HRR-Inhibition auf die Reparatur-Kinetik der CCNU-induzierten DSBs ...	105
3.2.7.	Die Hemmung von RAD51 und MRE11 führt zu Chromosomenaberrationen	109
3.2.8.	Die Inhibition von RAD51 und MRE11 verringert das klonogen Überleben und verbessert die CCNU-induzierte Zytotoxizität	111
3.2.9.	RI-1 verbessert den durch CCNU-induzierten therapeutischen Effekt <i>in vivo</i>	115
4.	DISKUSSION	120
4.1.	Das Antimalariamittel Artesunat als <i>Sensitizer</i> der Temozolomid-basierten Glioblastomtherapie.....	121
4.1.1.	Artesunat verbessert die TMZ-induzierte Zytotoxizität in Glioblastom- und in Gliomstammzellen.....	122
4.1.2.	Artesunat moduliert die DNA-Schadensantwort.....	124

4.1.3.	Artesunat inhibiert die homologe Rekombinations-Reparatur und die TMZ-induzierte Seneszenz	126
4.1.4.	Artesunat beeinflusst Ferroptose und UPR.....	129
4.1.5.	Artesunat erhöht die therapeutische Effektivität der TMZ-Behandlung <i>in vivo</i>	131
4.2.	Targeting der homologen Rekombinations-Reparatur verbessert die Zelltodrate Alkylanzien-basierter Therapien von Glioblastomzellen	134
4.2.1.	CCNU induziert ICLs in Glioblastomzellen in Abwesenheit des DNA-Reparaturproteins MGMT.....	135
4.2.2.	CCNU und die HRR-Inhibitoren beeinflussen die DNA-Replikation	135
4.2.3.	Inhibition der HRR beeinträchtigt die Reparatur der CCNU-induzierten DSBs und erhöht die Klastogenität.....	137
4.2.4.	Die Hemmung von RAD51 und MRE11 verstärken die CCNU-vermittelte Zytotoxizität ..	139
4.2.5.	Die Hemmung von RAD51 durch RI-1 verbessert den durch CCNU-induzierten therapeutischen Effekt <i>in vivo</i>	140
5.	REFERENZEN	141
6.	ANHANG	157
	PUBLIKATIONEN.....	162
	KONFERENZTEILNAHMEN	163
	DANKSAGUNG	165
	ERKLÄRUNG	166
	CURRICULUM VITAE	167

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1 Verbreitete Alterationen der DDR in Krebserkrankungen [18].....	3
Tab. 2 Liste der verwendeten Präparate.....	39
Tab. 3 Antikörper für Immunoblotting.....	54
Tab. 4 Antikörper für Immunfluoreszenzanalysen.....	55
Tab. 5 Statistische Auswertung der Zellzyklusanalysen.	158

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 TMZ-induzierte Entstehung von O⁶-Methylguanin..... 5

Abb. 2 Modell der O⁶-Methylguanin-induzierten Toxizität. 6

Abb. 3 Lomustin-induzierte Chlorethylierung von Guanin zu O⁶-Chlorethylguanin und dessen intramolekulare Umlagerung zu DNA-Interstrand crosslinks. 8

Abb. 4 Umsetzung des Artemisinins zum aktiven Dihydroartemisinin (DHA). 10

Abb. 5 Basenexzisionsreparatur (BER). 14

Abb. 6 Mismatch-Reparatur (MMR). 15

Abb. 7 DSB- und ICL-Reparatur. 17

Abb. 8 Vereinfachte Übersicht der DDR. 22

Abb. 9 Behandlungsschema der kombinierten TMZ- und ART-Behandlung. 40

Abb. 10 Vektor-Karte des pDRGFP-Plasmids. 42

Abb. 11 Histogramm der Zellzyklusanalyse. 44

Abb. 12 Morphologie und *MGMT*-Promotor-Methylierungsstatus. 58

Abb. 13 Einfluss von TMZ und ART auf die Überlebensraten der Glioblastomzellen LN229, A172 und U87MG. 59

Abb. 14 Koloniebildungstest mit LN229-Zellen nach kombinierter TMZ- und ART-Behandlung. 61

Abb. 15 Koloniebildungstest mit A172-Zellen nach kombinierter TMZ- und ART-Behandlung. 62

Abb. 16 Koloniebildungstest mit U87MG-Zellen nach kombinierter TMZ- und ART-Behandlung. 63

Abb. 17 Morphologie der Glioblastom- und Glioblastom-Stammzellähnlichen Zellen nach Behandlung. 65

Abb. 18 Einfluss der ART-Nachbehandlung auf den TMZ-induzierten Zelltod in Glioblastomzellen und stammzellähnlichen Gliomen..... 66

Abb. 19 Wachstumskurven der Glioblastomzelllinien nach Behandlung mit TMZ und/ oder ART. 67

Abb. 20 Zellzyklusverteilung der LN229-Zellen nach TMZ- und/ oder ART-Behandlung..... 69

Abb. 21 Zellzyklusverteilung der A172-Zellen nach TMZ- und/ oder ART-Behandlung..... 70

Abb. 22 Zellzyklusverteilung der U87MG-Zellen nach TMZ- und/ oder ART-Behandlung. 71

Abb. 23 Einfluss der ART-Nachbehandlung auf die TMZ-induzierten DSBs..... 73

Abb. 24 Einfluss der ATM- bzw.ATR-Inhibition auf die ART-Nachbehandlung..... 75

Abb. 25 Einfluss der CHK1- bzw. CHK2-Inhibition auf die ART-Nachbehandlung..... 76

Abb. 26 Einfluss der ART-Nachbehandlung auf die RAD51-Proteinexpression. 78

Abb. 27 Die Reparatur-Kapazität der homologen Rekombination in LN229-Zellen..... 79

Abb. 28 Zelltodbestimmung nach kombinierter TMZ- und ART-Behandlung in RAD51-*knockdown*-Zellen der LN229-Zellen. 80

Abb. 29 Einfluss der DNA-PK-Inhibition auf den TMZ- und ART-induzierten Zelltod. 81

Abb. 30 Relatives Autophagie-Niveau der Glioblastomzelllinien LN229, A172 und U87MG. 82

Abb. 31 TMZ-induzierte Seneszenz in LN229-, A172- und U87MG-Zellen. 84

Abb. 32 TMZ-induzierte Seneszenz in GSCs G112SP. 85

Abb. 33 Einfluss der ART-Nachbehandlung auf die TMZ-induzierte Seneszenz nach p53-Inhibition... 87

Abb. 34 Einfluss des PTEN-Status auf die TMZ-induzierte Seneszenz und deren ART-Nachbehandlung. 88

Abb. 35 Einfluss der ART-Nachbehandlung auf die TMZ-induzierte Seneszenz im PTEN-*knockdown*-System..... 89

Abb. 36 Einfluss der Ferroptose und des ER-Stresses auf den TMZ und/oder ART-induzierten Zelltod in Glioblastomzellen..... 91

Abb. 37 Einfluss der ART-Behandlung auf das Tumorstadium *in vivo*. 92

Abb. 38 p53- und PTEN-Status der Glioblastom- und Patientenzelllinien..... 94

Abb. 39 CCNU-induzierte Interstrang- <i>Crosslinks</i> (ICL) in Glioblastomzellen.....	96
Abb. 40 Einfluss der pharmakologischen HR-Inhibitoren auf die Reparatur-Kapazität der homologen Rekombination.	97
Abb. 41 Einfluss der CCNU-Behandlung und/ oder HR-Inhibition auf die Zellzyklusverteilung der LN229-, LN308- und U87MG-Zellen.	99
Abb. 42 Einfluss der CCNU-Behandlung und/ oder HR-Inhibition auf die DNA-Synthese und Proliferation.....	101
Abb. 43 Mechanistische Untersuchung der Replikationshemmung.....	102
Abb. 44 Einfluss der HR-Inhibition auf die Reparatur-Kinetik der CCNU-induzierten RPA2-Foci.	104
Abb. 45 Einfluss der HR-Inhibition auf die Reparatur-Kinetik der CCNU-induzierten DSBs in LN229-Zellen.	105
Abb. 46 Einfluss der HR-Inhibition auf die Reparatur-Kinetik der CCNU-induzierten DSBs.....	107
Abb. 47 Einfluss der HR-Inhibition auf die CCNU-induzierten Chromosomenbrüche.	110
Abb. 48 Einfluss von CCNU und HR-Inhibition auf die Überlebensraten von Glioblastomzellen.	111
Abb. 49 Einfluss der HR-Inhibition auf den CCNU-induzierten Zelltod in Glioblastomzellen.	113
Abb. 50 Einfluss der HR-Inhibition auf die Caspase-Aktivierung in Glioblastomzellen.....	114
Abb. 51 Einfluss der Rad51-Inhibition auf das Tumorwachstum <i>in vivo</i>	116
Abb. 52 Einfluss der Rad51-Inhibition auf das Tumorwachstum im LN229-Xenograft-Modell.....	117
Abb. 53 Kaplan-Meier-Überlebenskurve des LN229-Xenograft-Modells.	118
Abb. 54 Bestimmung der ROS-Level in den Glioblastomzelllinien LN229, A172 und U87MG-Zellen.	157
Abb. 55 Zelltodbestimmung nach kombinierter TMZ- und ART-Behandlung der Glioblastomzelllinien LN229, A172 und U87MG mittels Annexin V/ PI-Doppelfärbung..	157
Abb. 56 Einfluss der TMZ/ART-Behandlung auf die Caspase-Aktivierung in Glioblastomzellen.....	159
Abb. 57 Einfluss von TMZ und HR-Inhibition auf die Überlebensraten von Glioblastomzellen.	159
Abb. 58 Kinetik des CCNU-induzierten Zelltods im Rad51- <i>Knockdown</i> -Zellsystem.....	160
Abb. 59 Einfluss der HR-Inhibition auf den CCNU-induzierten Zelltod in Patienten-Zelllinien.....	160
Abb. 60 Einfluss der RAD51- und MRN-Inhibition auf den CCNU-induzierten Zelltod in LN229-Zellen.	161
Abb. 61 Einfluss der Rad51-Inhibition auf den CCNU-induzierten Zelltod in Mausfibroblasten. Mittels	161

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5'dRP	5'-Deoxyribose-5-Phosphat
8-OxoG	8-Oxo-7,8-Dihydroguanin
A	Adenin
ACNU	1-[(4-Amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl]-3-(2-chlorethyl)-3-nitrosoharnstoff
A-EJ	<i>Alternative end-joining</i> , alternative Endverknüpfung
AIC	5-Aminoimidazol-4-carboxamid
AP	Apurin/apyrimidin
APAF-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
APE1	AP Endonuklease 1
ART	Artesunat
ATF	<i>Activating transcription factor</i>
ATG	<i>Autophagy-related protein</i>
ATM	<i>Ataxia-teleangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>Ataxia-teleangiectasia and RAD3-related</i>
ATRIP	<i>ATR interacting protein</i>
BAK	<i>BCL-2 antagonist/killer 1</i>
BAX	<i>BCL-2-associated X protein</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BER	Basenexzisionsreparatur
BIP/GRP78	<i>Binding immunoglobulin protein/ 78 kDa glucose-regulated protein</i>
BRCA1/2	<i>Breast cancer 1/2</i>
C	Cytosin
C ₁₂ FDG	5-Dodecanoylaminofluorescein-di-β-D-Galactopyranosid
CA	Chromosomenaberrationen
CAD	<i>Caspase activated DNase</i>
Caspasen	<i>Cysteinyln-aspartate specific protease</i>
CCNU	1-(2-Chlorethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosoharnstoff
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent-kinase-inhibitor 2A</i>
CFA	<i>Colony formation assay</i> ; Koloniebildungstest
CHOP	<i>CCAAT/-enhancer-binding protein homologous protein</i>
CNUs	<i>Chloroethylating nitrosoureas</i> ; Chlorethylierende Nitrosoharnstoffe
CRC	<i>Colorectal cancer</i> , Darmkrebs
CtIP	<i>C-terminal binding protein 1 (CtBP1) interacting protein</i>
DDR	<i>DNA damage response</i> ; DNA-Schadensantwort
DHA	Dihydroartemisinin
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK _{cs}	<i>DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit</i> ,
DSB/DSBs	<i>DNA double-strand break/ breaks</i> ; DNA-Doppelstrangbruch/ -brüche
DSBR	DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur
EdU	5-Ethynyl-2'-Deoxyuridin
EGFR	<i>Epidermale growth factor receptor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>ER-associated degradation</i>
ERCC1	<i>Excision repair cross-complementing protein 1</i>
EtOH	Ethanol
EXO1	<i>Exonuklease 1</i>

FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FANC	<i>Fanconi anaemia group protein</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FEN1	<i>Flap endonuclease 1</i>
G	Guanin
GB/GBs	Glioblastom/ Glioblastome
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GSC/GSCs	Glioma stem cell/ - cells; Gliom-stammzellähnliche Zellen
Gy	Gray
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HJ	<i>holliday junction</i> ; Holliday-Strukturen
HRR	homologen Rekombinations-Reparatur
i	inhibiert
ICL	Interstrang-Crosslink
ip	intraperitoneal
IR	<i>Ionizing radiation</i> , ionisierende Strahlung
IRE1	<i>Inositol-requiring enzyme 1</i>
KG	Körpergewicht
Kon	Kontrolle
LIG3	DNA-Ligase III
MAPK	<i>mitogen-activated protein cascade</i> ; Mitogen-aktivierte Protein-Kaskade
MGMT	<i>O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase</i>
MMR	Basenfehlpaarungs (<i>Mismatch</i>)-Reparatur
MMS	Methylmethanesulfonat
MPG	<i>N-Methylpurin-DNA-Glykosylase</i>
MSH	<i>MutS protein homolog</i>
mt	mutiert
MTIC	5-(3-Methyltriazin-1-yl)-imidazol-4-carboxamid
N3-MeA	N3-Methyladenin
N7-MeG	N7-Methylguanin
NBS1	<i>Nijmegen breakage syndrome protein 1</i> ,
NEIL	<i>Nei-like protein</i>
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NGS	<i>Normal goat serum</i>
NHEJ	Non-homologous end joining, nicht-homologe Endverknüpfung
ns	nicht signifikant
<i>O⁶-BG</i>	<i>O⁶-Benzylguanin</i>
<i>O⁶-ClEtG</i>	<i>O⁶-Chlorethylguanin</i>
<i>O⁶-MeG</i>	<i>O⁶-Methylguanin</i>
OGG1	<i>8-oxoguanin DNA glycosylase</i>
PARP1	<i>poly(ADP-ribose)polymerase 1</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PERK	<i>Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase</i>
PI	Propidiumiodid
Pol	DNA-Polymerase
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
RB1	<i>Retinoblastoma protein</i>
RFC	Replikationsfaktor C
RIPK	<i>Receptor-interacting protein kinases</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> ; reaktive Sauerstoffspezies
RPA	<i>Replication protein A</i>

RS	Replikationsstress
RT	Raumtemperatur
SA	Seneszenz-assoziierten
sc	subkutan
SCGE	<i>Single cell gel electrophoresis</i> , Einzelzellgelelektrophorese
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> ; Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sh/si RNA	<i>small hairpin RNA/ small interfering RNA</i>
S _N 1	Nukleophile Substitution, monomolekular
SP	Subpopulation
SSB	<i>Single-strand breaks</i> , Einzelstrangbrüche
ssDNA	<i>single-stranded DNA</i> , einzel-strängige DNA
T	Thymin
TCM	traditionellen Chinesischen Medizin
TDP1	<i>Tyrosyl-DNA-Phosphodieseterase 1</i>
TI	<i>Tail-Intensity</i>
TLS	<i>Translesion synthesis</i> ; Translasionssynthese
TMZ	Temozolomid
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TOPO1	Topoisomerase 1
UDG	Uracil-DNA-Glykosylase
Upm	Umdrehungen pro Minute
UPR	<i>Unfolded protein response</i> ; ungefaltete Proteinantwort
UV	ultraviolett
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>World health organization</i> , Weltgesundheitsorganisation
wt	wildtypisch
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
XP	<i>Xeroderma pigmentosum</i>
XRCC1	<i>X-ray repair cross-complementing protein 1</i>
ZS	Zytostatikum

ZUSAMMENFASSUNG

Das Glioblastom ist eine Tumorerkrankung des zentralen Nervensystems mit meist tödlichem Ausgang. Die gegenwärtige auf alkylierenden Zytostatika basierende Chemotherapie bietet bis heute keinen zufriedenstellenden Therapieerfolg. Um das therapeutische Ansprechen zu verbessern, rücken Kombinations- und gezielte Behandlungsstrategien – sog. *Targeting*-Strategien – immer mehr in den Mittelpunkt.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei neue, kombinatorische Behandlungsansätze mit dem Ziel untersucht, Glioblastomzellen gegenüber den klinisch relevanten Zytostatika Temozolomid (TMZ) und Lomustin (CCNU) zu sensibilisieren.

Im ersten Ansatz wurde das Antimalariamedikament Artesunat (ART) mit TMZ, dem Goldstandard der Glioblastomtherapie, kombiniert. Die induzierte Zytotoxizität konnte auf den Anstieg von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) zurückgeführt werden. Gleichzeitig wurde auch die Hemmung der homologen Rekombinationsreparatur (HRR), die DSBs an der Entstehung hindert oder diese eliminiert, nachgewiesen. Ferner reduzierte ART die durch TMZ-induzierte Seneszenz, was möglicherweise ebenso zur Verstärkung der Zytotoxizität beitrug. Untersuchungen im Nacktmausmodell mit subkutan injizierten Glioblastomzellen zeigten nicht nur eine gute Verträglichkeit beider Medikamente, sondern auch eine signifikante Verbesserung der TMZ-basierten Chemotherapie in Kombination mit ART.

In einem zweiten Ansatz wurde die zielgerichtete Behandlungsstrategie durch den Einsatz pharmakologischer Hemmstoffe erreicht. B02 und RI-1 inhibieren RAD51, das Schlüsselenzym der HRR, während Mirin als MRE11-Hemmstoff den an der DNA-Schadens-Antwort beteiligten MRN-Komplex inhibiert. Eine vergleichende Untersuchung der Wirkung dieser Inhibitoren zeigte, dass der RAD51-Hemmstoff RI-1 am stärksten die Toxizität von CCNU auf Glioblastomzellen unterstützte. In Kombination mit CCNU verhinderte RI-1 die Reparatur der CCNU-induzierten DSBs. Dies führte neben einer Verstärkung der Klastogenität von CCNU auch zu einer Steigerung des Zelltods. Im Xenograft-Mausmodell wurde die Kombinationstherapie mit CCNU gefolgt von RI-1 gut vertragen; sie verhinderte nicht nur das Tumorwachstum, sondern bedingte sogar in einigen Tieren eine vollständige Regression der Tumoren.

Beide untersuchten Behandlungsansätze bieten aufgrund der erhaltenen präklinischen Daten eine vielversprechende Grundlage für die Initialisierung klinischer Studien, die möglicherweise zu einer tatsächlichen Verbesserung der Glioblastomtherapie führen werden.

ABSTRACT

Glioblastoma is a tumor disease of the central nervous system with mostly fatal outcome. The current chemotherapy based on alkylating agents does not offer a satisfactory clinical benefit for glioblastoma patients. Despite a radical treatment regimen, the median survival of these patients is below 15 months. In order to improve the response to the applied therapy, combination and targeted treatment strategies become increasingly important.

In the present study, two new combined treatment approaches were used to sensitize glioblastoma cells to the clinically relevant cytostatic agents temozolomide (TMZ) and lomustin (CCNU).

In the first approach, the antimalarial drug artesunat (ART) was combined with the alkylating agent TMZ, the gold standard of glioblastoma therapy. The induced cytotoxicity could be attributed to an increase of DNA double-strand breaks (DSBs). Simultaneously, the inhibition of homologous recombination repair (HRR), which prevents from or eliminates DSBs, has also been demonstrated. Furthermore, ART reduced TMZ-induced senescence, possibly also contributing to the enhancement of cytotoxicity. Investigations in the nude mouse model with subcutaneously injected glioblastoma cells showed a good tolerability of both drugs and significant improvement of TMZ-based chemotherapy concomitant with ART.

In a second approach, a targeted treatment strategy was achieved through the use of pharmacological inhibitors. RAD51, the key enzyme of HRR, was inhibited by B02 or RI-1, whereas MRN complex, which is involved in the DNA damage response, was silenced by mirin, an inhibitor of MRE11. A comparative study analyzing the reinforcement of CCNU-induced cytotoxicity in glioblastoma cells showed that the RAD51 inhibitor RI-1 is the most promising one of these inhibitors. In combination with CCNU, RI-1 prevented the repair of CCNU-induced DSBs. In addition to enhancing the clastogenicity of CCNU, combined treatment also led to an increase in cell death. In the xenograft mouse model, combination therapy with CCNU followed by RI-1 treatment was well tolerated and prevented tumor growth. In some animals a complete regression of tumors was observed.

Based on the preclinical data obtained in this work, the combination treatments offer a promising basis for clinical trials, which may finally lead to improvements in glioblastoma therapy.

1. EINLEITUNG

Das Glioblastom (GB, WHO-Grad IV-Gliome) ist der häufigste und tödlichste Tumor des zentralen Nervensystems [1]. Jährlich erkranken 3-5/ 100 000 Personen an einem GB, wobei in 40 % der Fälle mehr Männer als Frauen betroffen sind [1]. Die Tumoren entstehen aus Gliazellen und werden in primäre sowie sekundäre GBs unterschieden [2]. Interessanterweise entstehen lediglich 10 % (sog. sekundären GBs) aus niedergradigen, diffusen (WHO-Grad II) oder anaplastischen Astrozytomen (WHO-Grad III). Die Mehrzahl der GBs (primäre Tumore) entstehen *de novo* ohne maligne Vorläufer [2]. Morphologisch differieren primäre und sekundäre GBs kaum, unterschieden werden sie durch genetische Alterationen: Mutationen der Isocitryhydrogenasen (*IDH1/IDH2*) sind für sekundäre GBs einzigartig [2]. Um die Proliferation des Tumors zu fördern, inaktivieren GBs den G1/S-Kontrollpunkt, was durch eine Modifizierung des S-Phase-abhängigen *Retinoblastoma protein* (RB1) ermöglicht wird. Primäre GBs erreichen dies durch homozygote Deletion von *CDKN2A-p16^{INK4a}*, sekundäre GBs durch *RB1*-Promotormethylierung [3]. Sofern *TP53* nicht mutiert vorliegt, führt der Verlust von *Cyclin-dependent-kinase-inhibitor 2A* (*CDKN2A*) und folglich *p14^{ARF}* zu einer unkontrollierten Degradation von p53 [3]. Zusätzlich führen weitere Mechanismen zur einer gesteigerten Proliferationsrate der GB-Zellen. So wird z. B. der *Epidermale growth factor receptor* (EGFR) durch Amplifikationen oder Mutationen permanent aktiviert, was die Stimulation weiterer Signalwege (AKT, MAPK, PTEN) begünstigt [4]. Des Weiteren dient der Promotormethylierungs-Status des *O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase* (*MGMT*)-Gens als prädiktiver Marker einer Alkylanzien-basierten Chemotherapie [5-7].

Trotz Behandlung (Details in Kap. 1.2.1) haben GB-Patienten eine schlechte Prognose. Bevölkerungsbezogene Studien berichten über mediane Überlebensraten von 42,4 % nach sechs Monaten und 17,7 % nach einem Jahr [8]. Laut des zentralen Hirntumor-Registers der USA lag die Fünfjahresüberlebensrate für GB-Erkrankte zwischen 2007 und 2011 bei lediglich 5 % [9]. Die gegenwärtig erfolgversprechendste Therapie, die die chirurgischen Resektion und anschließende Radiochemotherapie des Tumors empfiehlt, verlängert das mediane Überleben der Patienten lediglich auf 14,6 Monate [10, 11]. Trotz größter Anstrengungen und bedeutsamen Fortschritten im Bereich der Grundlagen- und klinischen GB-Forschung konnte das Gesamtüberleben der Patienten nicht sig-

nifikant verbessert werden [12, 13]. DNA-Reparatur-Mechanismen bewirken dabei zu einem sehr beachtlichen Anteil die Entwicklung von Zytostatika-Resistenzen und das Auftreten von Rezidiven.

1.1. DNA-Schaden, DNA-Reparatur und Krebs

Zelluläre DNA ist einer Vielzahl von DNA-schädigenden Einflüssen ausgesetzt. Dabei sind die meisten DNA-Schäden endogener Natur z. B. durch fehlerhafte Replikationen, spontanen Hydrolysen oder durch reaktive Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS), die infolge diverser Stoffwechselforgänge gebildet werden. Der Anteil exogen-induzierter DNA-Läsionen ist vergleichbar gering und wird vor allem durch UV-Licht oder chemische Verbindungen, die in Nahrungsmitteln oder Zigarettenrauch enthalten sind, ausgelöst [14]. Um die alltäglichen endo- und exogenen DNA-Schädigungen zu beseitigen, haben Zellen ein fein abgestimmtes System aus DNA-Reparatur und Zellzykluskontrollpunkten entwickelt. Der DNA-Schaden wird erkannt, der Zellzyklus arretiert und die Läsion durch das entsprechende DNA-Reparatur-System behoben oder – sofern dies nicht möglich ist – programmierte Zelltodprozesse zur Elimination der geschädigten Zellen ausgelöst. Diese DNA-Schadensreaktion (engl. *DNA damage response*, DDR) schützt die Zelle vor genomischer Instabilität und Mutationen. Genomische Instabilität ist u. a. charakteristisch für die Entstehung von Krebs [15]. Aufgrund einer erhöhten Proliferationsrate stehen präkanzerogene Zellen und Tumoren unter größerem Replikationsstress (RS) als gesunde Zellen. Im Vergleich ist sogar der Anteil an geschädigter DNA höher, was darauf hindeutet, dass RS ebenfalls zur genetischen Instabilität beiträgt [16, 17]. Keimbahn-Polymorphismen oder Mutationen in DDR-Genen prädisponieren für Krebserkrankungen, wie die Defekte in Basenexzisions-, Basenfehlpaarungs-, Doppelstrangbruchreparatur oder heterozygote Keimbahnmutationen in Genen der Zellzykluskontrollpunkte belegen. Häufig treten auch somatische Mutationen oder epigenetisches *Silencing* einiger Gene, die für DDR-Faktoren kodieren, auf. Eine Übersicht der mit Krebserkrankungen assoziierten DDR-Alterationen ist in Tab. 1 zusammengefasst.

Tab. 1 Verbreitete Alterationen der DDR in Krebserkrankungen [18]

Reparaturweg	Protein	Assoziation mit Krebserkrankungen	Ref.
Direkte Reparatur	MGMT	Erhöhte MGMT-Expression bedingt Resistenz ggü. DNA-alkylierenden Agenzien. Methylierung des <i>MGMT</i> -Promotors ist bei Hirntumoren mit verbessertem Ansprechen auf BCNU und TMZ assoziiert.	[6, 19, 20]
BER	OGG1	Mutationen und R46Q-Varianten sind mit Nierenkrebs assoziiert. <i>OGG1</i> -Methylierung in vers. Krebsentitäten beobachtet. Expressionsverlust bei Brustkrebs mit schlechter Prognose, <i>OGG1</i> -S326C-Polymorphismus mit reduzierter Aktivität und erhöhtem Lungenkrebs-Risiko assoziiert.	[21, 22]
	APE1	Erhöhte APE1-Expression in vers. Tumoren mit Medikamenten- und Radioresistenzen assoziiert.	[23]
	XRCC1	XRCC1-R1944W-Polymorphismus erhöht BER-Effizienz und wirkt somit protektiv ggü. Krebs, XRCC1-R399Q-Polymorphismus reduziert BER-Effizienz und prädisponiert Krebs.	[22, 24]
	PARP1	Erhöhte Expressionslevel in Tumoren beobachtet. PARP1-V762A-Polymorphismus vermittelt Reduktion der PARP-Aktivität und prädisponiert für vers. Krebsarten.	[24, 25]
	Polβ	30 % der Tumore besitzen Polβ-Mutationen, die nicht in gesundem Gewebe vorkommen: z. B. <i>frameshift</i> -Mutationen, del208-236, K289M und 1260M-dominant-negative Mutationen	[22]
NER	XP-Proteine	Charakteristisch für XP sind UV-Hypersensibilität und Hautkrebs. <i>XPC</i> -Methylierung bei Blasenkrebs, SNPs in <i>XPA</i> und <i>XPC</i> sind mit Lungen- und Blasenkrebs, SNPs in <i>XPG</i> mit einer Sensitivität ggü. Chemotherapeutika assoziiert.	[26, 27]
	ERCC1	ERCC1-Polymorphismen sind mit Haut- und Lungenkrebs assoziiert. <i>ERCC1</i> -Methylierungen in Gliomen.	[26]
TLS	Pol H/ Pol Q	Aberrante Expressionslevel in vers. Tumoren.	[28]
MMR	MSH2/ MSH1	MMR-Defekte verursachen das Lynch Syndrom und HNPCC, Erkrankungen, die mit Kolorektal-, Magen-, Ovarial- und Endometrialkarzinom assoziiert sind. <i>MLH1</i> -Promotormethylierung ist assoziiert mit spontan auftretenden Tumoren in diesen Geweben. MMR-Defekte bedingen Resistenzen ggü. den DNA-methylierenden Agenzien 6-Thioguanin und Cisplatin.	[29, 30]
DSBR	NBS1	NBS1-induziertes <i>Nijmegen breakage</i> -Syndrom ist gekennzeichnet durch chromosomalen Instabilität, IR-Sensitivität und prädisponiert für Krebs, besonders Lymphome. Heterozygote Mutanten sind ebenso anfällig für Krebs.	[31, 32]
	MRE11	Punktmutationen in Ovarialkarzinomen. Verkürzungen der Mikrosatelliten (T11) wurde in 93 % primärer Kolorektalkarzinomen entdeckt, vermutlich aufgrund einer MMR-induzierten Mikrosatelliten-Instabilität	[33-36]
NHEJ	Ku70	SNPs sind mit Brustkrebs, epigenetisches <i>Silencing</i> mit Brust-, Kolorektal- und Lungenkrebs assoziiert.	[37]
	Ku80	Epigenetisches <i>Silencing</i> ist mit Lungenkrebs assoziiert.	[38]
	DNA-PKcs/ LIG4/ XRCC4	SNPs sind mit Gliomen assoziiert. SNPs schützen möglicherweise gegen Brust- und Lungenkrebs. MiR-101 (induziert durch NMYC) interagiert zielgerichtet mit DNA-PKcs und reduziert dessen Expression	[36, 39, 40]
	XRCC4		
HRR	BRAC1/ BRAC2	Täger einer BRCA1/BRCA2-Mutation haben ein erhöhtes Risiko ggü. Brust-, Eierstock-, Prostata-, Pankreaskrebs, Melanomen und anderen malignen gastrointestinalen, gynäkologischen oder hämatologischen Erkrankungen. <i>BRCA1</i> -Promotormethylierungen kommen häufig in spontanen Brust-, Ovarial- und Lungenkarzinomen vor.	[41-43]
	XRCC2	XRCC2 ist ein RAD51-Paralog, <i>frameshift</i> -Mutationen führen zu Mikrosatelliten-Instabilitäten (MSI), das in MSI-Tumoren die Sensitivität ggü. Crosslinkern bedingt.	[44]
	RAD50	<i>Frameshift</i> -Mutationen der <i>RAD50</i> -Mikrosatelliten sind mit verkürzten Proteinen assoziiert und treten in 31 % der gastrointestinalen Krebserkrankungen auf.	[45]

	FANC-Proteine	Fanconi-Anämie (FA) ist mit malignen hämatologischen Erkrankungen (MDS, AML), HNSCC und ösophagealen oder gastrointestinalen Krebserkrankungen assoziiert. Die häufigsten Mutationen erscheinen in FANCA (65%), FANCC (15 %) oder FANCG (10%). <i>FANCD1 (BRCA2)</i> , <i>FANCN (PALB2)</i> und <i>FANCF (BRIP1)</i> sind Gene, die mit Brustkrebs assoziiert wurden. FANC-Methylierung kommen häufig in sporadischen Krebserkrankungen vor, z. B. <i>FANCF</i> ist im Lungen-, Ovarial- und Zervixkarzinom methyliert.	[46-48]
Zellzyklus-kontrollen	ATM/ CHK2	AT ist assoziiert mit Radiosensitivität und einer 100-fach erhöhten Krebsprädisposition. Heterogene Keimbahnmutationen in <i>ATM</i> sind assoziiert mit Leukämien, sowie Brust- und Pankreaskrebs. Epigenetisches <i>Silencing</i> von <i>ATM</i> und <i>ATM</i> -Polymorphismen sind assoziiert mit Brust-, Lungen- und Kolorektalkarzinomen. MiR-421 und miR-101, induziert durch <i>NMYC</i> , interagieren gezielt mit <i>ATM</i> . <i>CHK2</i> -Inaktivierung ist in mehreren humanen Tumoren beobachtet worden.	[40, 49-51]
	ATR	<i>Frameshift</i> -Mutationen durch die Deletion von A(10)-Mikrosatelliten, die durch <i>MMR</i> -Defekte verursacht wurde, sind mit Leukämien, Lymphomen und Magen- und endometrialen Krebserkrankungen assoziiert.	[52]

Abk.: AML=akute myeloische Leukämie, APE1= AP Endonuklease 1, AT=Ataxia teleangiectasia, ATM=Ataxia-teleangiectasia mutated, ATR= Ataxia-teleangiectasia and RAD3-related, BER=Basenexzisionsreparatur, BRIP1=BRCA1-interacting protein C-terminal helicase 1, DDR=DNA damage response, DNA-PKcs=DNA-dependent protein kinase catalytic subunit, DBS=DNA double-strand break, FANC=Fanconi anaemia group protein, HNPCC=hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNSCC=head and neck squamous cell carcinoma, HRR=homologe Rekombinations-Reparatur, MGMT=O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase, MDS=myelodysplastische syndrome, miR=mikroRNA, MMR=mismatch-Reparatur, MSI= Mikrosatelliten-Instabilität, NBS1=Nijmegen breakage syndrome protein 1, NER=Nukleotidexzisionsreparatur, NHEJ=non-homologous end joining, OGG1=8-oxoguanin DNA glycosylase 1, PARP1=poly(ADP-ribose)polymerase 1, Pol=DNA-Polymerase, SNP=single nucleotide polymorphism, TLS=translesion synthesis, TMZ=Temozolomid, UV=ultraviolett, XP=Xeroderma pigmentosum.

Der Verlust oder die Herunterregulation einzelner DNA-Reparatur-Faktoren wird sehr wahrscheinlich durch eine erhöhte Aktivität anderer Elemente oder Reparaturwege kompensiert. Im Gegensatz dazu kann eine Heraufregulation dieser DNA-Reparaturwege zur Entstehung von Resistenzen beitragen. Das wiederum verschlechtert das Therapieansprechen, da die meisten Chemotherapeutika und Bestrahlungstherapien das zytotoxische Potential über die Induktion von DNA-Schäden entfalten. Kontroverserweise übernimmt die DNA-Reparatur damit in der Krebstherapie zwei entscheidenden Funktionen: Einerseits ist sie einer der größten Herausforderungen, die es im Zuge einer verbesserten Krebstherapie zu überwinden gilt. Andererseits bietet sie auch eine geeignete Möglichkeit, die Therapie durch eine gezielte Hemmung der DNA-Reparatur in ihrer Effektivität zu steigern.

1.2. DNA-schädigende Agenzien in der Krebstherapie

1.2.1. Temozolomid und die Toxizität des O^6 -Methylguanins

Temozolomid (TMZ) ist ein oral und intravenös verabreichtes, monofunktionell methylierendes Zytostatikum, welches zur simultanen, adjuvanten und palliativen Therapie von GBs in Kombination mit der Strahlentherapie eingesetzt wird. Als Goldstandard der GB-Behandlung gilt bis heute das Stupp-Protokoll [11]: Nach maximaler Resektion des Tumors (sofern dieser operabel ist) beginnt eine kombinierte Radiochemotherapie über einen Zeitraum von sechs Wochen. Hierbei wird der Patient pro Woche fünfmal mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt und erhält täglich TMZ (75-100 mg/m²). Nach einer kurzen Regenerationsphase von vier Wochen beginnt die adjuvante Chemotherapie über sechs Zyklen. Die TMZ-Applikation (150-200 mg/m²) erfolgt hierbei an fünf aufeinanderfolgenden Tagen, bevor - nach 23 Tagen ohne TMZ-Gabe - ein neuer Zyklus beginnt. Im Vergleich zu anderen methylierenden Chemotherapeutika wie Procarbazin [53] und Dacarbazin [54] bedarf TMZ keiner metabolischen Aktivierung. Unter physiologischen Bedingungen hydrolysiert TMZ unter Abspaltung von Kohlenstoffdioxid spontan zu dem aktiven Metaboliten 5-(3-Methyltriazen-1-yl)-imidazol-4-carboxamid (MTIC) [55] (Abb. 1).

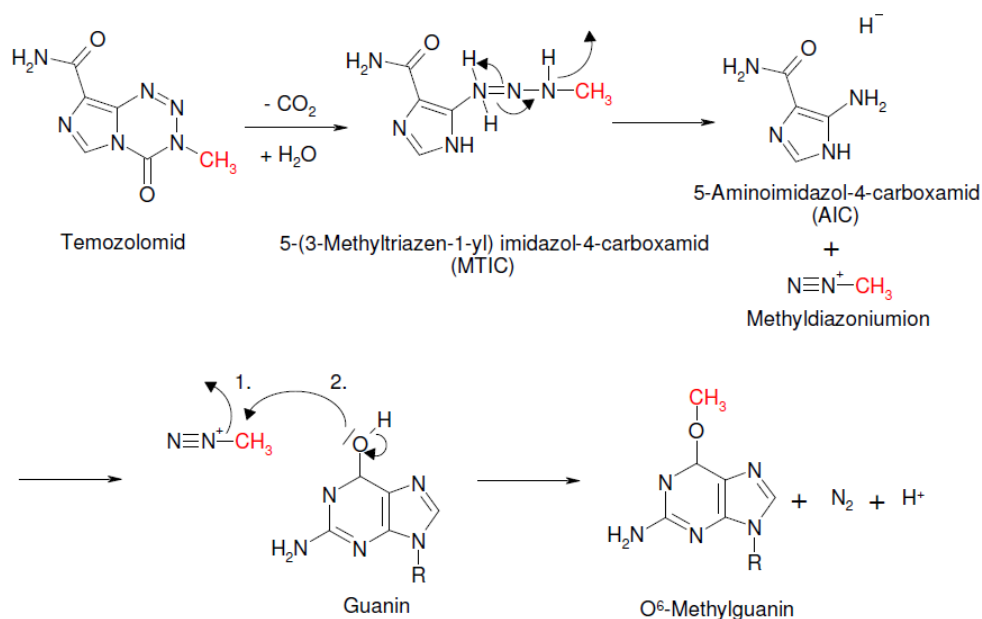


Abb. 1 TMZ-induzierte Entstehung von O^6 -Methylguanin. Spontane Hydrolyse des TMZ zu MTIC, das zu AIC und einem hochreaktiven Methyl diazoniumion zerfällt. Dieses wiederum methyliert über einen S_N1 -Mechanismus Guanin, indem dieses mit dem freien Elektronenpaar in O^6 -Position mit dem Methylkation zu O^6 -Methylguanin reagiert (Abb. modifiziert nach [56]).

MTIC ist ebenfalls sehr instabil und zerfällt zu 5-Aminoimidazol-4-carboxamid (AIC) und dem hochreaktiven Methyldiazoniumion. Freie Elektronenpaare der DNA-Basen reagieren mit dem Methylkation, wobei die Stickstoff- und Sauerstoffatome der Basen über eine nukleophile Substitution (S_N1 -Mechanismus) methyliert werden. Die *N7*-Position des Guanins z.B. ist sehr nukleophil, weshalb *N7*-Methylguanin (*N7*-MeG) mit 60 – 80 % die am häufigsten vorkommende DNA-Läsion nach Behandlung mit einem S_N1 -Alkylanz darstellt [57]. Obwohl dem *N7*-MeG weder mutagene noch zytotoxische Effekte *per se* zugesprochen werden, ist diese Läsion anfällig für spontane Depurinierungen. Die daraus resultierende apurine Stelle kann DNA-Polymerasen inhibieren und ist gleichzeitig auch Ausgangspunkt für Mutationen, die durch fehlinkooperierte Basen während der DNA-Replikation entstehen [58, 59]. Neben *N7*-MeG entsteht in 10 – 20 % der Fälle *N3*-Methyladenin (*N3*-MeA) [60].

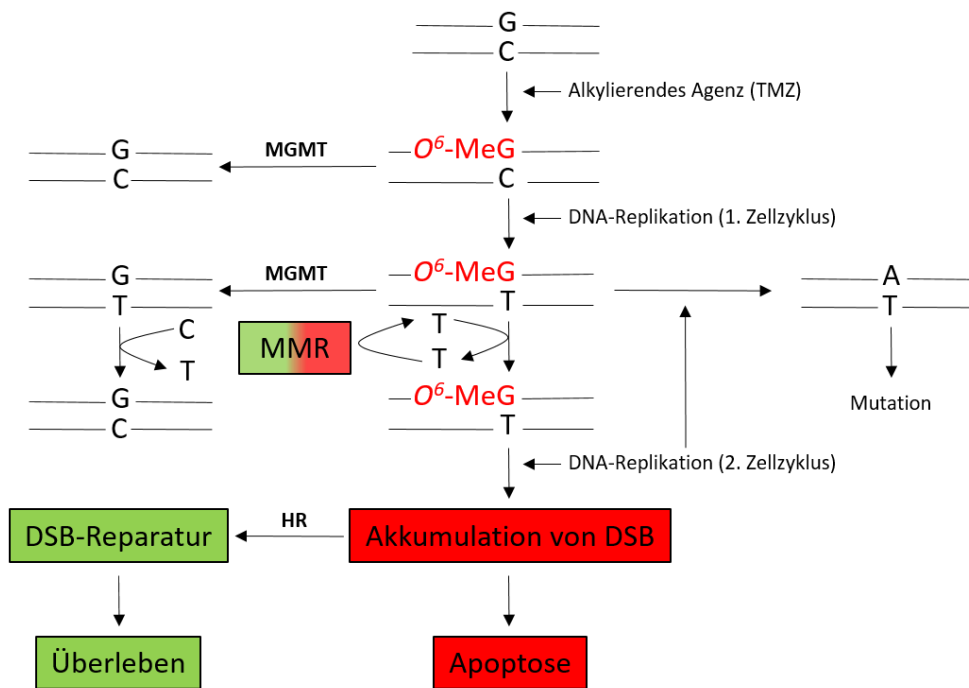


Abb. 2 Modell der O^6 -Methylguanin-induzierten Toxizität. Vereinfachte Darstellung der replikationsabhängigen O^6 -MeG-vermittelten Mutation, DNA-Reparatur und Induktion der Apoptose. Abk.: A=Adenin, C=Cytosin, DBS=Doppelstrangbruch, G=Guanin, HR=homologe Rekombination, MGMT= O^6 -Methylguanin-DNA-Methyltransferase, MMR=Mismatch-Reparatur, O^6 -MeG= O^6 -Methylguanin, T=Thymin, TMZ=Temozolomid.

Im Gegensatz zu *N7*-MeG sind Alkylierungen in *N3*-Position des Adenins sehr zytotoxisch. Die meisten DNA-Polymerasen blockieren durch diese Modifikation, was zu Schwesterchromatidaustausch, chromosomalen Brüchen und schließlich zum S-Phase-Arrest führt [61]. Monofunktionelle Agenzien können weiterhin auch die *N1*-Position des Adenins und die *N3*-Position des Guanins alkylieren, was neben Fehlpaarungen auch zu replikationsblockieren-

den Läsionen wie *N*1-MeA und *N*3-MeG führt [57, 62]. Mit einem Gesamtanteil von lediglich 0,3 – 8% ist *O*⁶-Methylguanin (*O*⁶-MeG) ein seltenes DNA-Addukt der beschriebenen Alkylantien. Gleichzeitig ist es jedoch eine sehr toxische Läsion [56]. Eine Übersicht der Prozessierung dieses DNA-Addukts ist vereinfacht in Abb. 2 dargestellt. *O*⁶-MeG ist sehr stabil und wird durch das Reparaturprotein *O*⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) entfernt. Bleibt die Reparatur aus, basiert das mutagene Potential des *O*⁶-MeG auf der Fehlpaarung mit Thymin (T) anstelle eines Cytosins (C) während der Replikation [63]. In der nächsten S-Phase würde sich dann eine G:A-Transition manifestieren. Diese ist potentiell karzinogen und könnte eine maligne Transformation auslösen [64]. An der Entstehung der zytotoxischen Doppelstrangbrüche (engl. *DNA double-strand breaks*, DSBs) ist ironischerweise ein DNA-Reparaturprozess beteiligt, der die Fehlpaarung von *O*⁶-MeG:T erkennt und prozessiert. Das MutSα-Heterodimer (MSH2/MSH6), eines der Schlüsselproteine der Basenfehlpaarungsreparatur (*Mismatch-Reparatur*, MMR), registriert die Fehlpaarung, rekrutiert MutLα (PMS2/MLH1); die Exonuklease 1 (EXO1) sorgt durch den Einschnitt in die DNA für die Resektion des dem Schaden gegenüberliegenden DNA-Strangs [57]. Unglücklicherweise persistiert *O*⁶-MeG in der DNA und es kommt zum erneuten Einbau von T durch die MMR (s. Kapitel 1.3.1.3). Die MMR ist nicht in der Lage, die Läsion korrekt zu beheben, was in mehreren ineffektiven Reparaturzyklen gipfelt [29]. Durch diese wiederkehrenden Reparaturversuche entstehen durch die EXO1-Aktivität Lücken bzw. Einschnitte im DNA-Strang, die während der nächsten Replikation zum Zusammenbrechen der Replikationsgabel führen [65]. Sekundär entstehen auf diese Weise DSBs, die im zweiten Zellzyklus nach der *O*⁶-MeG-Induktion auftreten [66] und vorwiegend durch die homologe Rekombinations-Reparatur (HRR) repariert werden [67]. Ist die HRR-Kapazität erschöpft oder aufgrund anderer Ereignisse eingeschränkt, induzieren diese DSBs sehr effektiv Apoptose, eine Form des Zelltods (s. Kapitel 1.3.2.2). Im Vergleich zu MGMT-defizienten Zellen führen S_N1-methylierende Agenzien in MGMT-profizienten Zelllinien zu einer verminderten Apoptoseinduktion [68, 69].

1.2.2. Lomustin und die Toxizität des O^6 -Chlorethylguanins

Lomustin (1-(2-Chlorethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosoharnstoff, CCNU) ist ein lipophiles, chlorethylierendes Agens aus der Gruppe der Nitrosoharnstoffe. Es wird vorwiegend als sog. *second line*-Therapeutikum zur Behandlung von GBs und metastasierenden Melanomen eingesetzt [70, 71]. Wie TMZ benötigt CCNU keine metabolische Aktivierung. Unter physiologischen Bedingungen zerfallen Nitrosoharnstoffe in reaktive 2-Chlorethyldiazohydroxide und Isocyanatderivate (Abb. 3).

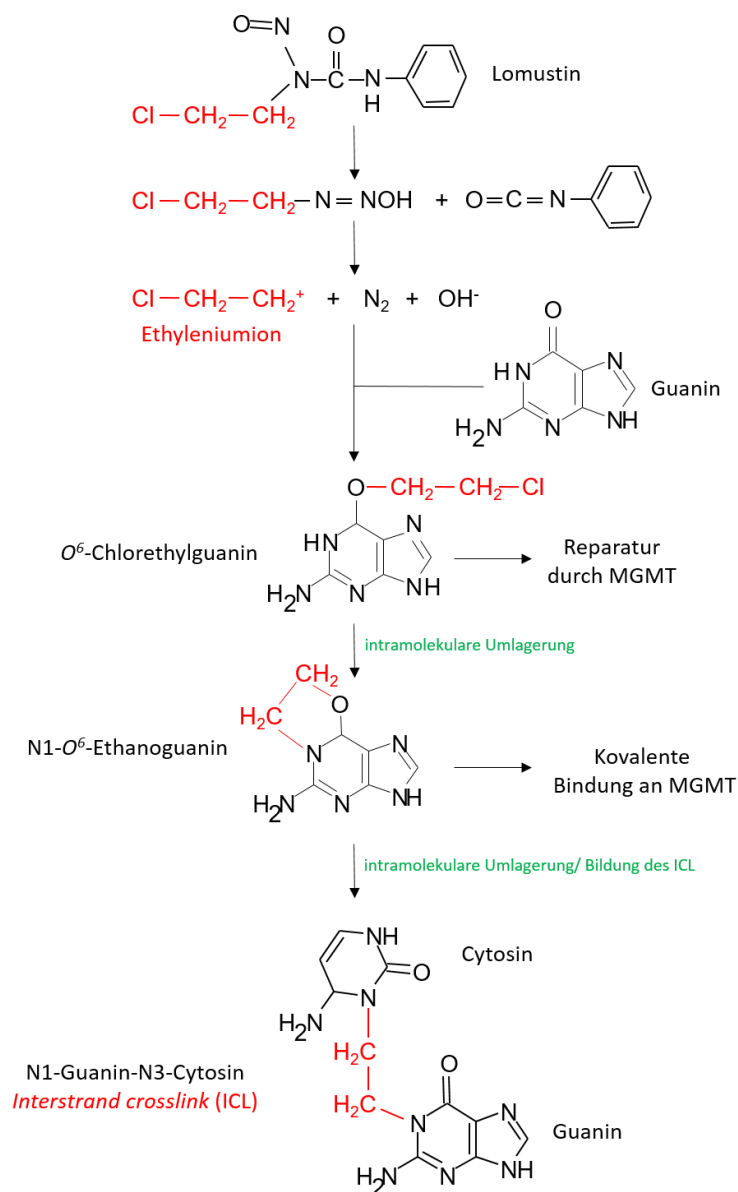


Abb. 3 Lomustin-induzierte Chlorethylierung von Guanin zu O^6 -Chlorethylguanin und dessen intramolekulare Umlagerung zu DNA-*Interstrand crosslinks*. Nach der Alkylierung von Guanin zu O^6 -Chlorethylguanin wird dieses intramolekular zu N1- O^6 -Ethanoguanin umgelagert und bildet zusammen mit Cytosin einen *Interstrand crosslink* (ICL). Abb. modifiziert nach [56].

Das Isocyanatderivat reagiert unter Carbamoylierung mit zelleigenen Proteinen, verursacht jedoch keine nennenswerte Zytotoxizität [72]. Das 2-Chlorethyl diazohydroxid hingegen reagiert als Chlorethylcarboniumion nach Abspaltung von molekularem Stickstoff insbesondere mit Stickstoff- bzw. Sauerstoffatomen der N7-, respektive O⁶-Position des Guanins. Daraus entstehen N7-Chlorethylguanin und O⁶-Chlorethylguanin (O⁶-CIeTG) [73, 74]. Gemessen am Gesamtanteil der Alkylierungen ist die Läsion der N7-Position des Guanins mit etwa 95 % die primäre DNA-Läsion [75]. N7-Chlorethylguanin, sowie die entstehenden Quervernetzungen mit einem benachbarten Guanin, werden effizient durch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) repariert [76]. In 2 -5 % der Fälle entsteht O⁶-CIeTG [75], welches ebenfalls ein Substrat des Reparaturproteins MGMT ist, von diesem erkannt und die DNA-Läsion zuverlässig repariert wird [77].

Unrepariert ist erneut eine selten auftretende Basenmodifikation für die Hauptwirkung der Zytotoxizität der S_N1-chlorethylierenden Agenzien verantwortlich [78]: durch intramolekulare Umlagerung entsteht aus O⁶-CIeTG zunächst das stabile Intermediat N1-O⁶-Ethanoguanin. Nach 6-12 Stunden [72] bildet sich daraus durch eine erneute Umstrukturierung ein N1-Guanin-N3-Cytosin *Interstrand crosslink* (ICL) [79]. Bereits eine geringe Anzahl von etwa 40 ICLs im Genom reparaturdefizienter Zellen führt zum Zelltod [80].

1.2.3. Artesunat: DNA-Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies

Auch Naturstoffe sind in der Lage, DNA-Schäden hervorzurufen. Ein interessantes Beispiel ist Artesunat (ART), ein von Artemisinin (aus *Artemisia annua* extrahierter sekundärer Pflanzenstoff) abgeleiteter halbsynthetischer Arzneistoff. ART wird seit 1973 [81] primär zur Behandlung der durch *Plasmodium falciparum* verursachten Malaria eingesetzt [82] und zählt seit 2002 laut WHO zu den unentbehrlichen Arzneimitteln (*WHO Model List of Essential Medicines (19th List)*; April 2015). In den letzten zwei Jahrzehnten sorgte ART jedoch auch durch sein beeindruckendes antineoplastische Potenzial für Aufmerksamkeit. In den 1990er-Jahren berichteten Woerdenbag *et al.* erstmals von Anti-Krebs-Effekten des Artemisinins [83]. In *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten wurde gezeigt, dass Artemisinin und dessen Derivate das Wachstum verschiedener Tumorzellen inhibieren und diese töten. Untersuchungen von 60 verschiedenen Tumorzelllinien bestätigten den inhibierenden Effekt für Leukämie-, Kolorektalkarzinom-, Melanom-, Brustkrebs-, Ovarialkarzinom-, Prostatakarzinom- und Nierenkarzi-

nomzellen u.a. [84, 85]. Diese Ergebnisse ebneten ART den Einsatz als sog. *Repositioning*-Medikament. Als *Drug repositioning* (engl. für Medikamenten-Umpositionierung) oder *Drug repurposing* (engl. für Medikamenten-Umnutzung) bezeichnet man die Applikation von bekannten Arzneistoffen und Präparaten, für neue, ursprünglich nicht zur Behandlung vorhergesehene Erkrankungen. Doch aufgrund welcher Eigenschaft könnte ART in der Krebstherapie eine Anwendung finden?

Wie alle Artemisinin-Derivate verfügt auch ART über eine endogene Peroxidbrücke, die vor allem in Gegenwart von Eisen-Ionen über eine Fenton-Reaktion gespalten wird (Abb. 4) und so in *Plasmodium* zur Bildung von ROS, wie z.B. Hydroxyl- und Superoxidanion-Radikalen [86, 87] etc. führen und anschließend weitere Proteine oxidieren [87-89].

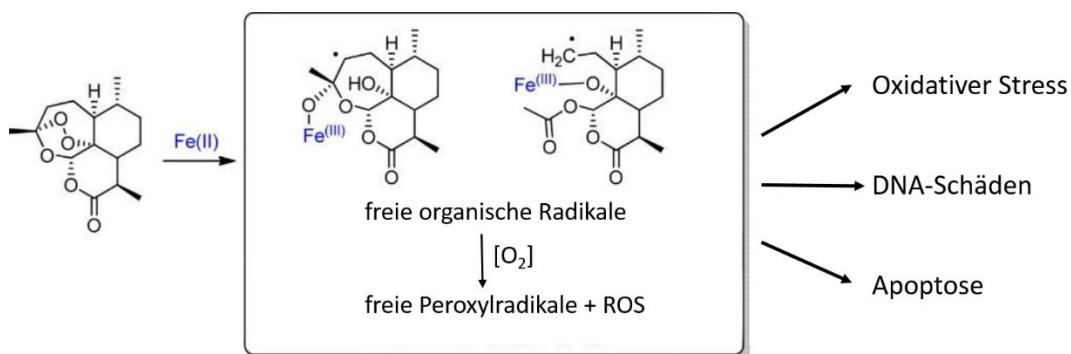


Abb. 4 Umsetzung des Artemisinins zum aktiven Dihydroartemisinin (DHA). Durch eine Eisen-vermittelte Reaktion wird die Endoperoxid-Brücke des Artemisinins gespalten (Fenton-Reaktion). Dabei entstehen freie Radikale, die biologische Makromoleküle schädigen und in Zellen oxidativen Stress verursachen. DNA-Schäden und Apoptose können folgen. Abb. modifiziert nach [90].

Wird Krebszellen exogenes Eisen, z.B. in Form von Transferrin oder Ferrosanol zugeführt, verstärkt dies ebenfalls die Effektivität von ART [91, 92]. Kürzlich konnte auch im Tumorzellsystem bestätigt werden, dass ART zur Induktion von ROS führt [93, 94]. Biologische Konsequenzen des oxidativen Stresses sind neben der Lipidper- und Proteinoxidation auch die Induktion oxidativer DNA-Schäden. Hierzu zählen vor allem Strangbrüche im Zucker-Phosphat-Rückgrat des einen oder beider DNA-Stränge, die Oxidation der Basen, apurine/apyrimidin Stellen (AP-Stellen), die durch die Hydrolyse der glykosidischen Bindung zwischen der Base und dem Zucker der DNA entstehen, sowie Inter- und Intrastrang-Quervernetzungen [95-97]. Die dominierende oxidative DNA-Läsion ist 8-Oxo-7,8-Dihydroguanin (8-OxoG), was auf das geringe Oxidationspotential des Guanins zurückzuführen ist [98]. Das hohe mutagene Potential entfaltet 8-OxoG durch die Fehlpaarung mit A-

denin im nächsten Replikationszyklus [99], die sich als G→T- und C→A-Substitution im Genom manifestiert [100]. 8-OxoG ist ein Substrat der Basenexzisionsreparatur (BER). Überlappende Reparaturintermediate können zu DSBs führen. Einzelstrangbrüche (engl. *single strand breaks*, SSB) und AP-Stellen hingegen induzieren DSBs während der S-Phase durch das Blockieren der Replikationsgabel.

1.3. DNA-Reparatur und DNA-Schadensantwort als Resistenzfaktor der Krebstherapie

Wie eingangs erwähnt, dient die DNA-Reparatur dem Erhalt der genomischen Stabilität. In der Krebstherapie bestimmen dieselben DNA-Reparaturmechanismen allerdings die Sensitivität gegenüber DNA-schädigender Agenzien und entscheiden so über das Therapieansprechen. Ferner können Modulationen der DNA-Schadensantwort und anderer Überlebens- und Zelltodmechanismen die Effizienz der applizierten Chemotherapeutika beeinflussen. Das Repertoire ist vielfältig und wird im Folgenden beschrieben.

1.3.1. DNA-Reparatur

DNA-Reparatursysteme erscheinen sehr komplex und unterliegen einer strikten Regulation. Mit einer Ausnahme (direkte DNA-Reparatur) erfolgt die Entfernung einer Läsion und die Wiederherstellung einer intakten DNA nach dem folgenden Fünf-Schritt-Prinzip: (1) Erkennung des Schadens, (2) Stabilisierung der geschädigten DNA/ Rekrutieren der Reparatur-Proteine, (3) Einschneiden und Entfernen der Läsion, (4) Wiedereinbau der fehlenden Nukleotide und (5) Ligation der DNA-Brüche. Jeder der aufgeführten Schritte wird von spezifischen Proteinen katalysiert, auch gibt es Zellzyklus-Phasen-spezifische Unterschiede zwischen den einzelnen Reparaturwegen [101, 102].

1.3.1.1. Direkte DNA-Reparatur

Sehr einfach werden durch einen einstufigen Reparaturprozess DNA-Schäden direkt entfernt. Es ist der einzige Reparaturweg, der weder ein Entfernen der geschädigten Base, noch ein Einschneiden in das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA benötigt [103, 104].

1.3.1.1.1. Oxidative Dealkylierung

ALKBH2 und ALKBH3 gehören zur Familie der Eisen(II)/ α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen und sind für die Reparatur von *N*₁-Methyladenin und *N*₃-Methylcytosin verantwortlich. Dies erfolgt über eine Hydroxylierung der Methylgruppe und einer anschließenden spontanen Deformylierung [56, 105]. Beide Läsionen werden durch *S*_N1- sowie *S*_N2-alkylierende Agenzien verursacht und bilden mit einem Anteil von 0,6-1,3 % zwar eine Minderheit unter den induzierten DNA-Läsionen, sind allerdings potenziell toxisch [62].

1.3.1.1.2. Alkyltransferasen

Die ursprünglich in *Escherichia coli* entdeckte *O*⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) entfernt Alkylgruppen in der *O*⁶-Position des Guanins und der *O*⁴-Position des Thymins [106]. In einem einstufigen Reparaturprozess wird die Alkylgruppe auf einen Cystein-Rest im aktiven Zentrum des Enzyms übertragen [56]. Die Transferrate korreliert dabei mit der Größe der Alkylgruppe, so dass z. B. die Methylgruppe eines *O*⁶-MeG schneller entfernt wird als Ethyl- und Propylgruppen [107]. Die Bindung der Alkylgruppe inaktiviert das Reparaturprotein, was nach einer Konformationsänderung und Ubiquitinierung zum proteosomalen Abbau des Enzyms führt [62, 108, 109]. Somit ist nicht nur die Ausgangsmenge an MGMT im zu behandelnden Gewebe therapiebestimmend, sondern auch die Rate der MGMT-Neusynthese. Die MGMT-Aktivität ist sehr heterogen. Sie differiert nicht nur interindividuell [110, 111], was sich z. B. durch den unterschiedlichen *MGMT*-Status der Patienten zeigt, sondern weist auch gewebsspezifische Unterschiede auf. Hierbei wurde die Leber als das Gewebe mit der höchsten MGMT-Aktivität identifiziert, während Gehirn und Lunge im Vergleich eine geringere MGMT-Expression aufweisen [112, 113]. In Bezug auf Gliome gibt es sogar in 17 bis 30 % der Fälle Tumore, die kein MGMT exprimieren [114, 115], was die Be-

handlung mit Alkylanzien erleichtert. Ferner sind auch beachtliche Variationen des MGMT-Niveaus intratumoral beobachtet worden [116].

1.3.1.2. Basenexzisionsreparatur

Die Basenexzisionsreparatur (BER, Abb. 5) korrigiert primär kleinere Basenmodifikationen, die z. B. durch Oxidation, Alkylierung, Deaminierung und ionisierende Strahlung (engl. *ionizing radiation*, IR) entstehen [117]. Ferner werden auch apurine Stellen, die durch spontane Hydrolyse generiert werden, oder auch die TMZ-induzierten *N*-Alkylierungen der Purine durch die BER eliminiert. Charakteristisch und gleichzeitig initial für diesen Reparaturweg sind DNA-Schaden-erkennenden Glykosylasen. Diese hydrolysieren die *N*-glykosidische Bindung der geschädigten Base und hinterlassen eine apurine/apyrimidine Stelle (AP-Stelle) [118]. Neben ihrer Substratspezifität [119] werden DNA-Glykosylasen auch in Bezug auf ihre enzymatische Aktivität unterschieden: monofunktionale Glykosylasen wie die Uracil-entfernenden Uracil-DNA-Glykosylasen (UDG) oder die *N*3-MeA- und *N*7-MeG-ausschneidende *N*-Methylpurin-DNA-Glykosylase (MPG) besitzen Glykosylaseaktivität und katalysieren ausschließlich *N*-glykosidische Bindungen. Bifunktionale Glykosylasen wie die 8-OxoG-entfernende 8-Oxoguanin-Glykosylase (OGG1) oder andere Vertreter der *Nei-like protein* (NEIL)-Familie sind zusätzlich noch mit einer AP-Lyaseaktivität ausgestattet, die die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung erlaubt.

Erfolgt die Hydrolyse der *N*-glykosidischen Bindung durch eine monofunktionelle Glykosylase, spaltet anschließend eine AP-Endonuklease z. B. die apurine Endonuklease-1 (APE1), die Phosphodiesterbindung. Es entsteht ein SSB in 5'-Richtung der AP-Stelle [120, 121]. Bifunktionelle Glykosylasen generieren SSB in 3'-Richtung zur geschädigten Base [122]. Die anschließende Reparatur des SSB kann in Abhängigkeit von der Anzahl der eingefügten Nukleotide über eine sog. *short* oder *long patch*-BER erfolgen. Die DNA-Polymerase- β (Pol β) entfernt den 5'-dRP-Teil und synthetisiert ein oder zwei Nukleotide, die die DNA-Ligase III (LIG3) mit dem DNA-Strang verbindet und so die *short patch*-Reparatur abschließt. Erfolgt die Reparatur des SSB über den *long patch*-Mechanismus, kommt es nach dem Abspalten der Pol β zu einer zusätzlichen DNA-Synthese durch die Polymerasen δ oder ϵ (Pol δ und Pol ϵ) [123]. Der Prozess wird dabei durch Faktoren wie *Proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) und den 911-Komplex (RAD9, RAD1, HUS1) unterstützt. Abschließend entfernt die *Flap endonuclease*

1 (FEN1) die überhängenden 5´dRP-Teil, die DNA-Ligase 1 (LIG1) schließt die Phosphodies-terbindung [119, 124, 125].

Ist ein SSB mit einer Topoisomerase (TOPO1) assoziiert, erfolgt das Lösen der TOPO1 durch die Tyrosyl-DNA-Phosphodieseterase 1 (TDP1), die Polynukleotid-Kinase-Phosphatase (PNKP), eine 3´-DNA-Phosphatase und 5´-DNA-Kinase, modifiziert und orientiert die Stran-genden.

Weitere wichtige Faktoren der BER sind das *X-ray repair cross-complementing protein 1* (XRCC1) und die Poly-ADP-Ribose-Polymerase-1 (PARP1). Das auch als Gerüstprotein be-zeichnete XRCC1 besitzt selbst keine Enzymaktivität, interagiert jedoch mit APE1 [126], Polβ und LIG3 [119]. PARP1 wirkt als Modulator der BER. Durch die Bindung an den SSB wird PARP aktiviert, gleichzeitig schützt dieses Protein die DNA vor Degradation, sofern die BER-Kapazität vorübergehend erschöpft ist [127].

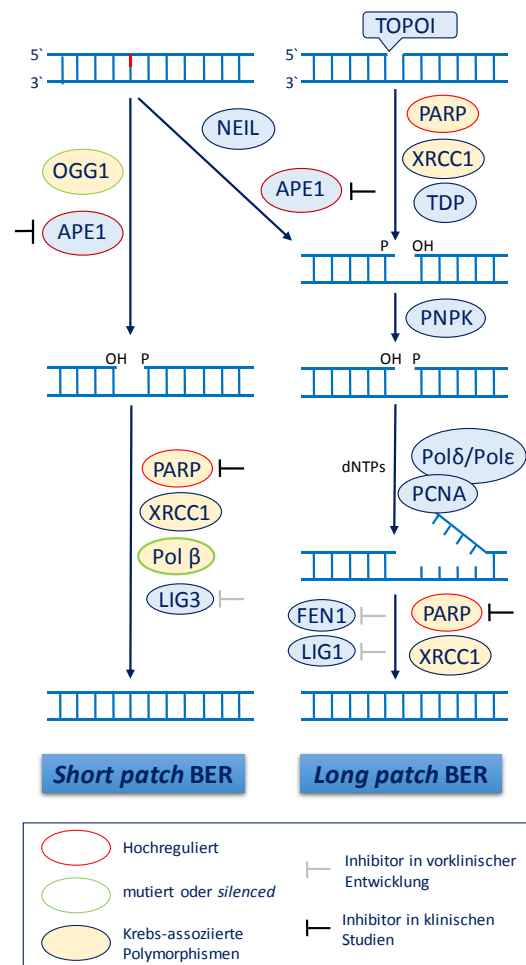


Abb. 5 Basenexzisionsreparatur (BER). Schematische Darstellung der *short* und *long patch* BER. Die genauen Mechanismen sind im Text beschrieben. Für Krebserkrankungen bekannte Dysregulationen der beteiligten Proteine sind farblich gekennzeichnet, ebenso der klinische Status verfügbarer Inhibitoren. Abb. modifiziert nach [18].

1.3.1.3. Basenfehlpaarungs-Reparatur

Die Basenfehlpaarungs-Reparatur (*Mismatch*-Reparatur, MMR) korrigiert Basenfehlpaarungen sowie kleinere Insertions- bzw. Deletionsschleifen (Abb. 6 A). Diese Fehlbindungen können während der DNA-Replikation entstehen oder sind die Konsequenz endogener ROS oder exogen alkylierender Agenzien [128-130]. Verbleiben solche Fehlpaarungen in der DNA, manifestieren sich diese nach der S-Phase und können zu Rastermutationen sowie Mikrosatelliteninstabilitäten führen [131, 132]. Zur Erkennung stehen der MMR zwei Komplexe (MSH2/MSH6; MSH2/MSH3) zur Verfügung. Der MSH2/MSH6-Komplex, auch bekannt als MutS α -Heterodimer, registriert die Substitution einzelner Basen und sehr kleine Insertions/Deletionsschleifen, während der MSH2/MSH3 (auch MutS β -Komplex) jegliche Insertions/Deletionsschleifen größer als vier Nukleotide erkennt [128, 133, 134].

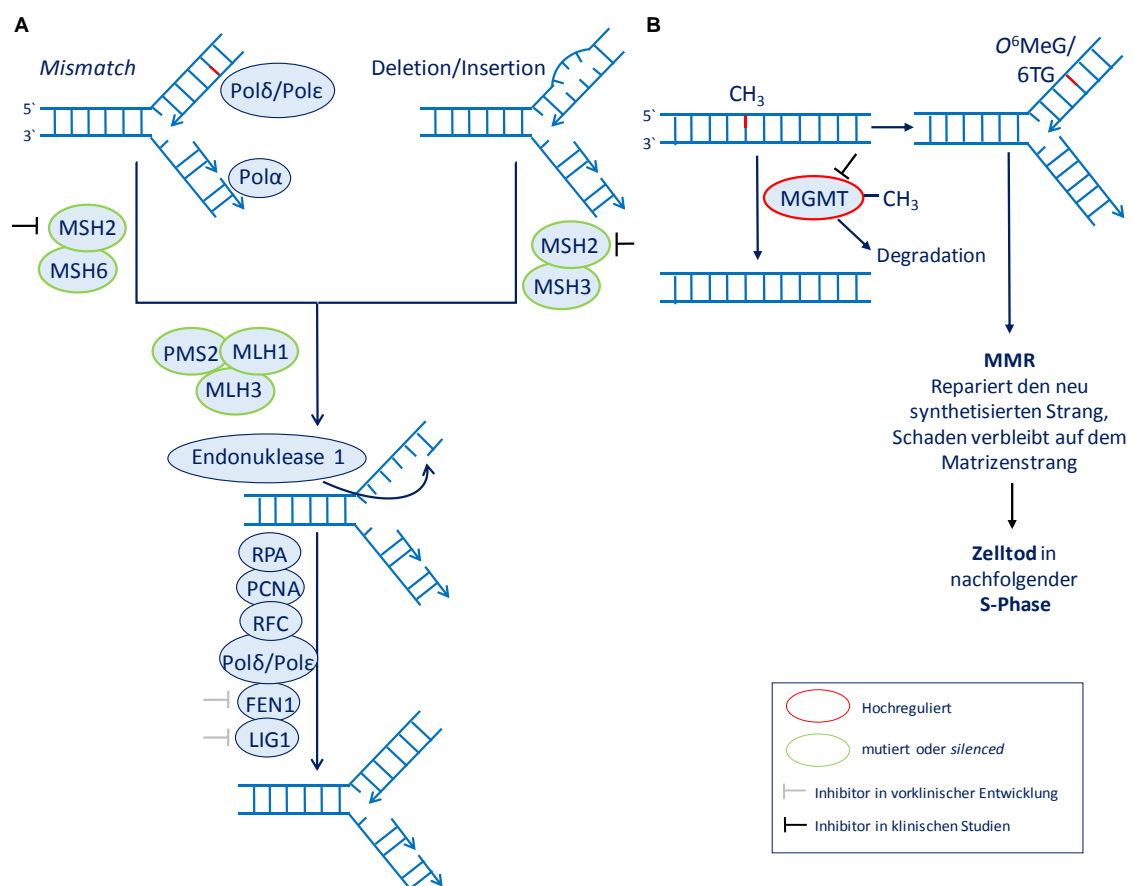


Abb. 6 Mismatch-Reparatur (MMR). Schematische Darstellung der MMR (A) und der direkten Reparatur durch MGMT (B). Die genauen Mechanismen sind im Text beschrieben. Für Krebserkrankungen bekannte Dysregulationen der beteiligten Proteine sind farblich gekennzeichnet, ebenso der klinische Status verfügbarer Inhibitoren. Abb. modifiziert nach [18].

Nach der Erkennung wird ein weiterer Komplex zum DNA-Schaden rekrutiert. Der MutL α -Komplex setzt sich aus MLH1/MLH3 und PMS1 bzw. PMS2 zusammen. Beide Komplexe besitzen ATPase-Aktivität und formen eine ringartige Reparatur-Struktur, die sich entlang der DNA bewegt. Die Diskriminierung der DNA-Stränge und damit der Abbau des Tochterstrangs erfolgt im Folgestrang durch die SSBs der Okazaki-Fragmente. Für den Leitstrang ist das entsprechende Signal zur Strang-Diskriminierung noch unbekannt. In der Zwischenzeit fungiert *replication protein A* (RPA) als Stabilisator und flankiert den DNA-Schaden, an den auch die akzessorischen Proteine PCNA und der Replikationsfaktor C (RFC) bindet. Trifft der wandernde Komplex auf eine solche Struktur, wird die EXO1 rekrutiert.

Diese Nuklease besitzt 5' \rightarrow 3'-Endonuklease-Aktivität und entfernt bis zu mehrere hundert Basen des Tochterstranges. Eine 3' \rightarrow 5'-Exzision benötigt PNCA und RCF, die die Endonuklease-Aktivität von MLH1 und einen 5'-Einschnitt in die DNA bedingen. Abschließend erfolgt die Neusynthese und Ligation des Tochterstrangs durch die Polymerasen δ/ϵ (Pol δ/ϵ) [135] und LIG1 [136-138].

Die MMR ist strangspezifisch und beseitigt Schäden im Tochterstrang. Ist eine Läsion im Matrizenstrang für die Fehlpaarung im Tochterstrang verantwortlich, korrigiert die MMR lediglich den *Mismatch*, während die Fehlpaarungs-induzierende Läsion im Strang verbleibt (Abb. 6 B). Ein Beispiel hierfür ist die durch TMZ-induzierte O^6 MeG-Läsion. Die entscheidende Funktion, die die MMR in der Prozessierung dieser Läsion einnimmt, wurde bereits in Kapitel 1.2.1 beschrieben.

1.3.1.4. Doppelstrangbruch-Reparatur

DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) sind die schwerwiegendsten und toxischsten DNA-Schäden überhaupt, da sie u. a. Genommutationen, chromosomale Aberrationen und Zelltod verursachen [139-141]. In gesunden Zellen können transiente DSBs z. B. durch das Entwinden der DNA entstehen, das von der Topoisomerase II katalysiert wird. Spontane DSBs sind im Gegensatz dazu selten (ca. 10/ Tag) [142]. Die Mehrheit aller DSBs ist auf andere Faktoren zurückzuführen. DSBs entstehen bspw. an der Replikationsgabel, wenn die Polymerase an einer nicht-reparierten Läsion blockiert oder einzelnen Läsionen beider DNA-Stränge überlappen [143, 144]. Die DSB-Induktion durch Chemotherapeutika wurde bereits in Kapitel 1.2 beschrieben. Insgesamt steht die DSB-Reparatur (DSBR) vor vielen Herausforderungen wie

dem Verlust des Informationsgehalts der Nukleinsäuren, der physikalischen Integrität beider DNA-Stränge und dem Zusammenführen diverser Bruchstücke-Enden [145]. In humanen Zellen wird die DSBR über zwei Hauptmechanismen vermittelt: die Nicht-homologen Endverknüpfung (engl. *non-homologous end joining*, NHEJ) und die homologe Rekombination-Reparatur (HRR). Welcher der Reparaturwege den Schaden prozessiert, wird hauptsächlich Zellzyklus-spezifisch entschieden.

Die NHEJ operiert in jeder der Zellzyklus-Phasen, ist allerdings in der G₀- und G₁-Phase am aktivsten. Die HRR wird während der S- und G₂-Phase initialisiert. Im Vergleich zur HRR repariert die NHEJ schneller, wird frequenter eingesetzt und ist - aufgrund eines eher einfach gehaltenen Zusammensetzens der Bruchstücke – fehleranfälliger. Die länger andauernde HRR garantiert durch eine sehr sorgfältige, Vorlagen-basierte Reparatur eine ursprungsgetreue Wiederherstellung der DNA [18, 133, 143, 144, 146]. Beiden Reparaturwegen gemeinsam ist der sog. MRN-Komplex, der sich aus MRE11, RAD51 und NBS1 zusammensetzt. Als Schadens-Sensor entscheidet MRN über die Prozessierung des Schadens mittels NHEJ oder HRR, wobei der genaue Mechanismus noch ungeklärt ist [147]. Ferner sind auch bei der ICL-Reparatur, neben der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) und der Transläsionssynthese, Prozesse der DSBR involviert. Eine vereinfachte Übersicht der Prozesse ist in Abb. 7 dargestellt, Einzelheiten werden in den folgenden Kapiteln diskutiert.

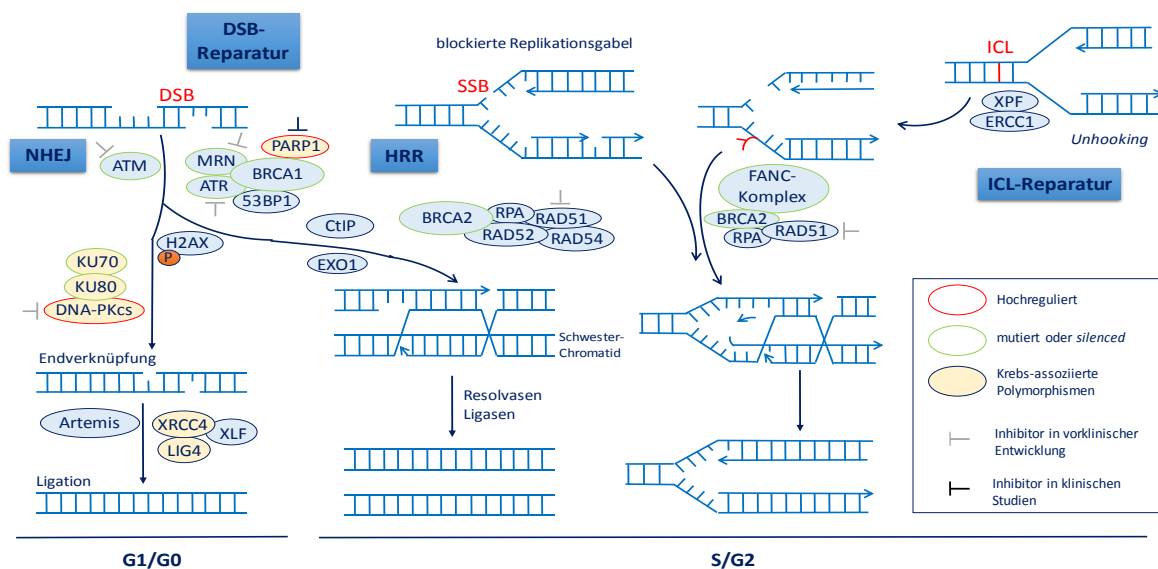


Abb. 7 DSB- und ICL-Reparatur. Vereinfachte schematische Darstellung der Reparaturprozesse. Für Krebserkrankungen bekannte Dysregulationen der beteiligten Proteine sind farblich gekennzeichnet, ebenso der klinische Status verfügbarer Inhibitoren. Abb. modifiziert nach [18].

1.3.1.4.1. Nicht-homologe Endverknüpfung

Die NHEJ verbindet DSBs durch einen minimalen Verknüpfungsprozess und benötigt zur Ligation beider Enden keine Sequenzhomologien [148]. Durch die Bindung des KU70/KU80-Heterodimers wird die geschädigte DNA vor dem Verdau durch Exonukleasen geschützt [149, 150] und beide Strang-Enden auch räumlich in unmittelbarer Nachbarschaft gehalten [151, 152]. Als Schadens-Sensor rekrutiert das KU-Heterodimer die DNA-abhängige Proteinkinase DNA-PK_{cs} (engl. *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*) und vermittelt dem Komplex, der sich aus KU70, KU80 und DNA-PK_{cs} zusammensetzt, Kinaseaktivität, die in Autophosphorylierung und der Phosphorylierung anderer NHEJ-Faktoren resultiert [153]. Da die Strang-Enden häufig modifizierte Nukleotide tragen, müssen diese vor der Re-Ligation „prozessiert“ werden. Die Lyaseaktivität des KU70-Proteins entfernt Modifikationen am 5'-Ende und an AP-Stellen, was zur Generierung von 5'-Phosphat-Enden führt [154]. Ferner prozessiert die auch an der BER beteiligte 3'-DNA-Phosphatase und 5'-DNA-Kinase PNKP die Orientierung der Strang-Enden, während die Endonuklease FEN1 5'-Überhänge entfernt [155]. Weitere Überhänge oder Haarnadelstrukturen werden durch die 5'-3'-Exonuklease Artemis prozessiert [156]. Neben der Generierung glatter Strang-Enden bietet auch das Auffüllen der Überhänge eine Möglichkeit der End-Prozessierung. Katalysiert wird der Einbau neuer Nukleotide von Pol λ und Pol μ . Die Ligation der prozessierten Strang-Enden übernimmt der XRCC4-LIG4-XLF-Komplex und vermittelt final das Schließen des DSB [145, 157, 158].

Der Prozess der alternativen Endverknüpfung (engl. *alternative end joining*, alt-EJ) bietet eine KU70/KU80 und LIG4-unabhängige Möglichkeit der DSBR. Hierbei wird der DSB durch PARP1 erkannt, welches XRCC1 und LIG3 rekrutiert. Die End-Prozessierung wird durch den MRN-Komplex und CtIP (s. a. Kap. 1.3.1.4.2) oder Polymerase Pol β katalysiert [159].

1.3.1.4.2. Homologe Rekombinatio(re)paratur

Die DSB-Reparatur mittels HRR ist auf die Präsenz homologer Sequenzen, nämlich die des Schwesterchromatids, angewiesen und kann grundsätzlich in folgende Phasen unterteilt werden: 1) Prozessierung zu 3'-Einzelsträngen, 2) Ausbildung der RAD51-Filamente, 3) Stranginvasion und Ausbildung von Holliday-Strukturen (engl. *holliday junctions*, HJ) und 4) Auflösen der HJ.

Wie eingangs beschrieben dient der MRN-Komplex als Schadenssensor und initiiert die HRR. Hierbei bindet der MRN-Komplex an die DNA, was sowohl die 3'-5'-Exonuklease- als auch die ssDNA-Endonuklease-Aktivität des MRE11-Proteins auslöst. Durch Interaktion des MRN mit der Endonuklease CtIP, die primär an 5'-Strukturen agiert [160, 161], kommt es nach der bidirektionalen Resektion zu 3'-Überhängen, die ferner durch die 5'-3'-Exonuklease EXO1 erweitert werden können [162].

RPA erkennt und schützt diese einzelsträngigen Überhänge, verhindert jedoch ein Binden des HRR-Schlüsselproteins RAD51. Die Ausbildung der RAD51-Filamente ist ein wichtiger Prozess dieses Reparaturweges. Neben den RAD51-Paralogen (XRCC3, XRCC2, RAD51D, RAD51C, RAD51B) vermittelt vor allem BRCA2 den korrekten Austausch von RPA und RAD51 an den 3'-Überhängen und fördert damit die Ausbildung der RAD51-Filamente [163, 164]. Zusätzlich interagiert BRCA2 mit BRCA1 und PALB2, die für die den korrekten Ablauf der HRR unersetzbar sind. Diese 3'-RAD51-Nukleofilamente koordinieren die Suche nach dem homologen Bereich des Schwesterchromatids. Ist eine komplementäre Sequenz vorhanden, ersetzt der RAD51-Einzelstrang den DNA-Strang des Schwesterchromatids und bedingt dadurch die Ausbildung eines sog. D-Loops (engl. *displacement-loop*). Aufgrund dieser strukturellen Besonderheit erfolgt die DNA-Synthese in 3'-5-Richtung. Das 3'-Ende des invasiven Strangs dient somit als Primer für die Synthese durch Pol δ , der intakte DNA-Strang des Schwesterchromatids als Matrize [165, 166]. Nach erfolgter Synthese können die entstandenen Strukturen über zwei Wege gelöst werden. Erfolgte die Strangverlängerung syntheseabhängig (engl. *synthesis-dependent strand annealing*, SDSA), dissoziiert das neu synthetisierte 3'-Ende vom D-Loop und bindet an die gegenüberliegende ssDNA des DSB. Alternativ kann durch die Neusynthese des DNA-Strangs und der Migration des D-Loops eine weitere HJ entstehen. Abhängig vom Auflösungsprozess der HJ werden chromosomale Rekombinationen (*crossover*) in das Genom integriert. Der Helikase-Komplex BLM (engl. *Bloom syndrome pro-*

tein) und die DNA-Topoisomerase 3 (TOPO3) verhindern das Entstehen von chromosomalen Rekombinationsprodukten. Eine alternative Prozessierung wird über die Endonukleasen GEN1 (engl. *flap endonuclease GEN homolog 1*) und/oder SLX1 und SLX4 (engl. *structure-specific endonuclease subunit 1/ structure-specific endonuclease subunit 4*) vermittelt. Hierbei bestimmt der Einschnitt in die HJ die Integration einer chromosomalen Rekombination [144, 167-169].

1.3.1.4.3. *Interstrand crosslink-Reparatur und Transläsionssynthese*

Kovalente Verbindungen der beiden DNA-Stränge einer DNA-Doppelhelix können durch verschiedene in der Krebstherapie eingesetzte Medikamente induziert werden. Ein Beispiel hierfür ist das bereits beschriebene CCNU. Die Reparatur eines ICL ist sehr komplex und bis heute nicht vollständig geklärt [170]. Bekannt ist jedoch, dass die ICL-Reparatur viele Komponenten anderer DNA-Reparaturmechanismen involviert, Zellzyklus-unabhängig stattfindet und Proteine der *Fanconi Anaemia* (FA)-Familie zur Reparatur dieser Schäden essenziell sind. Die Reparatur von ICL in der G1-Phase ist meist unzureichend. Läsionen, die eine Deformation der Helixstruktur hervorrufen, werden nur teilweise und durch die NER-Endonukleasen ERCC1 und XPF sowie den TLS-Polymerasen prozessiert. Diese prozessierten Läsionen sowie das Auftreffen der Replikationsgabel am ICL führen in der S-Phase zur Entstehung von DSBs. Die Helikase FANCM entwindet die Doppelhelix im Bereich des ICL, was ein Zusammenbrechen der Replikationsgabel durch ihr Fortschreiten verhindert und gleichzeitig in der Ausbildung einer sog. *Chicken foot*-Struktur resultiert [171]. Die Stabilisierung der Replikationsgabel wird über die Rekrutierung des FA-Kernkomplexes (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG und FANCL) und weitere HRR-Proteine erreicht. Durch Monoubiquitinierung der DNA-assoziierten Faktoren FANCD2 und FANCCI erfolgt die Rekrutierung der Nukleasen und Polymerasen an den FA-Komplex. Die Nuklease FAN1 (engl. *FANCD2/FANCI-associated nuclease 1*) sowie die heterodimere Nuklease-Komplexe SLX4-SLX1, MUS81-EME1 und XPF-ERCC1 vermitteln ein 5'- und 3'-Einschnitt und das *Unhooking* des ICL. Dies erlaubt einen HRR-vermittelten Re-Start der Replikationsgabel. Die Re-Synthese des DNA-Strangs wird durch die TLS-Polymerasen Pol κ (alias REV1) sowie Pol ν und Pol ζ katalysiert. Die vom Strang gelöste Läsion wird anschließend enzymatisch durch die NER oder aufgrund spontaner Hydrolyse entfernt [172-174].

Die bereits erwähnten TLS-Polymerasen katalysieren die sog. Transläsionssynthese. Dieser Prozess bedingt zwar keine Reparatur, erlaubt aber aufgrund der fehlenden Korrekturlese- und Exonukleasefunktion der Polymerasen das Überlesen einer Läsion während der DNA-Synthese. Ein Blockieren der Replikationsgabel wird verhindert. Die TLS-Polymerasen Pol η , Pol κ , Pol ν und Pol ζ partizipieren an der Überbrückung der O^6 -MeG-Läsion sowie der ICL-Reparatur [28, 175, 176].

1.3.2. DNA-Schadensantwort und Zelltod

1.3.2.1. DNA-Schadensantwort

Zur Wahrung der genomische Stabilität wurden Zellen mit einem System der DNA-Schadensantwort (engl. *DNA damage response*, DDR) und DNA-Reparaturproteinen ausgestattet [177]. Kommt es zu einem DNA-Schaden, reguliert die komplexe Signalkaskade der DDR die zelluläre Antwort, was das Rekrutieren von Reparaturproteinen, das Arretieren des Zellzyklus und die Aktivierung von Zelltod- oder weiteren Differenzierungsmechanismen beinhaltet [178]. Die apikalen oder auch transduzierenden DNA-Schadens-aktivierten Kinasen ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*Ataxia telangiectasia and RAD3-related*) repräsentieren initial die zwei Kinase-Signalkaskaden, den ATM-CHK2- und ATR-CHK1-Signalweg [179].

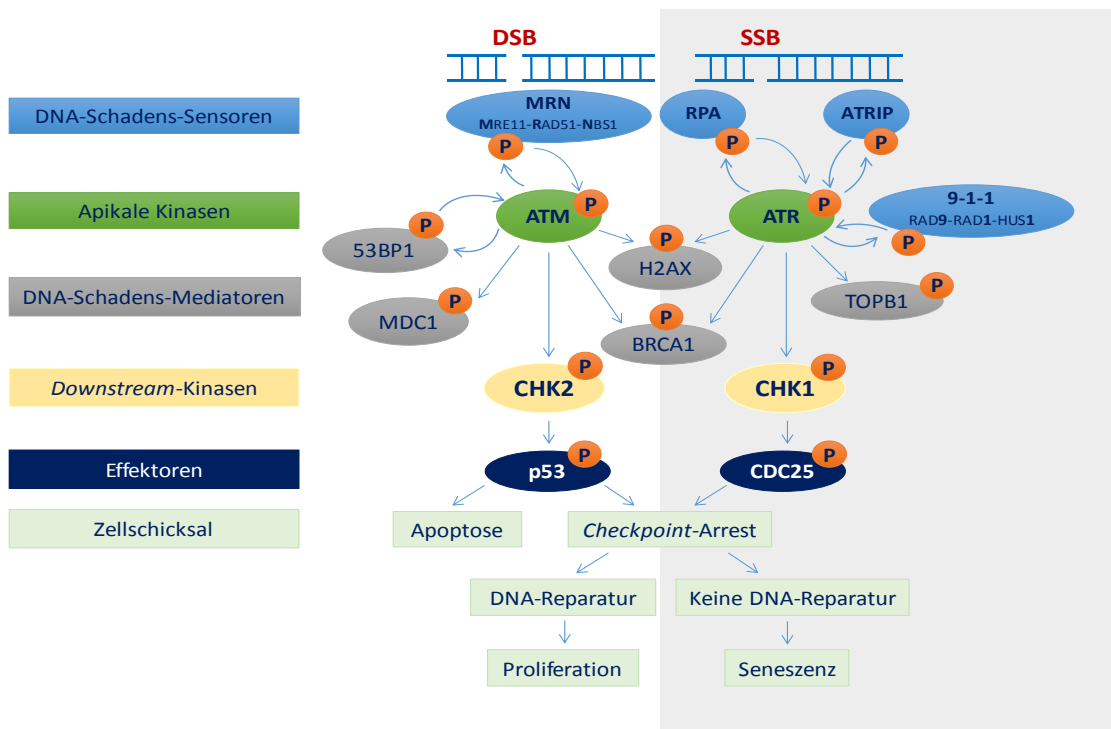


Abb. 8 Vereinfachte Übersicht der DDR. Die Sensoren der DDR reagieren auf DSBs (MRN) und Bereiche einzelsträngiger DNA (RPA und 9-1-1). Diese rekrutieren die apikalen Kinasen ATM bzw. ATR, die wiederum – neben der Aktivierung (P=Phosphorylierung) diverser Mediatoren – die *downstream*-Kinasen CHK2 bzw. CHK1 aktivieren. Über die Aktivierung derer Effektoren wird das Zellschicksal bestimmt. Abb. modifiziert nach [180].

ATM wird durch DSBs aktiviert [181, 182], während die Autophosphorylierung von ATR durch die Interaktion mit ATRIP (engl. *ATR interacting protein*) und der Bindung RPA-assoziiierter ssDNA erfolgt [183, 184]. Beide Kinasen phosphorylieren anschließend das Histon H2AX an Serin 139 (γ H2AX), welches den DNA-Reparatur-Proteinen die Schadensseite signalisiert und die Chromatin-Organisation reguliert. Ferner aktivieren ATM und ATR die Zellzykluskontrollpunkt-Kinasen CHK1 und CHK2, was den Zellzyklus an diversen *Checkpoints* arretiert (G1-S, G2-M). Dies erfolgt durch Inaktivierung von CDC25 (*cell division cycle phosphatase 25*) oder Phosphorylierung von p53 und anschließender Induktion von p21^{CIP1/WAF1}. Abhängig vom Ausmaß des Schadens führt eine CHK-Aktivierung auch zum Zelltod durch Apoptose oder einer Induktion der Seneszenz [185].

1.3.2.2. Apoptose

Die Apoptose ist ein streng regulierter Zelltodprozess, der morphologisch durch zyttoplasmatische und nukleäre Kondensation, DNA-Fragmentierung und der Ausbildung sog. apoptotischer Körper charakterisiert ist. Das Verpacken einzelner Zellfragmente in membranassoziierten Vesikel (apoptotische Körper) und die anschließende Phagozytose durch Makrophagen bedingen die Zellelimination ohne ein Auslösen von Entzündungsreaktionen [186]. Die zentralen Regulatoren der Apoptose sind die sog. Caspasen (engl. *cysteiny-l-aspartate specific protease*), eine Familie von Cysteinproteasen, die die Peptidbindung der Zielproteine C-terminal der Asparaginsäure spalten. Sie können in zwei Hauptklassen unterteilt werden. Dabei aktivieren die Initiator-Caspasen *downstream* sog. Effektor-Caspasen, die wiederum die enzymatische Spaltung zelleigener Proteine und die Aktivierung der Nuklease CAD (engl. *caspase activated DNase*) verantworten [187]. Generell wird der programmierte Zelltod in einen extrinsischen und intrinsischen Weg unterteilt.

Die Aktivierung des extrinsischen Apoptosewegs erfolgt durch Bindung extrazelluläre Liganden an den Fas-Rezeptor. Dies führt intrazellulär zu einer Trimerisierung und Rekrutierung des zyttoplasmatischen Adapter-Proteins FADD (engl. *Fas-associated protein with death domain*). Dieser DISC (engl. *death-inducing signaling complex*) rekrutiert die Initiator-Caspasen Pro-Caspase-8 und -10, die trans-autolytisch in ihre aktive Form gespalten

werden. Caspase-8 und -10 aktivieren die Effektoren Pro-Caspasen-3 und -7, was in der CAD-vermittelten apoptosespezifischen Fragmentierung der DNA resultiert.

Der intrinsische Weg wird über die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ausgelöst. Die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran wird durch die pro-apoptotischen Proteinen BAX und BAK sowie den anti-apoptotischen Proteinen BCL-2 und BCL-XL reguliert. Cytochrom C interagiert mit Pro-Caspase-9 und APAF-1 (engl. *apoptotic protease activating factor 1*), was zur Bildung des Apoptosoms und die Aktivierung der Effektor-Caspasen führt.

1.3.2.3. Nekrose und Nekroptose

Neben der streng regulierten Apoptose stehen der Zelle noch weitere, nicht- oder weniger programmierte Zelltodwege zur Verfügung. Die Nekrose ist ein Caspase-unabhängiger Vorgang, der mit einem zytoplasmatisches Anschwellen und einem Zerreißen der Zellmembran einhergeht. Durch das Entlassen des Zellinhaltes kommt es zu lokalen Entzündungsreaktionen. Vergleichbares ist auch bei Nekroptosen zu beobachten. Im Gegensatz zur Nekrose ist die Permeabilisierung der Zellmembran stark reguliert. Nekroptosen werden durch Cytokine der *tumor necrosis factor* (TNF)-Familie induziert und durch *receptor-interacting serine/threonine-protein* (RIP)-Kinasen (RIPK) vermittelt. In Abwesenheit von Caspase-8 führt die Aktivierung von RIPK1 und RIPK3 zur Ausbildung des sog. Nekrosoms, das *mixed lineage kinase domain-like* (MLKL) rekrutiert und dadurch die Permeabilisierung initiiert [188].

1.3.2.4. Ferroptose und ER-Stress

Ferroptose ist eine Form des programmierten Zelltods [189]. Dieser ist Eisen-abhängig und besonders gekennzeichnet durch die Akkumulation von Lipid-ROS und dem Abbau mehrfach ungesättigter Fettsäuren der Plasmamembran. Ferroptose kann durch kleine Moleküle (z. B. Erastin), Gluthathionsynthese-Hemmstoffen oder Inhibitoren der GPX4 (engl. *glutathione-dependent antioxidant enzyme glutathione peroxidase 4*) induziert werden. Lipophile Antioxidantien und Eisen-Chelatoren verhindern dies. Krebszellen mit erhöhter RAS-RAF-MEK-Aktivität und gesteigerter p53-Expression können gegenüber

Ferroptose sensitiviert werden [190, 191]. Ferrostatin-1 wurde als potenter Inhibitor der Ferroptose in Krebszellen identifiziert [189].

Eine weitere, stark konservierte Form der zellulären Stressantwort wird über das Endoplasmatische Retikulum (ER) vermittelt. Das ER ist als intrazelluläres Organell zentral für viele sekretorische Prozesse verantwortlich. Es bedingt vor allem Proteintranslokationen, Proteinfaltungen oder posttranslationale Modifikationen, die den Weitertransport zum Golgi-Apparat und final die Sekretion diverser Vesikel erlaubt. Kommt es durch Stressmediatoren zu einer Ansammlung von Proteinen mit fehlerhafter Faltung, reagiert das ER mit einer ungefalteten Proteinantwort (UPR, engl. *unfolded protein response*). Durch die Suppression von Translationsprozessen, den Abbau falsch gefalteter Proteine und einer verstärkten Synthese der für die korrekte Faltung der Proteine benötigten Chaperone, erzielt die UPR eine Wiederherstellung der normalen Zellfunktion. Bleibt die Stresssituation bestehen, führt die UPR durch Aktivierung der Apoptose zum Zelltod. Eine zentrale Rolle in der Regulation der UPR spielen die Proteinkinasen IRE1 (engl. *inositol-requiring enzyme 1*) und PERK (engl. *protein kinase RNA-like endoplasmatic reticulum kinase*) sowie der Transkriptionsfaktor ATF6 (engl. *activating transcription factor 6*). Ferner phosphoryliert PERK Serin51 des EIF2 α (engl. *eukaryotic initiation factor 2*), was die Formierung des ribosomalen Initiationskomplexes und dadurch auch die globale Translation der mRNA verhindert [192]. Salubrinal ist ein zellpermeabler und selektiver Hemmstoff des Phosphatasekomplexes, der die Dephosphorylierung des EIF2 α und damit auch die ER-Stress-induzierte Apoptose verhindert [193].

1.3.2.5. Autophagie

Die Autophagie ist ein regulierter, kataboler Recyclingprozess, der zelleigene Komponenten lysosomal degradiert. Initiiert wird dieses Zellschicksal durch den Einschluss zytosolischer Bestandteile in das sog. Autophagosom. Diese doppelmembranöse Vesikel fusionieren anschließend mit Lysosomen, deren Enzyme die eingeschlossenen Zellkomponenten verdauen [194]. Neben z. B. Nährstoffmangel [195] wird die Autophagie durch oxidativen Stress [196, 197] oder DNA-Schäden stimuliert [198-200], was eigentlich einen protektiven Effekt auf das Zellschicksal vermuten lässt. Die pharmakologische Inhibition der Autophagie während der Stressphase einer Zelle beschleunigt allerdings die Indukti-

on des Zelltods [201]. Es bleibt somit unklar, ob die Autophagie einen Zelltodmechanismus darstellt, Zelltodprozesse lediglich begleitet oder unter Stressbedingungen als protektiver Überlebensmechanismus agiert [202]. Im Kontext der Glioblastomtherapie konnte gezeigt werden, dass TMZ autophagie Prozesse induziert, die Hemmung der Autophagie jedoch auch die Induktion der Apoptose deutlich steigert [203-205]. Für ART wurde bisher lediglich in anderen Tumorzellen (u.a. Brustkrebszellen) eine Verbindung zur Autophagie hergestellt, wobei der zugrundeliegende Mechanismus ungeklärt bleibt [206, 207].

1.3.2.6. Seneszenz

Die Seneszenz beschreibt einen permanenten Zellzyklusarrest, den Zellen z. B. durch replikationsabhängige Verkürzung der Telomere, DNA-Schädigungen oder auch Onkogenaktivierung erfahren. Seneszente Zellen sind metabolisch aktiv, proliferierenden jedoch nicht. Charakteristisch ist eine konsistente Hochregulation der CDK-Inhibitoren p21^{Cip1/Waf1} oder p16^{INK4a}, die Expression der Seneszenz-assoziierten (SA)- β -Galaktosidase (SA- β -Gal) und die Ausbildung SA-Heterochromatin-Foci [208, 209]. Ob die Induktion der Seneszenz die Krebstherapie verbessert oder einen nachteiligen Effekt ausübt, ist bisher noch nicht geklärt. Frühere Studien zeigten, dass TMZ z. B. in Glioblastomzellen Seneszenz induziert und damit die Resistenzentwicklung gegenüber dem Zytostatikum begünstigt [205, 210, 211]. Im Gegensatz dazu können auch seneszente Krebszellen nach der Behandlung wieder in den Zellzyklus einlaufen [212, 213].

1.4. DNA-Reparatur als *Target* in der Krebstherapie

Die häufigsten Vertreter der in der Krebstherapie eingesetzten Medikamente sind DNA-schädigende Stoffe. Diese bedingen DNA-Läsionen, die meist replikationsabhängig in nicht-reparablen DSBs oder anderen Addukten resultieren, die zum Tod maligner Zellen führen. Leider ist die Spezifität der Chemotherapeutika gegenüber Krebszellen eher gering, zudem ist ihre Verabreichung mit vielen unerwünschten Nebenwirkungen konnotiert. Um die Effizienz der Krebstherapie - im Speziellen durch die Induktion von DNA-Schäden - zu verbessern, sind etliche Strategien beschrieben worden. Einige konzentrieren sich auf die Entdeckung neuer Komponenten der DDR [214-216], andere suchen nach Wirkstoffen, die spezielle DNA-Reparaturmechanismen modulieren [217-222] mit dem Ziel, in Kombination mit den Chemotherapeutikum synergistische Effekte auszulösen. Einige neue Wirkstoffe, die Moleküle diverser DNA-Reparaturmechanismen inhibieren, wurden bereits erfolgreich in Kombination mit bestehenden Therapien oder als Monotherapie getestet und finden aktuell Einzug in klinischen Studien [223]. Ein klassisches Beispiel ist die Induktion synthetischer Letalität durch einen PARP1-Hemmstoff (z. B. Olaparib) in *BRCA1*- oder *BRCA2*-mutierten Krebszellen [224]. Zwei Gene befinden sich in einer synthetisch letalen Interaktion, wenn die Mutation eines dieser Gene von der Zelle toleriert wird, während ein kombinierter Verlust oder eine simultane Mutation beider Gene für die Zelle tödlich ist. Genprodukte, die in einer synthetischen letalen Interaktion mit bekannten, aber pharmakologisch nicht direkt beeinflussbaren Läsionen stehen, sind aus zweierlei Hinsicht sehr geeignet für eine zielgerichtete Therapie. Zum einen ermöglicht ein auf synthetischer Letalität basiertes Therapiekonzept die pharmakologisch nicht-greifbare Mutation indirekt anzugehen, indem der synthetisch letale Interaktionspartner inhibiert wird, um so eine Tumortoxizität zu provozieren. Andererseits sollte ein solches Konzept hochspezifisch für diese mutationstragenden Zellen sein, während normales Gewebe geschützt ist. Ein vergleichbares Konzept wird aktuell auch auf andere HRR-defiziente Krebsentitäten ausgedehnt.

1.4.1. Targeting der homologen Rekombination

1.4.1.1. Targeting des MRN-Komplexes

Als zellulärer Sensor für DSBs leitet der MRN-Komplex die DDR ein. Gleichzeitig ist dieser Komplex direkt in der DSBR involviert. MRN koordiniert die Strangbruchenden, initiiert die Endresektion und fördert die Wiederherstellung der kollabierten Replikationsgabel [225]. Die Komponenten MRE11 und RAD50 wurden ursprünglich in genetischen Screenings von *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt. Die *mre11*-Mutante war dabei rekombinations-defizient in der Meiose [226], die *rad50*-Mutante sensitiv gegenüber DNA-Schäden [227]. NBS1 wurde erst später als Bindungspartner des Trinärkomplexes identifiziert. Hypomorphe Mutationen jeder einzelnen Untereinheit stehen in direktem Zusammenhang mit rezessiven Erkrankungen, die sich durch genomische Instabilität auszeichnen [228]. *Nbs1*-Mutationen sind z. B. mit dem *Nijmegen Breakage-Syndrom* assoziiert, einer autosomal rezessiven Erkrankung, die sich durch hohe Krebsinzidenzen, Zellzykluskontrolldefekten und einer hohen IR-Sensitivität auszeichnet [229]. Mutationen in *mre11* bedingten Krankheitsbilder sind mit *Ataxia-telangiectasia*-Erkrankungen vergleichbar [230], während RAD50-Defizienzen wiederum Ähnlichkeiten zum *Nijmegen Breakage-Syndrom* aufweisen [231]. Eine Null-Mutation ist in jedem der drei Gene letal (in Maus) [232-234]. MRE11 fungiert als Dimer [235], bindet an DSB-Enden [236, 237] und besitzt Exo- und Endonuklease-Aktivität [238, 239]. RAD50 trägt die ATPase-Aktivität [240], während NBS mittels Phospho-abhängigen Interaktionen DNA-Reparatur- und Checkpoint-Proteine an den DNA-Schaden rekrutiert (γ -H2AX, Checkpoint-Adapter MDC1, HRR-Regulator CtIP) [241-244]. Die Resektion durch MRE11 und damit die Generierung einer 3'-ssDNA ist von entscheidender Bedeutung. Diese ist essentiell für die ATM-Stimulierung und folglich die Checkpoint-Aktivierung sowie die Einleitung der HRR [182, 245]. Konsequenterweise könnte eine Dysfunktion des MRN-Komplexes, verbunden mit einem eingeschränkten *ATM-Signaling*, die Reparatur eines DNA-Schadens mindern oder gar verhindert. Die Hemmung des MRN-Komplexes ist somit eine attraktive Strategie, in Krebszellen den Zelltod in Kombination mit einem DNA-schädigenden Agens einzuleiten.

1.4.1.1.1. *Mirin*

Mirin ist der erste beschriebene MRE11-Inhibitor und wurde in einem Screening von 10 000 niedermolekularen Präparaten (DIVERSet, *Chembridge Corporation*) identifiziert. Die Wirkstoffe wurden dabei auf ihre Fähigkeit getestet, die ATM-vermittelte Phosphorylierung eines von γ -H2AX abgeleiteten Peptids zu inhibieren [246]. Der mit diesem Testsystem untersuchte Signalweg benötigt zur ATM-Aktivierung einen funktionalen MRN-Komplex. Mirin ($IC_{50}=66 \mu M$) blockiert die MRN-abhängige ATM-Aktivierung, ohne die Kinase- (ATM) oder Nuklease Aktivität (MRE11) einzuschränken [246]. Für Säugerzellen konnte gezeigt werden, dass Mirin zur Aufhebung des IR-induzierten G2/M-Arrests und zum Versagen der HRR führt [246]. Eine Reduktion der NHEJ-Reparatur-Effizienz wurde ebenfalls nachgewiesen [247].

1.4.1.1.2. *Targeting von RAD51*

RAD51 schützt blockierte Replikationsgabeln und ist aufgrund der Rekombinase-Aktivität ein zentraler Faktor für den Austausch von DNA-Strängen aller Reaktionen der homologen Rekombination. Ein kompletter Verlust von RAD51 ist letal [248]. Eine RAD51-Überexpression ist für viele Krebsentitäten beschrieben worden; sie suggeriert einen selektiven Vorteil im Umgang mit fortwährend steigendem Replikationsstress und vermehrten DNA-Schäden [249]. Im Zellsystem ist die ausbleibende Schadensantwort (keine RAD51-Foci nach IR) mit einer *BRCA1*-Dysfunktion assoziiert. Diese kann durch RAD51-Überexpression aufgehoben werden [250]. Stellt sich damit nicht konsequenterweise die Frage: Unterdrücken Krebszellen BRCAness durch die Heraufregulation von RAD51? Und, könnte eine spezifische RAD51-Inhibition ein probates Werkzeug sein, Krebszellen für die Therapie zu (re)sensitivieren? Für das Kolorektalkarzinom ist die RAD51-Überexpression negativ prognostisch [251]. *Vice versa* konnte bereits für stark-RAD51-exprimierende Maus-Melanomzellen gezeigt werden, dass eine gezielte RAD51-Herunterregulation die Resistenz gegenüber dem Alkylanz Dacarbazin umkehrt [252]. Basierend auf diesen Erkenntnissen ist die Suche nach potenten RAD51-Hemmstoffen aktuell ein reges Forschungsgebiet. Vielversprechende Wirkstoffe wurden bereits identifiziert. Die beiden

Vertreter B02 und RI-1 wurden in der vorliegenden Arbeit zur gezielten Hemmung von RAD51 eingesetzt.

1.4.1.2.1. B02

RAD51 fördert den DNA-Strangtausch zwischen homologen Sequenzabschnitten einzel- und doppelsträngiger DNA. Huang *et al.* [253] entwickelten eine *Fluorescence resonance energy transfer* (FRET)-basierte Untersuchungsmethode, die diesen Austausch detektiert. Mittels dieser Untersuchungsmethode und eines Hochdurchsatz-Screenings von Stoffen niedermolekularer Zusammensetzung (*NIH Small Molecule Repository*) identifizierten die Forscher aus mehr als 200 000 Wirkstoffverbindungen 17 potenzielle Hemmstoffe, die diese RAD51-vermittelte Austausch-Aktivität unterbinden. Weitere Untersuchungen reduzierte die Zahl der Kandidaten auf vier, wobei sich B02 als der effizienteste Inhibitor der RAD51-Aktivität hervortat ($IC_{50}=27,4 \mu\text{M}$). In anschließenden Studien wurden die Effekte von B02 im Zellsystem analysiert: Die Ergebnisse zeigten für B02 einen ausgeprägten inhibitorischen Effekt auf die HRR und die DNA-Reparatur in humanen und Maus-Zellen [254].

Untersuchung von HEK-Zellen ergab, dass B02 die Entstehung von IR-induzierten RAD51-Foci und damit auch nachweislich die HRR-Effizienz reduzierte [254]. Dieselbe Studie zeigte auch erste B02-vermittelte sensitivierende Effekte gegenüber DNA-schädigenden Agenzien. Embryonale Maus-Fibroblasten (*mouse embryonic fibroblasts*, MEFs) reagierte sensitiver gegenüber Cisplatin und Mitomycin C, sowie einer Kombination von MMS und der Hemmung von PARP (AZD2281). Ferner wurde in Brustkrebs-Studien die Wirkung von B02 in Kombination mit anderen Chemotherapeutika wie Etoposid, Cisplatin, Doxorubicin und Topotecan getestet. Der RAD51-Inhibitor sensitiviert MDA-MB-231-Zellen gegenüber allen Medikamenten-Kombinationen, wobei die Applikation mit Cisplatin hervorstach und auch im Xenograftmodell die Proliferation inhibierte [255]. Algpulinsa *et al.* untersuchten den Einfluss von B02 auf multiple Myelomzellen nach Doxorubicin-Behandlung [256]. Eine Vorbehandlung mit B02 verhinderte die Entstehung von Doxorubicin-induzierten RAD51-Foci und sorgte dadurch für einen Anstieg an γH2AX -Foci, respektive DSBs. Erneut wurde die Inhibition der HRR-Aktivität bestätigt.

1.4.1.2.2. RI-1

Der RAD51-Inhibitor RI-1 wurde ebenfalls durch ein Screening identifiziert (10 000 Moleküle des DIVERSet, *Chembridge Corporation*). Budke *et al.* [257] berichteten als erstes, dass RI-1 die Bindung von RAD51 an einzelsträngiger DNA verhindert. Der Wirkmechanismus basiert auf einer kovalenten Bindung der Imid- an die Thiol-Gruppe des Cystein-Rests (Cys319) des RAD51-Proteins. Diese Interaktion hemmt die Bindung von RAD51 an die DNA ($IC_{50}=6,62 \mu M$) und die Polymerisierung des Proteins während der Nukleofilament-Bildung. Da diese Interaktionsdomäne stark konserviert ist, bindet RI-1 auch RAD51 von *Saccharomyces cerevisiae*, hierbei korrespondierend zu Cys377. Der Cys319-Rest ist an der Schnittstelle zweier RAD51-Monomere lokalisiert und greift auf die ATPase-Domäne über. Die Nukleofilament-Bildung kann somit sterisch oder durch Modulation der ATP-Bindung verhindert werden [257]. Untersuchungen im Zellsystem zeigten, dass RI-1 wie B02 die Bildung von RAD51- und γ H2AX-Foci reduziert [258].

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Da die gegenwärtige, auf alkylierende Zytostatika basierende Chemotherapie bis heute keineswegs einen zufriedenstellenden klinischen Therapieerfolg für Glioblastompatienten bietet, rücken Kombinationstherapien und gezielte Behandlungsstrategien in den Fokus zur Entwicklung effizienter Krebstherapien. Die Wirkmechanismen der klinisch eingesetzten Chemotherapeutika TMZ und CCNU sind hinreichend untersucht und identifizierten spezifische DNA-Schäden als Auslöser zytotoxischer Ereignisse. Tumorzellen verfügen jedoch über diverse protektive (Resistenz-) Mechanismen. Wie gesunde Zellen besitzen auch entartete Zellen ein sehr effizientes DNA-Reparatursystem, was die Beseitigung der Therapie-induzierten Schäden erlaubt und eine erfolgreiche Tumorbehandlung verhindert. Auch ist z. B. eine Dysregulation von Zelltodwegen keine Seltenheit.

Dem Antimalaria-Medikament ART konnte eine profunde zytotoxische Wirkung auf eine Vielzahl von Tumorzelllinien, einschließlich einiger Glioblastomzelllinien, nachgewiesen werden. ART ist systemisch gut verträglich, wirkt antiproliferativ und induziert in Krebszellen durch die Generierung von ROS nachweislich DSBs. Im Hinblick auf die Reduktion

der mit der Chemotherapie einhergehenden unerwünschten Arzneimittelwirkung (UAW) und die Überwindung Therapie-induzierter Resistenzen wäre z. B. eine Kombination des klassische Chemotherapeutikums TMZ (niedrigdosiert) mit dem Antimalariamittel ART denkbar.

Eine gezielte Behandlungsstrategie könnte durch die pharmakologische Inhibition eines bestimmten DNA-Reparaturweges realisiert werden. Es ist bekannt, dass CCNU-induzierte ICLs replikationsabhängig zu DSBs führen und diese über die DSB-Reparaturprozessiert werden. Einer der Hauptkomponenten dieses Reparaturweges ist die HRR. Zur Inhibition des HRR-Schlüsselproteins RAD51 und des Sensorproteins MRE11 (u.a. Bestandteil des MRN-Komplexes) wurden spezifischen Hemmstoffe entwickelt.

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen beide Behandlungsansätze. Mit dem Ziel, die Alkylanzien-basierte Glioblastomtherapie zu verbessern, sollen folgende Fragestellungen untersucht und beantwortet werden:

- Hat ART einen sensitivierenden Einfluss auf den TMZ-induzierten Zelltod in Glioblastom- und Gliom-stammzellähnlichen Zellen?
- Ist die etwaige Sensibilisierung auf eine Potenzierung der DSBs zurückzuführen? Oder moduliert ART andere Überlebens- oder Zelltodmechanismen?
- Wirkt die etwaige Sensitivierung auch im Xenograft-Mausmodell? Hat dies therapeutische Relevanz?

- Bewirkt CCNU auch in Glioblastomzellen die Induktion von ICLs und daraus resultierende DSBs?
- Kann die HR-vermittelte Schutzfunktion der Glioblastomzellen durch Inhibition von RAD51 und MRE11 aufgehoben werden und die Krebszellen gegenüber CCNU sensibilisieren? Gibt es Unterschiede in der Effizienz der Inhibitoren?
- Ist diese Targeting-Strategie, die auf die Inhibition des MRN-Komplexes und HRR abzielen, auf ein Xenograft-Mausmodell übertragbar?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmittel

Sofern nicht gesondert vermerkt, wurden zur Anfertigung der vorliegenden Arbeit Chemikalien der Firma Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) oder der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland; St. Louis (MO), USA) verwendet. Plastikwaren wurde von den Herstellern Greiner Bio-One Int. GmbH (Frickenhausen, Deutschland) und der Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) bezogen, die Zellkulturmedien und -zusätze von der Firma Life Technologies/ Gibco/ Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham (MA), USA) erworben.

2.1.2. Geräte

Geräte	Hersteller
Bestrahlungsanlage: Gammacell 2000 (Cs ¹³⁷)	Nuklear Data, Frankfurt, Deutschland
Bestrahlungsanlage: OB 58/905-2 (Cs ¹³⁷)	Buchler GmbH, Braunschweig, Deutschland
Biofuge Pico	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
Branson Sonifier 250	Branson Ultrasonics Corporation, Danbury (CT), USA
CFX96 Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules (CA), USA
CO ₂ -Inkubator: Heracell 240i	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
ColorView SoftImagingSystem	Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Deutschland
Durchflusszytometer FACS CANTO II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Einfrierbox: Cryo 1°C Freezing Container, "Mr. Frosty"	Nalgene (Thermo Fisher Scientific Inc.), Waltham (MA), USA
Fluoreszenz-Mikroskop: Axiovert 35	Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenz-Mikroskop: Microphot-FXA	Nikon, Tokio, Japan
Heraeus Trockenschrank Typ B 6200	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
Konfokales Mikroskop: LSM 710	Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Deutschland
Kühlschrank (+4°C)	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Laborschüttler MaxQ 4000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
Liquid Scintillation Analyzer TRI-CARB 2100TR	Canberra Packard Central Europe GmbH, Schwadorf, Österreich
Luminometer Tristar ² Multimode reader LB942	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland
Mikroskop: Axiovert 40c	Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Deutschland
NanoDrop 2000 Spectrometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
Odyssey infrared imaging 9120	LI-COR, Lincoln (NE), USA
PMR-30 Compact-Schüttler	Grant Inst. Ltd., Shepreth (Cambridgeshire), UK
Roll-Inkubator SRT6/ SRT9	Stuart, Stone (Staffordshire), UK

S1 Pipettierhilfe	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
SDS-PAGE chamber Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules (CA), USA
SDS-PAGE PowerPac Basic 75W	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules (CA), USA
Sicherheitswerkbank: Astec Microflow Class I	Bioquell UK Ltd, Andover (Hampshire), UK
T100 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules (CA), USA
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tiefkühler (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Tiefkühler (-80°C)	Sanyo, München, Deutschland
Vortexer REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Wasserbad 3044	Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Zentrifuge 5417R (Rotor: FA-45-30-11)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge: Megafuge 1.0 (Rotor: #2704)	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland

2.1.3. Software

Software	Entwickler
BD FACSDiva Version 6	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Cell ^A -Imaging Software für Life Science Microscopy	Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Deutschland
CFX Manager 3.1	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules (CA), USA
EndNote Version X6	Thomson Reuters, New York City (NY), USA
GraphPad Prism Version 6	GraphPad Software, La Jolla (CA), USA
ICE Software	Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland
Image Studio Lite 5.2	LI-COR, Lincoln (NE), USA
ImageJ	U.S. National Institutes of Health, Bethesda (MD), USA
ModFit LT 3.3	Verity Software House Inc, Topsham (ME), USA
MS Office Version 2016	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
Odyssey Version 3.0	LI-COR, Lincoln (NE), USA
Precision Melt Analysis Software 1.2	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules (CA), USA
SnapGene Viewer 2.8.2	GSL Biotech, Chicago (IL), USA
ZEISS ZEN Imaging Software 2.1	Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Deutschland

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Es wurden ausschließlich sterilisierte Materialien und Lösungen verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Inkubator unter Standardbedingungen bei 37°C und 7 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

2.2.1.1. Zelllinien

Zelllinie	Medium	Herkunft/ Referenz
Glioblastomzelllinien		
A172	DMEM + 10% FCS	Prof. Dr. M. Weller, Zürich, Schweiz; Prof. Dr. B. Kaina, Mainz, Deutschland
LN18	DMEM + 10% FCS	Prof. Dr. M. Weller, Zürich, Schweiz; Prof. Dr. B. Kaina, Mainz, Deutschland
LN229	DMEM + 10% FCS	Prof. Dr. M. Weller, Zürich, Schweiz; Prof. Dr. B. Kaina, Mainz, Deutschland
LN308	DMEM + 10% FCS	Prof. Dr. M. Weller, Zürich, Schweiz; Prof. Dr. B. Kaina, Mainz, Deutschland
LN428	DMEM + 10% FCS	Prof. Dr. M. Weller, Zürich, Schweiz; Prof. Dr. B. Kaina, Mainz, Deutschland
U251	DMEM + 10% FCS	Prof. Dr. M. Weller, Zürich, Schweiz; Prof. Dr. B. Kaina, Mainz, Deutschland
U87MG	DMEM + 10% FCS	CLS, Heidelberg, Deutschland
Transfizierte LN229-Linien		
LN229-PTENsh LN229-pS-empty	DMEM + 10% FCS + 2,2 µg/ml Puromycin (Invitrogen)	Dr. W. P. Roos, Mainz, Deutschland
LN229-shRAD51-23 LN229-pS-empty-2	DMEM + 10% FCS + 0,75 mg/ml G418 (Millipore)	[259], Prof. Dr. B. Kaina, Mainz, Deutschland
LN229-HR-B6	DMEM + 10% FCS + 0,88 µg/ml Puromycin (Invitrogen)	diese Arbeit
Glioma stem-like cells (GSCs)		
G112SP	Neurobasal-A + B-27 Supplement + 20 ng/ml EGF (Biochrom) + 10 ng/ml FGF-basic (Biochrom) + 0,1% BSA	PD Dr. E. Kim, Mainz, Deutschland

Zelllinie	Medium	Herkunft/ Referenz
GB-Patientenlinien		
MZ160	DMEM + 5% FCS	PD Dr. D. Wiewrodt und Prof. Dr. B. Kaina, Mainz; Deutschland
MZ219	DMEM + 5% FCS	PD Dr. D. Wiewrodt und Prof. Dr. B. Kaina, Mainz; Deutschland
MZ227	DMEM + 5% FCS	PD Dr. D. Wiewrodt und Prof. Dr. B. Kaina, Mainz; Deutschland
Maus-Fibroblasten		
NIH/3T3	DMEM + 10% FCS	ATCC, Manassas (VA), USA

2.2.1.2. Kultivierung adhärenter Zellen

Die Kultivierung der Glioblastomzellen und der murinen Fibroblasten NIH/3T3 erfolgte in Zellkulturflaschen oder -schalen in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) angereichert mit 5 bzw. 10 % fötalem Kälberserum (engl. *fetal calf serum*, FCS) unter Standardbedingungen. Um ein exponentielles Wachstum zu gewährleisten, wurden die Zellen vor Erreichen eines konfluenten Stadiums routinemäßig passagiert. Hierzu wurde das verbrauchte Medium der adhären wachsenden Kultur durch Absaugen entfernt, die Zellen mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (engl. *Phosphate buffered saline*, PBS) gewaschen und durch Zugabe von 0,5 mg/ ml Trypsin-0,2 mg/ ml EDTA₄Na-Lösung abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden mit frischem Medium verdünnt und erneut kultiviert. Alternativ wurde die Zelldichte der Suspension in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen den Versuchsbedingungen entsprechend (1×10^3 - 3×10^5 Zellen/ 4 ml) ausgesät. Die Zellzahl wurde so gewählt, dass auch über einen längeren Inkubationszeitraum ein exponentielles Wachstum (sofern nicht von der Behandlung gestört) ermöglicht wurde. Die Stammzellkultur wurde spätestens nach zwölf Wochen durch eine frische Kultur ersetzt. Zum Stammerhalt wurden exponentiell wachsende Zellen wie beschrieben abgelöst, in frischem Medium aufgenommen und zentrifugiert (5 min, 1500 Upm, RT). Nach Entfernen des Überstandes wurde das verbleibende Zellpellet in Einfriermedium (Medium + 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Diese Röhrchen wurden in einer mit Isopropanol gefüllten Kryobox (Kühlungsrate: 1°C/ min) auf -80°C abgekühlt und anschließend zur Langzeit-Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff (Gasphase) überführt.

Das Auftauen von kryokonservierten Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37°C. Um das im Einfriermedium enthaltenen DMSO zu entfernen, wurden die aufgetauten Zellen sofort mit Kulturmedium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und in Kulturflaschen überführt. Bis zur experimentellen Verwendung wurde kryokonservierten Zellen eine Anpassungsphase an die Kulturbedingungen von 10-14 Tagen gewährt.

2.2.1.3. Kultivierung der *glioma stem-like cells* (GSCs)

Die G112-Subpopulation (SP) wurden durch eine kontinuierliche Kultivierung unter serumfreien Bedingungen aus der Gliomzelllinie G112 isoliert [260]. G112SP-Zellen besitzen Stammzell-ähnliche Eigenschaften wie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, phänotypische Plastizität und das Potenzial, *in vitro* klonale Gliomsphären auszubilden. Im orthotopen Mausmodell sind sie ähnlich wie das GB hoch tumorigen, hoch invasiv, intratumoral heterogen und radioresistent [261]. Die G112SP werden unter serumfreien Bedingungen in Neurobasal-A-Medium, welches mit B-27, 20 ng/ml EGF, 10 ng/ml FGF-basic (beides von Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) und 0,1 % BSA supplementiert wurde, kultiviert. Zum Passagieren wurden die Sphären gesammelt, mittels 0,05 % Trypsin-EDTA vereinzelt, in PBS gewaschen, filtriert und in frischem Medium kultiviert oder in entsprechenden Zelldichten für die Experimente ausgesät.

2.2.1.4. Mykoplasmentest

Alle Zelllinien wurden regelmäßig mit dem Venor®GeM-Mykoplasmen-Detektionskit (Biochrom GmbH; Berlin, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben auf Mykoplasmenkontaminationen untersucht. Die Mykoplasmandetektion beruht auf einem Nukleinsäure-Amplifikationstest auf Basis einer *hot-start* Polymerasen-Kettenreaktion (PCR). Es wurden ausschließlich kontaminationsfreie Zelllinien verwendet.

2.2.2. Behandlung von Zellen

Um ein vollständiges Anheften der Zellen auf der Kulturschale zu gewährleisten, wurden die Zellen einen Tag vor der Behandlung (t=-24 h) ausgesät. Die Zelldichte wurde hierbei so gewählt, dass den Zellen über den kompletten Experimentalzeitraum ein exponentielles Wachstum möglich war. Des Weiteren wurden entsprechend der Behandlung Lösungsmittelkontrollen mitgeführt.

2.2.2.1. Inhibitoren und Zytostatika

Eine Übersicht der verwendeten Inhibitoren und Zytostatika ist in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst (Tab. 2). Angegeben sind auch die Lösungsmittel, Stamm- und Endkonzentrationen der jeweiligen Stoffe, sowie ggf. der Zeitpunkt der Behandlung. Eine Vorbehandlung ist z. B. dann notwendig, wenn definierte Proteine eine nachfolgende Behandlung mit dem Zytostatikum (ZS) beeinflussen könnten. Die Applikation des Hemmstoffs bzw. des Zytostatikums erfolgte direkt ins Zellmedium. Sollten geringe Volumina (< 1 µl) pipettiert werden, wurde eine Vorverdünnung mit Medium oder PBS hergestellt.

Zur Aufrechterhaltung der Hemmstoffwirkung über einen längeren Experimentalzeitraum (bis 144 h) wurden die Inhibitoren des p53 (Pifithrin- α), des eIF2 α (Sal-1) und der Ferroptose (Fer-1) alle 24 h erneuert. Die Inhibition der Kinasen (ATM, ATR, CHK1 und CHK2) wurden alle 48 h aufgefrischt, die der DNA-PK nach 72 h.

Die Zytostatika wurden als Pulsbehandlung appliziert. Die Exposition mit CCNU umfasste 1 h, anschließend folgte der Austausch des Kulturmediums. Da sowohl ACNU als auch TMZ eine sehr geringe Halbwertszeit aufweisen, wurde auf einen Mediumswechsel verzichtet. Die Hemmung der HRR durch B02, RI-1 oder Mirin, erfolgte nach der CCNU-Gabe simultan mit dem Mediumswechsel, in Kombination mit TMZ jedoch erst nach 48 h.

Für die Tierexperimente wurden die Zytostatika und der Inhibitor frisch eingewogen. Für TMZ wurde eine sterile 36 mg/ml Stammlösung (1:5 DMSO/ NaCl) hergestellt und unter sterilen Bedingungen intraperitoneal (i.p.) appliziert. Die Einmal-Dosis betrug 200 mg/kg Körpergewicht (KG).

CCNU und RI-1 wurden steril in Maisöl gelöst. Im U87MG-Xenograft wurden 25 mg/kg KG, im LN229-Xenograft 12,5 mg/kg KG CCNU-Lösung i.p. appliziert. Die Konzentration des

RAD51-Hemmstoffs betrug 1 mg/kg KG und wurde ebenfalls i.p. verabreicht (1 h nach CCNU).

ART wurde im Tierexperiment oral mit dem Trinkwasser verabreicht. Hierzu wurde eine 1 mg/ml ART-Trinklösung (in Ethanol und 0,2 % Saccharose in sterilem H₂O gelöst) hergestellt. Das Trinkwasser wurde pro Tier und Tag auf 5 ml limitiert.

Tab. 2 Liste der verwendeten Präparate. Abk. KG=Körpergewicht, LM = Lösungsmittel, Endkonz = Endkonzentration, Stammlsg.=Stammlösung., ZS=Zytostatikum.

Präparat	Hersteller	Target	Stammlsg./LM	Endkonz.	Behandlung
Inhibitoren					
B02	Axon MedChem, Groningen, Niederlande	RAD51	25 mM in DMSO (-80°C)	2-10 µM	1 h nach CCNU/ 48 h nach TMZ
CHK2-Inhibitor II	Sigma-Aldrich, Karlsruhe, Deutschland	CHK2	10 mM in DMSO (-20°C)	10 µM	1 h vor ZS
Ferrostatin-1 (Fer-1)	Tocris, WI-Nordenstadt, Deutschland	Ferrop-tose	10 mM in DMSO (-20°C)	10 µM	1 h vor ZS
KU-60048	Selleckchem, Houston (TX), USA	DNA-PK	900 µM in H ₂ O (-20°C)	1 µM	1 h vor ZS
KU-55933	Selleckchem, Houston (TX), USA	ATM	10 mM in DMSO (-20°C)	3 µM	1 h vor ZS
Mirin	Tocris, WI-Nordenstadt, Deutschland	MRE11	25 mM in DMSO (-20°C)	5-25 µM	1 h nach CCNU/ 48 h nach TMZ
O ⁶ BG	Sigma-Aldrich, Karlsruhe, Deutschland	MGMT	10 mM in DMSO (-20°C)	10 µM	1 h vor ZS
Pifithrin-α	Sigma-Aldrich, Karlsruhe, Deutschland	p53	30 mM in DMSO (-80°C)	30 µM	1 h vor ZS
RI-1	Axon MedChem, Groningen, Niederl.	RAD51	25 mM in DMSO (-80°C)	2,5-20 µM	1 h nach CCNU/ 48 h nach TMZ
Salubrial (Sal)	Sigma-Aldrich, Karlsruhe, Deutschland	eIF2α	10 mM in DMSO (-20°C)	25 µM	1 h vor ZS
UCN-01	Sigma-Aldrich, Karlsruhe, Deutschland	CHK1	1 mM in DMSO (-20°C)	150 nM	1 h vor ZS
VE-822	Selleckchem, Houston (TX), USA	ATR	10 mM in DMSO (-80°C)	2 µM	1 h vor ZS
Zytostatika					
ACNU	Sigma-Aldrich, Karlsruhe, Deutschland		10 mM in H ₂ O (-20°C)	50 µM	
CCNU	Sigma-Aldrich, Karlsruhe, Deutschland		10 mM in EtOH (-20°C)	5-30 µM, <i>in vivo</i> : 12,5-25 mg/kg KG	
TMZ	großzüglicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. G. Margison, Manchester, UK		35 mM in DMSO/H ₂ O (1:2) (-80°C)	2,5-50 µM, <i>in vivo</i> : 12,5-25 mg/kg KG	

Präparat	Hersteller	Target	Stammslg./LM	Endkonz.	Behandlung
Weitere Medikamente					
ART	Dafra Pharma Int., Turnhout, Belgien		100 mg/ml in DMSO, Arbeitslsg.: 2 mg/ml in 2% DMSO/PBS (-20°C)	3,75-15 µg/ml (72 ^h nach TMZ), <i>in vivo</i> : 1 mg/ml im Trinkwasser	

2.2.2.2. Behandlung mit Artesunat

Auch die ART-Behandlung erfolgte durch direkte Applikation ins Zellmedium, die Endkonzentrationen betragen 3,75 - 30 µg/ ml. Anschließend wurden die Zellen bis zum gewünschten Zeitpunkt unter Standardbedingungen kultiviert.

Wurde ART in Kombination mit TMZ appliziert, erfolgte dies stets, wenn nicht anders vermerkt, nach folgendem Schema:

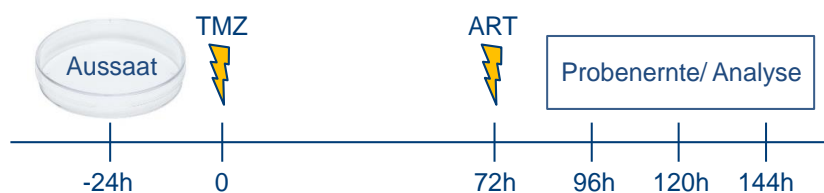


Abb. 9 Behandlungsschema der kombinierten TMZ- und ART-Behandlung.

Die Zellen wurden einen Tag vor der TMZ-Behandlung (t=-24 h) ausgesät, zum Zeitpunkt t=0 mit TMZ behandelt. Drei Tage danach (t=72 h) folgte die Behandlung mit ART. Die ART-Einzelbehandlungen erfolgte in diesem Behandlungskonzept ebenfalls zum Zeitpunkt t=72 h. Anschließend wurden die Zellen bis zum gewünschten Zeitpunkt unter Standardbedingungen kultiviert.

2.2.3. Herstellung stabiler Zellklone

Mithilfe von Zellklonen kann der Effekt der Expression eines transfizierten, stabil ins Genom integrierten Gens in einem isogenen Zellsystem untersucht werden. Das transfizierte Gen kann für ein Protein oder eine shRNA kodieren, welches die Expression eines Proteins der Wahl stilllegt.

Zur Herstellung von stabilen Zellklonen müssen Zellen mit dem Ziel-Gen, welches sich i. d. R. zusammen mit einem eukaryotischen Resistenzgen auf einem Plasmid befindet, transfiziert werden. Um entsprechende Transfektionskontrollklone zu generieren, erfolgt die Transfektion mit einem „leeren“ Vektor, der lediglich das Resistenzgen kodiert. Nach der Transfektion wurden die Zellen zur Vereinzelnung stark verdünnt oder – sofern ein Reporterkonstrukt integriert wurde – als Einzelzelle durchflusszytometrisch sortiert. Die Kultivierung erfolgte im entsprechenden Selektionsmedium. Die Integration des Transgens wurde in den Kulturen der einzelnen Zellklone mittels Westernblot für die Ziel-Proteine verifiziert.

2.2.3.1. Midi-Präparation: Isolation von Plasmid-DNA

Das für den HRR-Assay erworbene Plasmid pDRGFP (Plasmid #26475, Addgene, Abb. 10) wurde als Bakterienstichkultur verschickt. Die Vervielfältigung der kompetenten *E. coli* Bakterienklone (Stamm: DH5 α) erfolgte zunächst in 6 ml LB-Medium mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin für mind. 6 h bei 37°C und 200 Upm. Anschließend wurde die Suspension der angewachsenen Bakterienkultur im Verhältnis von 1:500 bis 1:1000 in frisches 300 ml LB-Medium mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin überführt und über Nacht erneut bei 37°C und 200 Upm inkubiert.

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte mittels des NucleoBond® Xtra Midi-Kits (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Weilmünster, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Die DNA-Konzentration sowie die Reinheit des Eluats wurde am NanoDrop spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm bestimmt. Eine optische Dichte (OD) bei 260 nm (OD_{260}) von 1 entspricht bei dsDNA einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Der Quotient aus $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ gibt Aufschluss über die Reinheit und sollte größer 1,8 sein. Die Plasmid-DNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

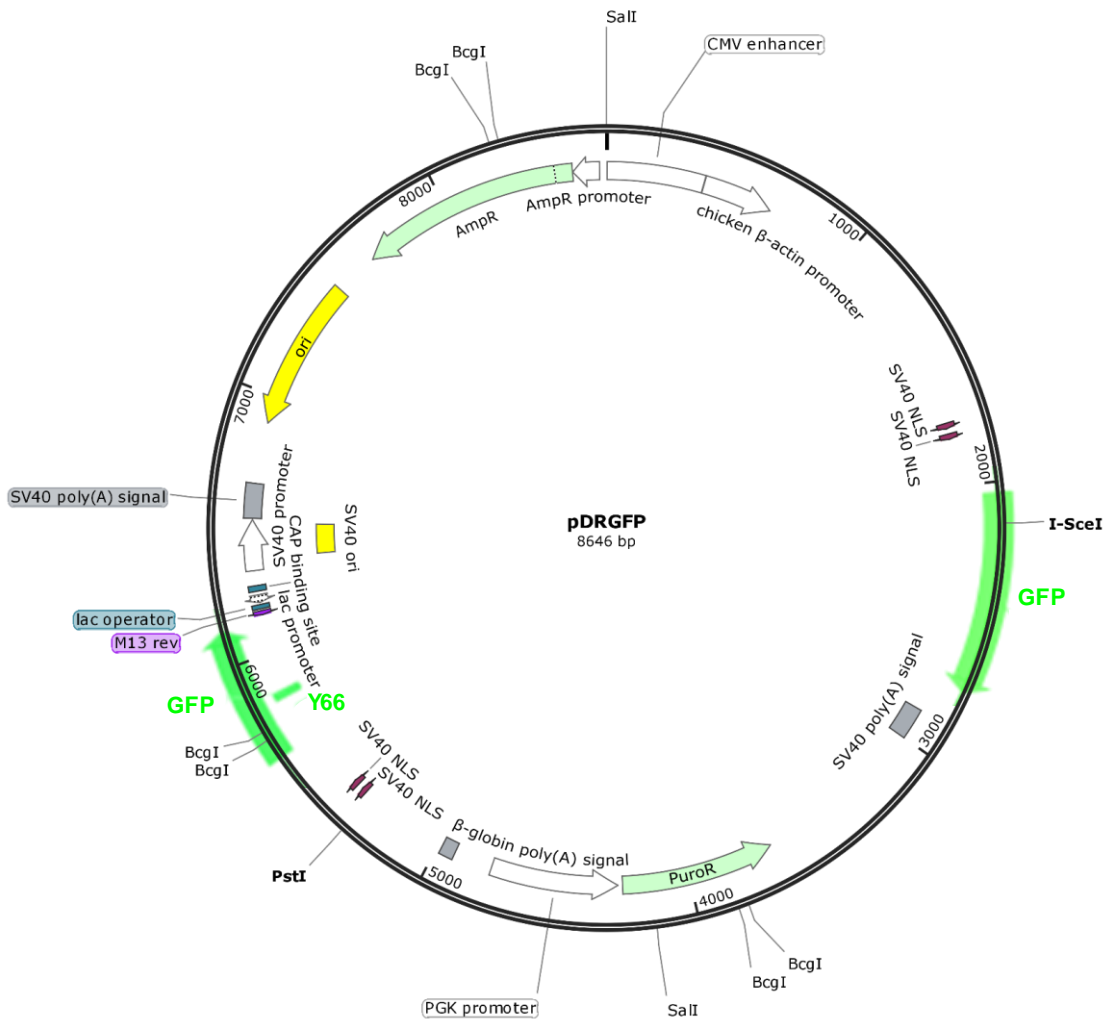


Abb. 10 Vektor-Karte des pDRGFP-Plasmids. pgkPURO bildet das Vektor-Rückgrat. DieVektor-Karte wurde mittels des SnapGene Viewers 2.8.2 generiert.

2.2.3.2. Transfektion

Die Transfektion zur Generierung stabiler Zellklone erfolgte sobald die Zellen eine Konfluenz zwischen 60 – 80 % erreicht hatten. Der *Knockdown* von RAD51 wurde durch eine spezifische shRAD51-Sequenz erreicht, die durch einen pSUPER-Vektor vermittelt wurde [259]. Die Antibiotika-Resistenz, die der Selektion der positiven Zellklone diente, wurde durch die Co-Transfektion des pSUPER.neo-Plasmids erzeugt (Zellklone dankend erhalten von Dr. Steve Quiros). Der *Knockdown* von PTEN erfolgte analog mit entsprechender shRNA (Zellklone dankend erhalten von Dr. Wynand P. Roos).

Das pDRGFP-Plasmid zur durchflusszytometrischen Bestimmung der HRR-vermittelten DSB-Reparatur (Addgene #26475; [262]) trägt sowohl das Reparatur-Substrat als auch die Puro-mycin-Resistenz (Abb. 10). Es wurden 1 µg DNA transfiziert.

Alle Transfektionen erfolgten mittels des Effectene Transfektions-Reagenz (Quiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen im Verhältnis 1:6 passagiert, bevor 24 h später die selektiven Antibiotika hinzugefügt wurden. Die Selektion erfolgte bis zur Ausbildung von Kolonien, die anschließend gepickt und für die Kryokonservierung und Verifizierung des jeweiligen *Knockdowns* (via Western-blotanalysen) expandiert wurden.

Zur Analyse der HRR-Aktivität benötigen die stabilen pDRGFP-Klone eine weitere, transiente Transfektion mittels eines *I-SceI*-exprimierenden Plasmids (pCβASceI, Addgene #26477, [263], dankend erhalten von Dr. Wynand P. Roos). Die Transfektion von 1 µg DNA erfolgte mittels des Effectene Transfektions-Reagenz (Quiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers.

2.2.4. Proliferation, Zellzyklusbestimmungen und Replikation

2.2.4.1. Wachstumskurve

Zur Erstellung von Wachstumskurven wurden die Zelllinien in einer definierten Dichte (5×10^4 - 1×10^5 / 4 ml) auf 6 cm-Kulturplatten ausgesät. Ein Anheften der Zellen ($t=-24$) vor der Behandlung ($t=0$) wurde gewährleistet. Im Intervall von 24 h wurden die Zellen geerntet und deren Gesamtzellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Um die lebenden von den toten bzw. nekrotischen Zellen zu unterscheiden, wurde die Zellsuspension vor dem Zählen mit einer 0,5 % (w/v) Trypanblau/ PBS-Lösung verdünnt (1:2). Nekrotische Zellen besitzen eine perforierte Zellmembran und nehmen den Farbstoff ungehindert auf. Sie erscheinen im Lichtmikroskop dunkelblau. Für die Kalkulation der Wachstumskurve wurden nur vitale Zellen berücksichtigt und die Gesamtzellzahl graphisch als Funktion der Zeit aufgetragen. Die aus der Wachstumskurve resultierende Generationszeit wurde mit der GraphPad PRISM Software errechnet.

2.2.4.2. Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodid Färbung

Propidiumiodid (PI) durchdringt perforierte Zellmembranen und interkaliert in Nukleinsäuren. Da die Fluoreszenz einer Zelle proportional zu ihrem DNA-Gehalt ist, wird diese Färbung dazu genutzt, den DNA-Gehalt und den Zellzyklusstatus einer einzelnen Zelle oder Zellpopulation im Durchflusszytometer zu bestimmen. Ein typisches Zellzyklusprofil unbehandelter Zellen zeigt einen G1- und einen G2-Peak. Der G2-Peak fluoresziert im Vergleich zum G1-Peak mit doppelter Intensität, Zellen, die sich in der S-Phase befinden, mit einer Intensität, die zwischen der der G1- und G2-Population liegt. Neben den G1-, S- und G2-Phase-Zellen können auch Fraktionen mit subdiploidem DNA-Gehalt, die SubG1-Phase-Zellen, detektiert werden (Abb. 11). Diese werden aufgrund der DNA-Fragmentierung als apoptotisch definiert [264, 265].

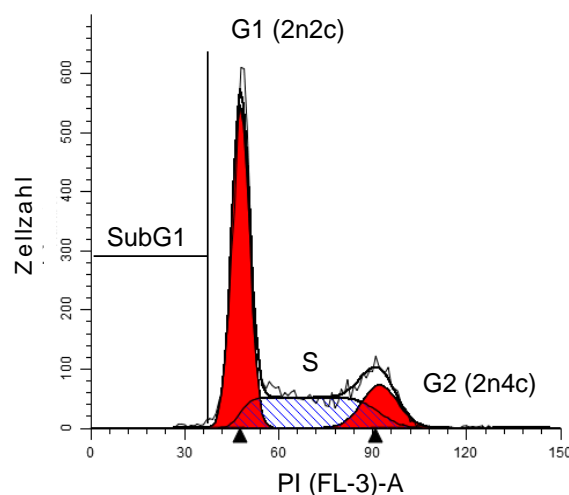


Abb. 11 Histogramm der Zellzyklusanalyse. Dargestellt ist die PI-Fluoreszenz (PI(FL-3)-Area=DNA-Gehalt) gegen die Zellzahl sowie die einzelnen Zellzyklusphasen.

Zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung wurden die Zellen mit Erreichen der angegebenen Zeitpunkte nebst Zellüberstand geerntet und sedimentiert (5 min, 1500 Upm, RT). Das Pellet wurde in 200 μ l PBS resuspendiert, die Zellen durch tropfenweises Hinzufügen von 2 ml eiskaltem 70 % Ethanol unter stetigem Vortexen fixiert und bei -20°C (min. 2 h, max. 1 Woche) gelagert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 1500 Upm, RT) wurde das Pellet in 336 μ l PBS/ Ribonuklease A (RNase A) (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) resuspendiert und für 1 h bei RT inkubiert. Nach dem RNA-Verdau wurde die DNA mit 164 μ l PI (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 16,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Endkonzentration) gefärbt und durchflusszytometrisch am FACSCanto II (Becton Dickinson; Heidelberg,

Deutschland) quantifiziert. Hierzu wurden mindestens 10 000 Zellen/ Probe analysiert und die Zellzyklusverteilung mit der ModFit LT™ Software ausgewertet.

2.2.4.3. DNA-Fiber-Analysen

Die Analyse der DNA-Fiber erfolgte analog der Beschreibung [266]. Exponentiell wachsende Zellen wurden mit 30 µM CCNU behandelt und in An- oder Abwesenheit der HRR-Hemmstoffe (10 µM B02, 25 µM Mirin bzw. 20 µM RI-1) für 6 oder 16 h inkubiert. Die Markierung mit den Thymidinanaloga erfolgte für jeweils 30 min mit 25 µM 5-Chlor-2'-deoxyuridin (CldU) und anschließend mit 250 µM 5-Iodo-2'-deoxyuridin (IdU, TCI Deutschland GmbH, Eschborn, Deutschland). Die markierten Zellen wurden geerntet, DNA-Fiber präpariert und mit monoklonalem *rat* anti-BrdU (1:1000; AbD Serotec GmbH, Puchheim, Deutschland) und *mouse* anti-BrdU (1:1500; BD, Heidelberg, Deutschland) gefärbt. Die primären Antikörper wurden durch *goat* anti-*rat* F(ab')₂ Cy-3-gekoppelten Antikörper (1:500; Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, UK) und *goat* anti-*mouse* F(ab')₂ Alexa488®-gekoppelten Antikörper (1: 500; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) detektiert. Die mikroskopische Analyse erfolgte am LSM 710: die Abschnitte, in die CldU (rot) und IdU (grün) inkorporierten, wurden mittels der ZEN 2009-Software bestimmt und in kbp umgerechnet. Es wurden mind. 150 Replikationsgabeln/ Probe analysiert. [267].

2.2.5. Zytotoxizitätsbestimmungen

2.2.5.1. Koloniebildungstest

Um die klonogene Überlebensrate nach diversen Einzel- und Kombinationsbehandlungen zu untersuchen, wurden exponentiell wachsende Zellen vereinzelt, in definierte Zelldichten (100-250 Zellen/ ml) auf 6 cm-Kulturschalen ausgesät und 24 h danach entsprechend behandelt. Nach einer Inkubation von 10-14 Tagen wurde das Medium entfernt, die angehefteten Zellen mit PBS gespült und die Kolonien mit 100 % Methanol für 30 min fixiert. Anschließend wurden die getrockneten Kolonien mit 1,25 % Giemsa/ 0,125 % Kristalviolett gefärbt (20 min) und mit Leitungswasser gespült. Kolonien, die sich mindestens aus 50 Zellen zusammensetz-

ten, wurden gezählt. Die Überlebensraten, unter Berücksichtigung der jeweiligen Plattierungseffizienz, wurden relativ zur unbehandelten Kontrolle berechnet.

2.2.5.2. Annexin V/PI Doppelfärbung

Die Annexin V/ Propidiumiodid (PI)-Doppelfärbung erlaubt eine gleichzeitige Unterscheidung von lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen innerhalb einer Population am Durchflusszytometer. Annexin V bindet Ca^{2+} -abhängig an Phosphatidlyserin (PS) [268]. In vitalen Zellen ist PS entlang der zytosolischen Seite der Plasmamembran lokalisiert. Während der Apoptose verliert PS seine asymmetrische Verteilung an der Phospholipiddoppelschicht und transloziert auf die extrazelluläre Membranseite [269]. Im weiteren Verlauf der Apoptose dient dies der Markierung der entstehenden Zellfragmente für die Phagozytose. Auch während der Nekrose tritt die beschriebene Translokation von PS auf. Im Vergleich zur Apoptose kommt es bereits in einem sehr frühen Stadium zum Zusammenbruch der Plasmamembrankontinuität, wodurch auch nekrotische Zellen im Durchflusszytometer als Annexin V-positiv erscheinen. Eine Differenzierung von apoptotischen und nekrotischen Zellen wird durch die zusätzliche Färbung mit dem Nukleinsäureinterkalator PI (s. Kap. 2.2.4.2) erreicht. In frühen Apoptosestadien gelangt PI aufgrund der noch vorhandenen Membranintegrität nicht ins Zellinnere. Somit werden Populationen, die lediglich eine Annexin V-Einzelfärbung zeigen, als früh-apoptotisch definiert. Das Voranschreiten der Apoptose geht mit dem Verlust der Membranintegrität einher, wobei Annexin V nun auch an zytosolisches PS bindet und PI in das Zellinnere diffundiert. Diese Annexin V- und PI-positiven Zellen werden als spät-apoptotisch bzw. nekrotisch definiert [270].

Nach Ablauf der spezifischen Inkubationszeiten wurden die zu untersuchenden Zellen nebst Überstand geerntet, sedimentiert (5 min, 1500 Upm, RT), einmal mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 1500Upm, RT). Das Pellet wurde in 50 μl 1 x Annexin V-Bindepuffer (Miltenyi Biotec GmbH; Bergisch Gladbach, Deutschland) resuspendiert und nach Zugabe von 2,5 μl Annexin V (FITC-konjugiert; Miltenyi Biotec GmbH; Bergisch Gladbach, Deutschland) für mindestens 20 min inkubiert (auf Eis, lichtgeschützt). Danach wurden die Suspension mit 400 μl Bindepuffer verdünnt, die Nukleinsäuren unmittelbar vor der Messung mittels PI (1 μM Endkonzentration) gefärbt und die Proben im Anschluss am Durchflusszytometer (FACSCanto II, Becton Dickinson; Heidelberg, Deutschland) analysiert. Die

Auswertung erfolgte mittels der BD FACSDiva™ Software, wobei FITC/ PI-negative Zellen als lebend, FITC-positive als apoptotisch und FITC/ PI-doppelt-positive als spät-apoptotisch/ nekrotisch definiert wurden.

2.2.6. Bestimmung der Caspase-Aktivität

Die Bestimmung der Caspase-Aktivierung erfolgte durchflusszytometrisch mittels des CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Markers (Promega; Mannheim, Deutschland). Dieser Marker ist ein fluoreszierendes Analogon des Pan-Caspase-Inhibitors Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl[O-methyl]-fluoromethylketon (Z-VAD-FMK). Der Benzylcarbonyl-Rest (Z-Rest; früher: Carbonbenzoxy-Rest) wurde durch Fluoresceinisothiocyanat substituiert. Im Inneren der Zelle bindet dieser an aktivierte Caspasen und erlaubt somit eine Quantifizierung im Durchflusszytometer.

Nach Ablauf der angegebenen Inkubationszeiten wurden die Zellen nebst Überstand geerntet, sedimentiert (5 min, 1500 Upm, RT), einmal mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 1500Upm, RT). Das Pellet wurde in 500 µl PBS resuspendiert und in 20 µM CaspACE™ FITC-VAD-FMK für mindestens 20 min inkubiert (lichtgeschützt, unter Standardbedingungen). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 70 % Ethanol (s. 2.2.4.2) fixiert. Der RNA-Verdau und die PI-Färbung erfolgten wie beschrieben (s. 2.2.4.2), die Analyse von mindestens 20 000 Zellen am Durchflusszytometer (FACSCanto II; Becton Dickison, Heidelberg, Deutschland) und die Auswertung mittels der BD FACSDiva™ Software.

2.2.7. Homologer Rekombinations Reparatur-Assay

Um die Kapazität von Zellen zu untersuchen, DSBs mittels HRR zu reparieren, wurden LN229-Zellen mit stabil integriertem pDRGFP-Plasmid genutzt (s. Kap. 2.2.3). Dieses Plasmid trägt zwei unfunktionale *GFP*-Gene, wobei eines verkürzt, das andere mit einer Bindestelle für die I-SceI-Endonuklease versehen ist. Nach transienter Transfektion eines I-SceI exprimierendem Plasmids, schneidet die Endonuklease an der vorgesehenen Schnittstelle und induziert somit einen spezifischen DSB. Wird dieser nun mittels HRR und unter Nutzung der Sequenz des

verkürzten *GFP*-Gens repariert, entsteht ein funktionales GFP-Protein. Dieses kann anschließend durchflusszytometrisch quantifiziert werden.

Die Zellen wurden 72 h nach der Transfektion mit pC β AScel (s. Kap. 2.2.3) analysiert. Hierzu wurden die Zellen abgelöst, mit PBS gewaschen und zur Analyse am Durchflusszytometer (FACSCanto II; Becton Dickison, Heidelberg, Deutschland) in 400 μ l PBS resuspendiert. Ausgewertet wurden die Daten mittels der BD FACSDivaTM Software.

2.2.8. Autophagie

Die Untersuchung der Autophagie erfolgte mittels des CYTO-ID[®] Autophagy Detection Kits (ENZO Life Sciences GmbH; Lörrach, Deutschland) am Durchflusszytometer. Die Zellen wurden nach den angegebenen Behandlungs- und Inkubationszeiten geerntet und nach Angaben des Herstellers in Phenolrot-freiem Medium mit dem Zusatz von 5 % FCS unter Standardbedingungen 30 min inkubiert. Ausgewertet wurden die Daten mittels der BD FACSDivaTM Software.

2.2.9. Seneszenz

Die Untersuchung der Seneszenz erfolgte indirekt über die Bestimmung der Seneszenz-assoziierten- β -Galactosidase (SA- β Gal)-Aktivität. Im Speziellen wurde hierbei die Umsetzung eines β -Gal-Substrates bei pH 6 zum einen durchflusszytometrisch (Umsetzung des C₁₂FDG), zum anderen zytochemisch (Umsetzung von X-Gal) analysiert.

2.2.9.1. C₁₂FDG

Für die durchflusszytometrische Bestimmung wurde das β -Gal-Substrat 5-Dodecanoylaminofluorescein-di- β -D-Galactopyranosid (C₁₂FDG) (Thermo Fisher Scientific Inc.; Carlsbad, MA, USA) verwendet. C₁₂FDG fluoresziert nach der spezifischen Spaltung durch die β -Gal grün. Zur Alkalisierung der Lysosomen wurden die Zellen 1 h vor den angegebenen Inkubationszeiten mit 100 nM Bafilomycin A1 in frischem Medium vorbehandelt (37°C, 5 %

CO₂, wasserdampfgesättigt). Nach der Inkubation mit C₁₂FDG (33 µM) für 1 h (lichtgeschützt, 37°C, 5 % CO₂, wasserdampfgesättigt) wurden die Zellen zweimal mit PBS gespült, anschließend von der Kulturschale gelöst und sedimentiert (5 min, 1500 Upm, RT). Das Pellet wurde in 500 µl PBS resuspendiert und umgehend am Durchflusszytometer analysiert. Die Daten wurden mit der BD FACSDivaTM Software ausgewertet, wobei die mittlere Intensität des C₁₂FDG-Signals auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert wurde.

2.2.9.2. X-Gal

Die zytochemische Detektion der SA-β-Gal-Aktivität verlangt die Inkubation fixierter Zellen. Die Zellen wurden auf vorbehandelten Deckgläschen (10 min in Diethylether, 5 min in 100 % EtOH, 5 min in 70 % EtOH, 5 min in dH₂O, 30 min in 1 M HCl und Lagerung in 70 % EtOH) ausgesät, behandelt und nach Herstellerangaben mittels des Senescence β-Galactosidase Cell Staining Kits (Cell Signaling Technology, B. V.; Leiden, Niederlande) fixiert und gefärbt. Als β-Gal-Substrat wurde das chromogene 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) eingesetzt. Die β-Gal hydrolysiert X-Gal zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol, welches anschließend zum tiefblauen 5,5`-Dibrom-4,4`-dichlor-indigo oxidiert. Die Proben wurden anschließend im Hellfeld mikroskopiert und repräsentative Übersichtsbilder festgehalten.

2.2.10. Bestimmung der Interstrang-Crosslinks durch SCGE

Mittels Einzelzellgelelektrophorese (SCGE, engl. *Singel Cell Gel Electrophoresis*, alias *Comet-Assay*) können DNA-Schädigungen in einzelnen Zellen detektiert werden. Erstmals beschrieben wurde dieser damals lediglich zum Nachweis von DSBs eingesetzte *Assay* im Jahr 1984 [271]. Hierzu wurden in Agarose eingebettete Zellkerne lysiert und einem elektrischen Feld ausgesetzt. Während der Elektrophorese wandert die negativ geladene DNA zur Anode. Ist die DNA geschädigt, z. B. durch DSBs, wandern die DNA-Fragmente aus dem Zellkern hinaus, wobei kürzere Fragmente im Vergleich zu größeren Bruchstücken relativ zur Zeit eine größere Strecke zurücklegen. Chromosomale DNA hingegen ist zu sterisch, um als Ganzes im elektrischen Feld zu wandern. Nach Anfärben der DNA erscheinen der Nukleus und die her-

ausgewanderten DNA-Bruchstücke geschädigter Zellen als Schweif und erinnern an Kometen (engl. *Comet*), namensgebend für diese Methode. Die Länge und Intensität dieser Kometen korreliert mit der Menge an DNA-Strangbrüchen.

Der Interstrang-*Crosslink* (ICL) *Comet*-Assay ist eine Modifikation des beschriebenen, klassischen *Comet*-Assays und beruht darauf, dass die Mobilität der durch ionisierende Strahlung (IR, engl. *ionising radiation*) fragmentierten DNA während der Elektrophorese aufgrund der Vernetzung der DNA durch die ICL herabgesetzt wird. Als Referenz dient eine ausschließlich IR ausgesetzte Probe.

Exponentiell wachsende Zellen wurden mit CCNU (50 μ M, 1 h) behandelt und nach 24, 48 oder 72 h geerntet. Nach Resuspension in kaltem PBS (Dichte $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml) wurde die Suspension mit 8 Gy bestrahlt und sofort auf Eis gelagert, um etwaige DNA-Reparaturvorgänge zu verhindern. Anschließend wurden etwa $1,5 \times 10^4$ Zellen in *low melting-point* (LMP)-Agarose (0,5 % in PBS, 37°C) aufgenommen, auf die mit 1,5 % LMP-Agarose beschichteten Objektträger pipettiert, mit einem Deckgläschen bedeckt und zum Aushärten für 5 min im Kühlschrank aufbewahrt. Nach Entfernen des Deckgläschens wurden die eingebetteten Zellen in 2,5 mmol/L NaCl, 100 mmol/L Na₂EDTA, 10 mmol/L Tris-Puffer (pH 10) + 1 % Triton X-100 für 50 min (LN229- und LN308-Zellen) bzw. 60 min (U87MG-Zellen) lysiert. Das Denaturieren der Wasserstoffbrückenbindungen und damit das Entwinden der DNA wurde durch die Inkubation (20 min, 4°C) im stark alkalischen Elektrophoresepuffer (1 mmol/L Na₂EDTA; 0,3 mol/L NaOH (pH 13)) erreicht. Die Elektrophorese erfolgte bei 0,5-5 V/cm und 300 mA für 15 min im Kühlraum (4°C). Anschließend wurden die Präparate 3 x 5 min in 0,4 mol/L Tris-HCl (pH 7,5) neutralisiert, 5 min in 100 % Ethanol fixiert und getrocknet.

Zur Auswertung wurden die Objektträger mit 50 μ l PI (50 μ g/ml) gefärbt und mit 20-facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop (Nikon Microphot-FXA) analysiert. Hierbei wurden pro Probe 50 Zellen mittels der Kinetic imaging Comet v 4.0.2 Software ausgewertet und die sogenannte *Tail-Intensity* (TI) bestimmt.

Die Normalisierung der TI der Kontroll-Zellen (= nur bestrahlt) und die der Zellen, die zuvor mit CCNU behandelt wurden, erlaubt Rückschlüsse auf die relative Menge an ICL.

2.2.11. Bestimmung von Chromosomenaberrationen

Chromosomenaberrationen (CA) sind Anomalien, welche die Anzahl oder die Struktur von Chromosomen eines Genoms betreffen. Grundsätzlich werden numerische von strukturellen CA unterschieden. Numerische CA sind Veränderungen der Anzahl von Chromosomen und werden dementsprechend auch als Genommutationen bezeichnet (z. B. Aneuploidien (Monosomie, Trisomie) und Polyploidien). Strukturelle CA sind Veränderungen, die den Aufbau eines Chromosoms betreffen und somit auch als Chromosomenmutationen definiert werden. Beispiele hierfür sind Inversionen, Deletionen oder auch Translokationen. Diese strukturellen CA können aber auch z. B. durch Mutagene mit klastogenem Potential verursacht werden, weshalb die Bestimmung von CA auch als eine Standardmethode zur Untersuchung der Genotoxizität eines Agens verwendet wird. Zur Chromosomenpräparation wurden die behandelten Zellen in der Metaphase arretiert, hypotonisch behandelt, fixiert und gefärbt. Die Bestimmung der CA erfolgte lichtmikroskopisch.

Exponentiell wachsende Zellen wurden mit CCNU (15 μ M, 1 h) behandelt und für 24 h inkubiert. Anschließend wurde dem Medium zur Arretierung der Zellen in der Metaphase 150 ng/ml Demecolcin zugesetzt. Demecolcin, ein toxisches Alkaloid der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*), ist ein Mitose-Hemmstoff, der die Ausbildung der Spindelfaser inhibiert und somit die Chromosomenteilung am Zentromer verhindert. Nach der Inkubation (14 h) wurden die Zellen durch Abtrypsinieren geerntet, pelletiert (5 min, 1500 Upm, RT), in vorgewärmtem 0,075 M KCl (37°C) resuspendiert und für 10 min inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren (5 min, 1500 Upm, RT) wurden die Zellen in einem eiskalten Ethanol/ Essigsäure-Gemisch (3:1; v/v) fixiert (1 x 15 min, 1 x 30 min; jeweils bei 4°C). Nach dem letzten Fixierschritt wurden die Zellen in 500 μ l Fixierlösung resuspendiert und auf gereinigte, eiskalte Objektträger getropft. Nach erfolgter Lufttrocknung wurden die Objektträger in 5 % Phosphat-gepufferter Giemsa-Lösung gefärbt. Zur Quantifizierung wurden mind. 100 Metaphasen/ Probe analysiert. Als Chromosomenaberration wurden Chromatid-Brüche, Chromatid-Translokationen (triradial, quadrial) und interkalierende Deletionen in die Analyse eingeschlossen. Aufgrund der Varianz des Karyotyps der untersuchten Zelllinien wurde die Frequenz der CA als Aberration/ Chromosom und Aberration/ Metaphase (normalisiert auf die mittlere Anzahl der Chromosomen für 100 Metaphasen der jeweiligen Behandlung)

quantifiziert. Die induzierte CA ergaben sich aus der Differenz der CA der Kombinationsbehandlung und der CA der HRR_i-Behandlung.

2.2.12. Proteinanalysen

2.2.12.1. Proteinextraktion

Zur Proteinextraktion wurde das verbrauchte Medium der adhärennten Kulturen abgenommen und die Zellen mit PSB gewaschen. Suspensionszellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 1500 Upm, RT) gesammelt und ebenfalls in PBS gewaschen und erneut pelletiert. Die Zellen wurden anschließend direkt in der Kulturschale oder als Pellet in 95°C heißem SDS-Probenpuffer (62,5 mM TRIS HCl (pH 6,8), 10 % Glycerin, 5 % β -Mercaptoethanol, 2 % SDS und 0,01 % Bromphenolblau) lysiert. Nach dem Sonifizieren (3 x 10 Schläge bei duty cycle 40 % und output control 4) wurden die Lysate aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde semi-quantitativ ermittelt.

2.2.12.2. *Semi-quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration*

Der relative Proteingehalt der Lysate wurde durch Densitometrie der Ladekontrollen (β -Aktin oder GAPDH) nach erfolgter SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), Westernblotting und Immunodetektion bestimmt. Nach der densitometrischen Bestimmung der Ladekontrollen wurde das Volumen des Lysats so angepasst, dass die Proben eine vergleichbare Menge des Ladeproteins exprimierten. Eine Regulation der verwendeten Ladeproteine durch die Behandlung wurde zuvor durch Westernblotanalysen quantifizierter Proteinextrakte ausgeschlossen.

2.2.12.3. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE erlaubt die Auftrennung von Proteinen gemäß ihrer Größe. Nach der Denaturierung der Lysate bei 95 C (5 min) oder 56°C (5 min) für die Proteindetektion > 200 kDa, wurden 10-40 µl des Extrakts auf das Gel geladen. Nach Anlegen der Spannung konzentrieren sich die Proteine zunächst in einem Sammelgel (126 mM TRIS-HCl (pH 6,8), 4 % Acrylamid/Bisacrylamid, 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,1 % TEMED), bevor diese im Trenngel (375 mM TRIS-HCl (pH 8,8), 5-15 % Acrylamid/Bisacrylamid, 0,1 % SDS, 0,05 % APS, 0,05 % TEMED) elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Die Elektrophorese wurde bei 90-120 V in 1x Laufpuffer (50 µM TRIS, 384 mM Glycin, 0,1 % SDS) bis zur gewünschten Auftrennung durchgeführt. Zur Bestimmung der Proteingröße wurden Proteinmarker (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder bzw. Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder, Thermo Fisher Inc., Waltham, MA, USA) auf das Gel aufgetragen.

2.2.12.4. Immunoblotting

Der Transfer der durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (Protan, Amersham, GE Healthcare, Dassel, Deutschland) erfolgte in Blotting-Puffer (50 mM TRIS, 384 mM Glycin, 20 % Methanol) bei konstanter Stromstärke. In Abhängigkeit der zu detektierenden Proteingröße erfolgte der Transfer bei 300 mA für 1 h bzw. bei 50 mA für 16 h und 4 C für Proteine > 200 kDa. Zur Verifizierung der Transfers wurde die Membran mit PonceauS-Lösung (0,1 % PonceauS, 5 % Essigsäure) für 1 min inkubiert, die überschüssige Lösung entfernt und die Membran in TBS-T (20 mM TRIS-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 0,1 % Tween-20) gespült. Nach vollständiger Entfernung der Färbelösung wurden unspezifische Antikörperbindungen an der Membran durch die Inkubation (1 h) in 5 % BSA oder 5 % fettfreiem Milchpulver in TBS-T blockiert. Die Primäantikörper-Inkubation (s. Tab. 3) erfolgt über Nacht bei 4 C. Ungebundene Antikörperreste wurden durch TBS-T (3 x 5 min, RT) entfernt. Die Membran inkubierte anschließend für 2 h in Dunkelheit und bei RT im entsprechenden Sekundäantikörper (s. Tab. 3). Ungebundene Reste wurden erneut durch Waschen entfernt (3 x 5 min in TBS-T, RT, lichtgeschützt) und die Membran lichtgeschützt getrocknet. Das Fluoreszenzsignal des an einen Infrarot-Farbstoff-gekoppelten Sekundäantikörpers wurde mittels des LI-COR® Odyssey-Systems analysiert und mittels Densitometrie quantifiziert.

Tab. 3 Antikörper für Immunoblotting

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Primäre Antikörper			
β-Aktin (C-20)	Maus	1:1000	Santa Cruz, Dallas (TX), USA
γH2AX ^{Ser139} (JBW301)	Maus	1:1000	Merck/Millipore, Billerica (MA), USA
RAD51 [EPR4030(3)]	Kaninchen	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
PTEN [Y184]	Kaninchen	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
GAPDH (6C5)	Maus	1:1000	Santa Cruz, Dallas (TX), USA
phospho-p53 ^{Ser15} (D4S1H)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
phospho-p53 ^{Ser46}	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
p53 (CC53)	Maus	1:2000	Dianova, Hamburg, Deutschland
Sekundäre Antikörper			
IRDye anti-Maus IgG 800CW	Esel	1:10000	LI-COR®, Lincoln (NE), USA
IRDye anti-Kaninchen IgG 800CW	Esel	1:10000	LI-COR®, Lincoln (NE), USA
IRDye anti-Maus IgG 680CW	Esel	1:10000	LI-COR®, Lincoln (NE), USA
IRDye anti-Kaninchen IgG 680CW	Esel	1:10000	LI-COR®, Lincoln (NE), USA

2.2.12.5. Immunofluoreszenz

Zur Detektion der γH2AX- und RPA-Foci wurden die Zellen auf vorbehandelte Deckgläschen (10 min in Diethylether, 5 min in 100 % EtOH, 5 min in 70 % EtOH, 5 min in dH₂O, 30 min in 1 M HCl und Lagerung in 70 % EtOH) ausgesät. Nach Behandlung und entsprechender Inkubationszeiten wurde das verbrauchte Medium entfernt, die Zellen 1x mit PBS gespült und für 15 min in 4 % Formaldehyd in PBS bei RT fixiert. Die Deckgläser wurden in PSB gewaschen (3 x 5 min), mit eiskaltem 100 % Methanol überschichtet und 10 min bei -20°C permeabilisiert. Nach der Re-Hydrierung in PBS (3 x 5 min) wurden unspezifische Antikörperbindungen durch Blockieren in 10 % NGS (10 NGS in PBS/ 0,3 % Triton-X-100; 1 h, RT) verhindert. Der γ-H2AX- bzw. RPA-Antikörper wurden 1:1000 in PBS/ 0,3 % Triton-X-100 verdünnt und die Zellen direkt auf dem Deckgläschen inkubiert (über Nacht, 4°C). Ungebundene Antikörperreste wurden auch hier durch Waschen in PBS entfernt (3 x 5 min), die Sekundärantikörper-Inkubation erfolgte lichtgeschützt entsprechend dem Primärantikörper mit anti-Maus oder

anti-Kaninchen Alexa Fluor®488 gekoppelten Antikörpern (LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA) für 1 h bei RT. Nach erneuter Entfernung der ungebundenen Reste (3 x 5 min PBS) wurden die Zellkerne für 15 min mit TO-PRO®-3 (1 µM in PBS) gefärbt, 1x mit PBS gespült, in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) eingedeckelt und mit Nagellack verschlossen. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte am konfokalen LSM 710. Wurden die Präparate am Methaper ausgewertet, wurde auf die Kernfärbung mit TO-PRO®-3 verzichtet und die Proben in Vectashield mit DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) eingedeckelt. Die Foci wurden mittels ImageJ und dem BIC Macro Toolkit (Bioimaging Center, Universität Konstanz, Deutschland) quantifiziert.

Tab. 4 Antikörper für Immunfluoreszenzanalysen

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Primäre Antikörper			
γH2AX ^{Ser139} (JBW301)	Maus	1:1000	Merck/Millipore, Billerica (MA), USA
RPA32/RPA2 [9H8]	Maus	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
Click-iT™ EdU		n. Hersteller	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
Alexa 488 Imaging Kit			

2.2.13. Xenograft-Experimente

Zur Untersuchung der therapeutischen Relevanz wurden die Behandlungsansätze in einem Xenograft-Mausmodell analysiert. Die vom LUA Rheinland-Pfalz genehmigten Tierversuche wurden gemäß der FELASA-Richtlinien und Vorgaben des Tierschutzgesetzes von geschultem Personal durchgeführt.

Athymische Nacktmäuse des Stammes BALB/c nu/nu wurden kommerziell (Charles River Laboratories, Wilmington (MA), USA; Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) erworben und in einer spezifisch Pathogen-freien Umgebung im 12-Stunden Tag-/Nachtrhythmus bei einer Temperatur von 26°C gehalten. Artgerechtes Futter und Wasser stand *ad libitum* zur Verfügung.

Für die Tierexperimente wurden ausschließlich gesunde Tiere mit einem Ausgangsgewicht von ≥ 20 g verwendet. Die Tumorzellen (5×10^6 LN229-Zellen oder $2,5 \times 10^6$ U87MG-Zellen) wurden in 100 µl PBS resuspendiert und subkutan in die dorsalen Flanken der Tiere injiziert. Sobald die Tumore eine Ausgangsgröße von 50-100 mm³ erreicht hatten, begann die Thera-

pie. Die Tiere wurden in Behandlungsgruppen von mind. 5 Tieren eingeteilt: 1) die Kontrollgruppe, die alle Lösungsmittel der verabreichten Medikamente erhält; 2) die Zytostatika-Gruppe, die das Zytostatikum (TMZ oder CCNU) und das entsprechende Lösungsmittel des Kombinationspräparats erhält; 3) ART oder RI-1, diese Gruppe erhält zusätzlich auch das Lösungsmittel des entsprechenden Zytostatikums; 4) Kombinationsgruppe (TMZ/ART oder CCNU/RI-1).

Um den Einfluss von ART auf die TMZ-basierte Chemotherapie zu untersuchen, wurde zunächst TMZ (200 mg/ kg KG) i.p. appliziert. Die Kontroll- und anderen Behandlungsgruppen erhielten das entsprechende Lösungsmittel. Einen Tag nach der TMZ-Gabe folgte die Behandlung mit ART. Das Antimalariamedikament wurde kontinuierlich oral mit dem Trinkwasser verabreicht. Hierzu wurde eine 1 mg/ ml ART-Trinklösung (in Ethanol und 0,2 % Saccharose in sterilem H₂O gelöst) hergestellt. Das Trinkwasser wurde pro Tier und Tag auf 5 ml limitiert. Die Kontroll- und anderen Behandlungsgruppen erhielten das gleiche Trinkwasser ohne den Zusatz von ART. Auch diese Trinkwassermenge war entsprechend limitiert.

Um den Einfluss der RAD51-Hemmung auf die CCNU-vermittelte Tumorprogression zu untersuchen, wurde ebenfalls zunächst das Zytostatikum verabreicht. Im LN229-Xenograft wurden 12,5 mg/ kg KG, im U87MG-Xenograft CCNU i.p. appliziert. Die Kontroll- und anderen Behandlungsgruppen erhielten das entsprechende Lösungsmittel. Der Inhibitor RI-1 wurde 1 h nach CCNU ebenfalls i.p. injiziert (1 mg/kg KG). Auch hier erhielten die Kontroll- und anderen Behandlungsgruppen das entsprechende Lösungsmittel.

Der Gesundheitszustand, das Gewicht der Tiere sowie die Tumorgrößen wurden mind. 2-mal pro Woche überprüft. Das Tumolvolumen (V_t) wurde gemäß der Formel $V_t=L \times B \times 0,5 B$ (L=Länge, B=Breite) errechnet. Die Tumorgröße und das Gewicht wurden jeweils auf die Ausgangswerte normalisiert. Entsprechend der Abbruchkriterien (schlechter Gesundheitszustand, Gewichtsverlust von mehr als 15 %, Tumolvolumen überschreitet 1000 mm³) wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet.

3. ERGEBNISSE

Das Glioblastom (GB) weist eine hohe Radio- und Chemoresistenz auf, was die Behandlung dieser Krebserkrankung vor enorme Herausforderungen stellt. Die gegenwärtige GB-Therapie beinhaltet, neben der Resektion des Tumors, eine meist kombinierte Radio- und Chemotherapie. Trotz dieser radikalen Behandlungsstrategie bleibt die Prognose für den Patienten bei einem medianen Überleben von 14,6 Monaten [11] miserabel und erfordert dringend eine Optimierung des Therapieansprechens. Als Chemotherapeutika werden u. a. die alkylierende Agenzien TMZ und CCNU eingesetzt, deren Wirkmechanismen bereits sehr gut charakterisiert sind (Kapitel 1.2.1 und 1.2.2). Neben letalen DNA-Schädigungen und daraus resultierender Aktivierung der Apoptose induzieren TMZ und CCNU jedoch auch DNA-Reparatur- (Kapitel 1.3.1) und andere Überlebensmechanismen (Kapitel 1.3.2) wie z. B. Autophagie und Seneszenz, was eine kurative Behandlung des GB maßgebend erschwert. Neue Therapieansätze fokussieren daher Kombinationstherapien, die z. B. das Entstehen Therapie-induzierter Resistenzen verhindern sollen, oder eine gezielte Inhibition spezifischer Überlebens-Signalwege.

In den folgenden Kapiteln wurden Beispiele beider Behandlungs-Strategien analysiert: Im ersten Teil wurden die Effekte des Antimalaria-Mittels ART auf die TMZ-induzierte Sensitivierung von Glioblastomzellen und Gliom-stammzellähnlichen Zellen (engl. *glioma stem-like cells*, GSCs) untersucht und somit ein kombiniertes Regime verfolgt. Im zweiten Teil lag der Schwerpunkt auf einer gezielten Inhibition der homologen Rekombination-Reparatur, einem DSB-Reparaturmechanismus. Die Effektivität dieses Behandlungsansatzes wurde *in vitro* und *in vivo* nach Induktion von DSBs durch CCNU untersucht.

3.1. Einfluss des Antimalariamittels Artesunat auf die Temozolomid-induzierte Sensitivität in Glioblastomzelllinien

3.1.1. Charakterisierung des *in vitro*-Modells

In folgenden *in vitro*-Untersuchungen wurden die p53-Wildtyp Glioblastomzelllinien LN229, A172 und U87MG, sowie die GSC G112SP-Zellen verwendet. Die Glioblastomzellen wurden adhärent kultiviert, die G112SP-Zellen als Suspensionskultur, die das Ausbilden von Sphären ermöglichte [261]. Repräsentative Lichtmikroskopaufnahmen des jeweiligen unbehandelten Phänotyps sind in Abb. 12 A dargestellt. Wie eingangs beschrieben, induzieren alkylierende Agenzien DNA-Läsionen, die während der Replikation zu DSBs translatiert werden. Das Reparaturenzym MGMT (Kapitel 1.3.1.1.2) entfernt diese initialen Läsionen und minimiert so die Entstehung letaler DSBs. Um diesen Effekt auszuschließen, wurden in folgenden Untersuchungen lediglich Zelllinien verwendet, die gesichert keine MGMT-Aktivität aufweisen [272, 273].

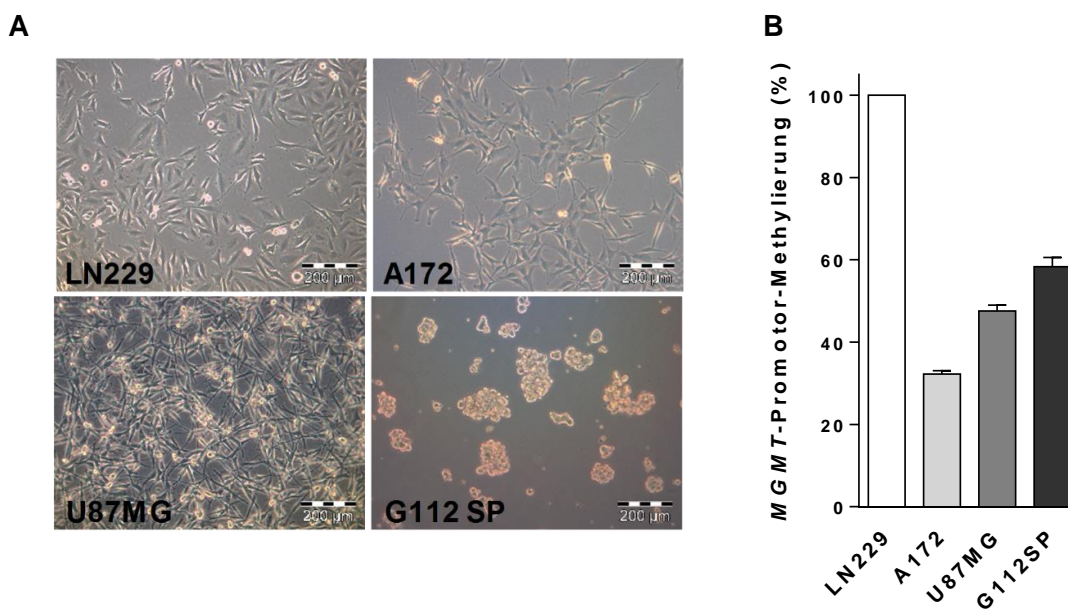


Abb. 12 Morphologie und MGMT-Promotor-Methylierungsstatus. Lichtmikroskopische Aufnahmen (10-fache Vergrößerung) der Glioblastomzelllinien LN229, A172 und U87MG, sowie der GSC G112SP-Zellen (A). Der Messbalken entspricht 200 μm . Der Methylierungsstatus des MGMT-Promotors wurde mittels HRM ([272]) untersucht (B).

Zur Bestätigung dieser Angaben wurden mittels HRM (*High resolution melt*) der Methylierungsstatus des *MGMT*-Promotors der verwendeten Zelllinien analysiert (Abb. 12 B). LN229-Zellen zeigen eine komplette Methylierung des *MGMT*-Promotors, der der A172- und U87MG-Zellen ist zu 32 bzw. 48 % methyliert. G112SP-Zellen weisen eine 58%-ige Promotormethylierung auf. Da bereits eine Promotormethylierung von > 20 % ausreicht, um die Expression des *MGMT*-Proteins zu verhindern [273], konnte auf eine zusätzliche pharmakologische Inhibition des Proteins im untersuchten Zellsystem verzichtet werden.

3.1.2. Untersuchung der Sensitivität von Glioblastomzellen gegenüber Temozolomid und Artesunat

Um zunächst den Einfluss der Einzelbehandlung mit dem alkylierenden Chemotherapeutikum TMZ und dem Antimalaria-Mittel ART auf das Zellsystem zu testen, wurde in Koloniebildungstests das Überleben der Glioblastomzelllinien LN229, A172 und U87MG jeweils konzentrationsabhängig untersucht (Abb. 13).

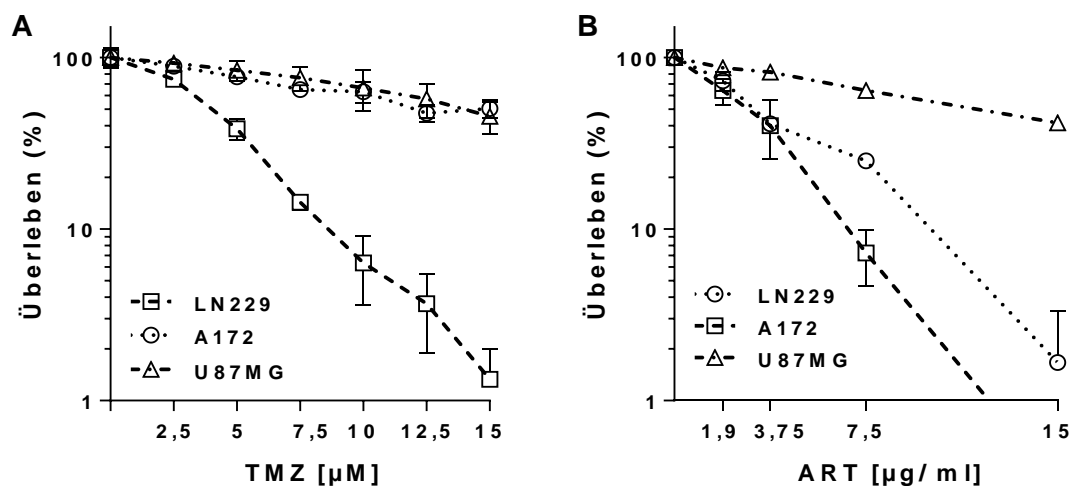


Abb. 13 Einfluss von TMZ und ART auf die Überlebensraten der Glioblastomzellen LN229, A172 und U87MG. Semi-logarithmisch dargestellt sind die mittels Koloniebildungstests ermittelten Überlebensraten nach Behandlung mit TMZ (**A**) oder ART (**B**) in aufsteigender Konzentration. Die Überlebensrate wurde auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten.

Hierfür wurden die mittleren Überlebensraten nach der Behandlung mit TMZ (Abb. 13 A) oder ART (Abb. 13 B) auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert und semi-logarithmisch gegen die Konzentration aufgetragen. Alle untersuchten Zelllinien zeigten sowohl für TMZ als auch ART eine konzentrationsabhängige Sensitivierung bzw. eine Abnahme der Überlebensrate. Der Vergleich der Zelllinien untereinander zeigte, dass die LN229-Zellen gegenüber TMZ am empfindlichsten reagierten. Bereits nach der Behandlung mit einer Dosis von 7,5 μM TMZ überlebten im Mittel lediglich 15 %. Die A172- und U87MG-Zellen waren vergleichbar resistent gegenüber TMZ und zeigten selbst nach Behandlung mit höheren TMZ-Konzentrationen (10-15 μM) Überlebensraten von 60-50 % (A172) und 66-45 % (U87MG). Das Potential zur Koloniebildung nach der ART-Behandlung differierte. Auch hier zeigte sich, dass U87MG-Zellen zu den resistenteren Zelllinien der untersuchten Glioblastomlinien zählt. Nach Behandlung mit 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ART überlebten 42 % der U87MG-Zellen. LN229-Zellen reagierten mit einer mittleren Empfindlichkeit gegenüber ART (ca. 25 % nach 7,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ART) und A172-Zellen zeigten bereits bei einer Konzentration von 3,75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eine mittlere Überlebensrate von 40 %, lediglich 7 % nach 7,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ART. Zusammenfassend zeigen U87MG-Zellen ein sehr schwaches Ansprechen auf sowohl TMZ als auch ART, LN229-Zellen reagieren im Vergleich am sensitivsten auf die TMZ-, A172-Zellen auf die ART-Behandlung.

3.1.3. ART verbessert den TMZ-induzierten Zelltod

Glioblastomzellen reagieren auf eine TMZ-Behandlung durch die Induktion von Apoptose. Dieses Zellschicksal wurde als ein spätes Ereignis (72 h nach Behandlung und später) beobachtet [274] und mit dem Prozessieren des O^6 -MeG-Addukts erklärt (Kapitel 1.2.1). In Koloniebildungstests wurde zum einen das klonogene Überleben der Glioblastomzellen nach Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung mit TMZ und/ oder ART verglichen, zum anderen - analog dazu - der Zelltod bestimmt. Die Ergebnisse der Überlebensuntersuchungen sind für LN229- (Abb. 14), A172- (Abb. 15) und U87MG-Zellen (Abb. 16) in den folgenden Abbildungen dargestellt. Zur Untersuchung der LN229- und A172-Zellen wurden, entsprechend dem Vorversuch (Abb. 13), geringere TMZ-Konzentrationen (2,5–5 μM) gewählt, während U87MG-Zellen mit 10-12,5 μM des Alkylanz behandelt wurden.

Die ART-Behandlung erfolgte in Dosen von 3,75 und 7,5 µg/ml. LN229-Zellen bestätigen auch in diesem Experiment ein konzentrationsabhängiges Ansprechen auf TMZ und ART. Wurden LN229-Zellen mit der geringeren TMZ-Konzentration behandelt, überlebten im Mittel 71 % (Abb. 14 A und B, dunkelgrauer Balken), während nach der Applikation von 5 µM TMZ noch etwa die Hälfte (54 %) überlebte (Abb. 14 C und D, dunkelgrauer Balken). Die ART-Behandlung minderte in geringer Konzentration das klonogene Überleben um ebenfalls die Hälfte (53 % Überleben, Abb. 14 A und C, hellgrauer Balken), die Konzentrationsverdopplung setzte die Überlebensraten auf 26 % herab (Abb. 14 B und D, hellgrauer Balken).

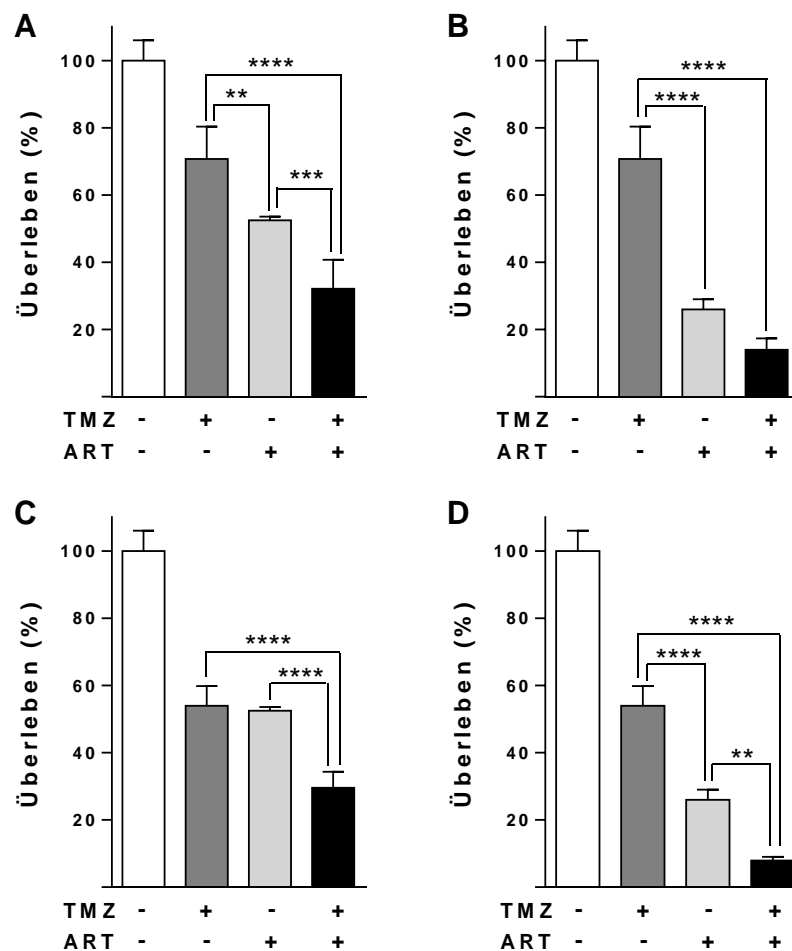


Abb. 14 Koloniebildungstest mit LN229-Zellen nach kombinierter TMZ- und ART-Behandlung. Dargestellt ist die mittlere Überlebensrate nach der Behandlung mit TMZ (2,5 µM (A) und (B) oder 5 µM (C) und (D)), ART (3,75 µg/ml (A) und (C) oder 7,5 µg/ml (B) und (D)) oder der entsprechenden Kombinationsbehandlung. Die Überlebensrate wurde auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Angegeben sind die Mittelwerte +/- SD aus drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels einfaktorieller ANOVA und dem Post-hoc-Test nach Šidák berechnet: ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

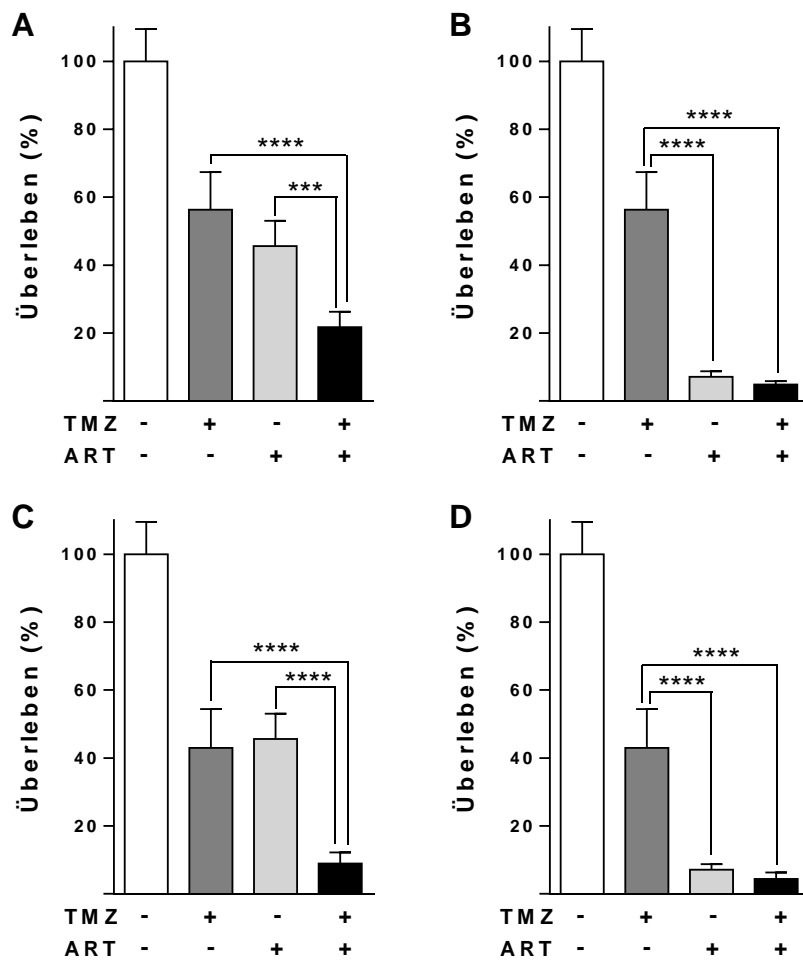


Abb. 15 Koloniebildungstest mit A172-Zellen nach kombinierter TMZ- und ART-Behandlung. Dargestellt ist die mittlere Überlebensrate nach der Behandlung mit TMZ (2,5 μ M (A) und (B)) oder 5 μ M (C) und (D)), ART (3,75 μ g/ml (A) und (C) oder 7,5 μ g/ml (B) und (D)) oder der entsprechenden Kombinationsbehandlung. Die Überlebensrate wurde auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels einfaktorier ANOVA und dem Post-hoc-Test nach Šidák berechnet: *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

Auch die Kombinationsbehandlung von TMZ und ART bedingte einen signifikanten Unterschied der mittleren Überlebensraten im Vergleich zur TMZ-Einzelbehandlung. Wurde TMZ mit ART kombiniert, überlebten lediglich noch etwa 30 bzw. 32 % der LN229-Zellen (Abb. 14 A und C, schwarze Balken). Wurde hierbei die ART-Konzentration erhöht, verminderte sich das Zellüberleben nochmals auf 14 bzw. 8 % (Abb. 14 B und C, schwarze Balken). Vergleichbares war auch für die A172-Zellen (Abb. 15) zu beobachten. Wie erwartet, reagierten auch die A172-Zellen konzentrationsabhängig auf die Behandlung mit TMZ und ART. Wurden diese mit 2,5 μ M TMZ behandelt, überlebten etwa 56 % der Zellen (Abb. 15 A und B, dunkelgraue Balken), während bei der Behandlung mit 5 μ M TMZ lediglich noch 43 % der

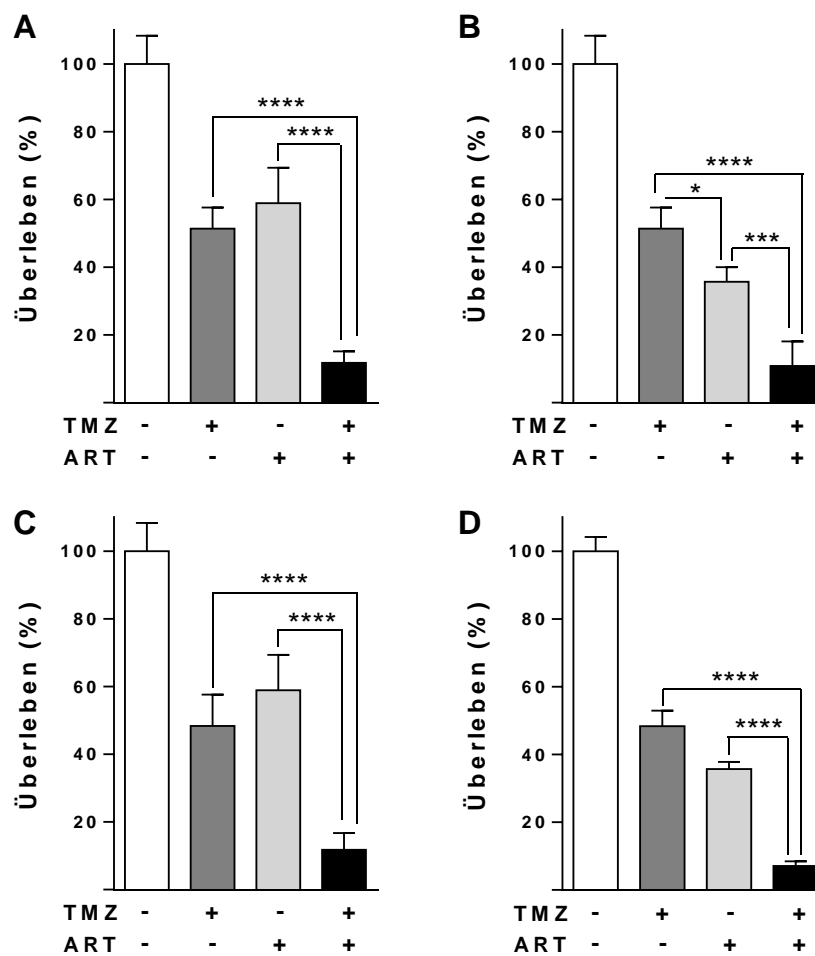


Abb. 16 Koloniebildungstest mit U87MG-Zellen nach kombinierter TMZ- und ART-Behandlung. Dargestellt ist die mittlere Überlebensrate nach der Behandlung mit TMZ (10 μ M (A) und (B)) oder 12,5 μ M (C) und (D)), ART (3,75 μ g/ml (A) und (C) oder 7,5 μ g/ml (B) und (D)) oder der entsprechenden Kombinationsbehandlung. Die Überlebensrate wurde auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Angegeben sind die Mittelwerte +/- SD aus drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels einfaktorieller ANOVA und dem Post-hoc-Test nach Šidák berechnet: * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

Zellen in der Lage waren, Kolonien zu bilden (Abb. 15 C und D, dunkelgraue Balken). Nach Behandlung mit 3,75 μ g/ml ART lag die Überlebensrate bei 46 % (Abb. 15 A und C, hellgraue Balken), nach der verdoppelten Dosis bei 7,2 % (Abb. 15 B und D, hellgraue Balken). Wurde auch hier die TMZ-Behandlung mit ART kombiniert, war eine signifikante Reduktion des Zellüberlebens zu beobachten. Die geringere ART-Konzentration senkte die Überlebensrate auf 22 % bzw. 9 % (Abb. 15 A und C, schwarze Balken), die höhere auf 4,8 % bzw. 4,4 % (Abb. 15 B und D, schwarze Balken).

Im Vergleich zu den LN229- und A172-Zellen waren U87MG-Zellen, wie erwartet, resistenter gegenüber TMZ als auch ART. Trotz der erhöhten TMZ-Dosis von 10 bzw. 12,5 μ M überleb-

ten zwischen 51 und 48,3 % der behandelten U87MG-Population (Abb. 16, dunkelgrauen Balken).

Wurden die Zellen mit ART behandelt, besaßen noch 59 % der Zellen die Fähigkeit, Kolonien auszubilden (Abb. 16 A und C, hellgraue Balken). Nach der Behandlung mit 7,5 µg/ml ART konnte dies nur noch etwa ein Drittel (Abb. 16 B und D, hellgraue Balken). Im kombinierten Behandlungsansatz sank die Überlebensrate signifikant auf etwa 12 bis 7 % (schwarze Balken).

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die Kombinationsbehandlung mit ART in den untersuchten LN229-, A172- sowie den im Vergleich resistenteren U87MG-Zellen den TMZ-induzierten reproduktiven Zelltod signifikant verstärkt.

Zusätzliche Zelltodanalysen, die zwischen Apoptose und Nekrose unterscheiden, bestätigten dies. Hierzu wurden LN229-, A172- und U87MG-Zellen, sowie die GSC G112SP-Zellen 144 h nach Behandlung untersucht. Anzumerken ist, dass die ART-Behandlung (15 µg/ml), wie in Abb. 9 beschrieben, 72 h nach der TMZ-Behandlung (50 µM; G112SP-Zellen: 2 µM) erfolgte. Bereits morphologisch waren Unterschiede zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle der einzelnen Linien zu erkennen (Abb. 17).

Die TMZ-Einzelbehandlung verursachte neben einer Granularisierung der Zellen auch eine deutliche Vergrößerung des Zellvolumens. Des Weiteren erschienen die Glioblastomzellen abgeflacht. Auch die Oberflächenstruktur der G112SP-Zellen wirkte granulärer, was ggf. das augenscheinliche Verklumpen der Zellen nach der TMZ-Behandlung erklären könnte.

Im Gegensatz dazu führte die ART-Behandlung zu einer Abnahme des Zellvolumens. Die Granularität der Zellen nahm auch hier zu. Die LN229-Zellen zeigten eine Verkürzung der Ausläufer, während sich diese Strukturen der A172-Zellen schmaler und dünner präsentierten. In G112SP-Zellen induzierte die ART-Behandlung ein Auflösen und Vereinzeln der Sphären. Interessanterweise waren diese Behandlungs-vermittelte Veränderungen bei den U87MG-Zellen nur bedingt zu beobachten. Lediglich die TMZ-Applikation sorgte für die beschriebene Zunahme des Zellvolumens. Insgesamt war jedoch die Reduktion der Zellzahl auffällig. Besonders ausgeprägt war dies nach der kombinierten Behandlung mit TMZ und ART.

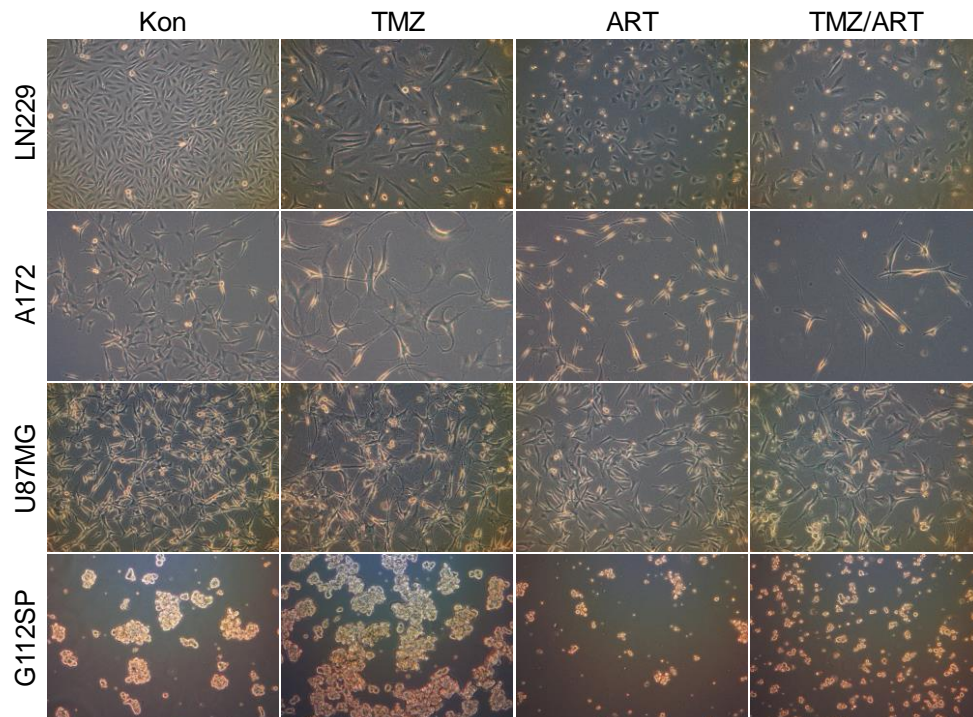


Abb. 17 Morphologie der Glioblastom- und Glioblastom-Stammzellähnlichen Zellen nach Behandlung. Lichtmikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung: 10x) der LN229-, A172, U87MG- und G112SP-Zellen 144 h nach Behandlung mit TMZ (50 μ M, G112SP: 2 μ M) und/oder ART (15 μ g/ml). Die ART-Behandlung erfolgte 72 h nach der TMZ-Gabe.

Um diese Beobachtungen zu quantifizieren, wurden die Zellen mittels Annexin V/PI angefärbt und der Zelltod durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 18). Angegeben ist hierbei der mittlere induzierte Zelltod, die Summe aus Apoptose (hellgrau) und Nekrose (straffiert). Erneut zeigte sich in allen untersuchten Zelllinien eine signifikante Sensitivierung gegenüber TMZ durch die Nachbehandlung mit ART. Im Vergleich zur TMZ-Einzelbehandlung stieg der Zelltod der LN229-Zellen (Abb. 18 A) nach der Kombination mit ART von 30 auf 52 %. In A172-Zellen (Abb. 18 B) erhöhte sich die Sterberate von 5 auf 31 %, in U87MG-Zellen (Abb. 18 C) von 9 auf 17 %. Auch die stammzellähnlichen G112SP-Zellen (Abb. 18 D), die bereits sehr sensitiv gegenüber einer TMZ-Einzelbehandlung mit lediglich 2 μ M reagierten, waren durch die Nachbehandlung noch empfindlicher (9 auf 21 %). Die Zunahme des Zelltods beschränkte sich hierbei allerdings auf die Erhöhung der Nekrosefrequenz. Insgesamt war jedoch zu beobachten, dass die Verstärkung des Zelltods vor allem auf die Steigerung der Apoptosefraktion zurückzuführen ist. Lediglich die LN229-Zellen zeigten insgesamt eine im Vergleich leicht erhöhte Nekrosefrequenz.

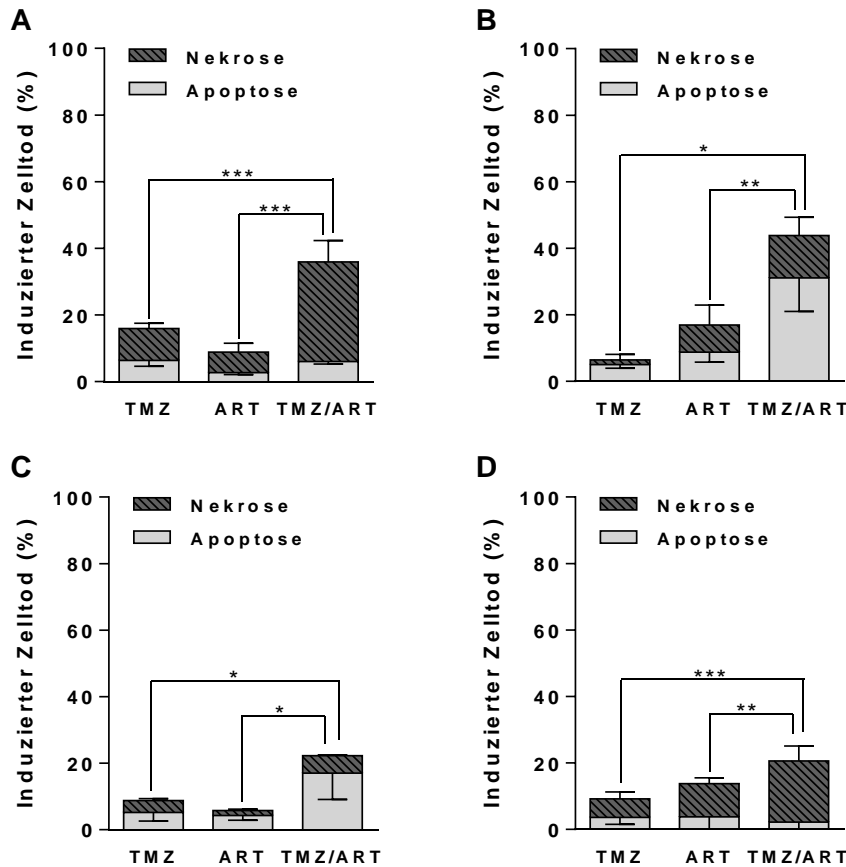


Abb. 18 Einfluss der ART-Nachbehandlung auf den TMZ-induzierten Zelltod in Glioblastomzellen und stammzellähnlichen Gliomen. Mittels Annexin V/ PI-Färbung wurden Apoptose- (hellgrau) und Nekrosefrequenz (schraffiert) durchflusszytometrisch 144 h nach der Behandlung mit TMZ (50 μ M; für GP112: 2 μ M) und/ oder ART (15 μ g/ ml) bestimmt. Die ART-Behandlung erfolgte 72 h nach der TMZ-Applikation. Dargestellt ist der induzierte Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose) für LN229- (A), A172- (B), U87MG- (C) und G112SP-Zellen (D). Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus mind. drei unabhängigen Experimenten, Signifikanzanalyse mittels einfaktorieller ANOVA und dem Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest nach Šidák: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Eine weitere Bestätigung der Zelltodanalysen lieferten die mittels Trypanblau-Färbung bestimmten Vitalitätsuntersuchungen (Abb. 19). Hierzu wurden für die LN229- (Abb. 19 A), die A172-(Abb. 19 B) und die U87MG-Zellen (Abb. 19 C) zum Zeitpunkt $t=-24$ h eine definierte Zellzahl ausgesät, zum Zeitpunkt $t=0$ mit TMZ (50 μ M, roter Pfeil) und zum Zeitpunkt $t=72$ h mit ART (15 μ g/ ml, blauer Pfeil) behandelt. Im Abstand von 24 h wurden die einzelnen Proben geerntet, mit Trypanblau gefärbt und die Gesamtzahl der vitalen Zellen bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Die so erstellten Wachstumskurven geben nicht nur Aufschluss über die Verdopplungszeiten der jeweiligen Zelllinie, sondern eben auch über die Zellvitalität nach der entsprechenden Behandlung. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (schwarz)

war in allen Zelllinien zu beobachten, dass bereits die TMZ-Einzelbehandlung ein Ansteigen der Zellzahl, sprich die Proliferation, verhindert. Anders interpretiert, TMZ beeinflusst die Membranintegrität proliferierender Zellen, Trypanblau dringt ins Zellinnere und die Zellen werden als tot definiert. Die Kombination mit ART lieferte keinen weiteren detektierbaren Effekt. Interessant war auch der Verlauf der ART-behandelten Proben. Neben der erhöhten ROS-Produktion ist ART auch für seinen anti-proliferativen Einfluss bekannt. Bei der Betrachtung der ART-Kurven (blau) fiel auf, dass die eingesetzte Konzentration im Vergleich zur un-behandelten Kontrolle in A172-Zellen kaum einen Einfluss auf die Wachstumsrate hatte. Die Gesamtzellzahl der LN229- und U87MG-Zellen nahm hingegen bereits 24 h bzw. 48 h nach ART-Behandlung leicht ab. Allerdings könnte dies auch mit der Induktion von Zelltodereignissen assoziiert sein.

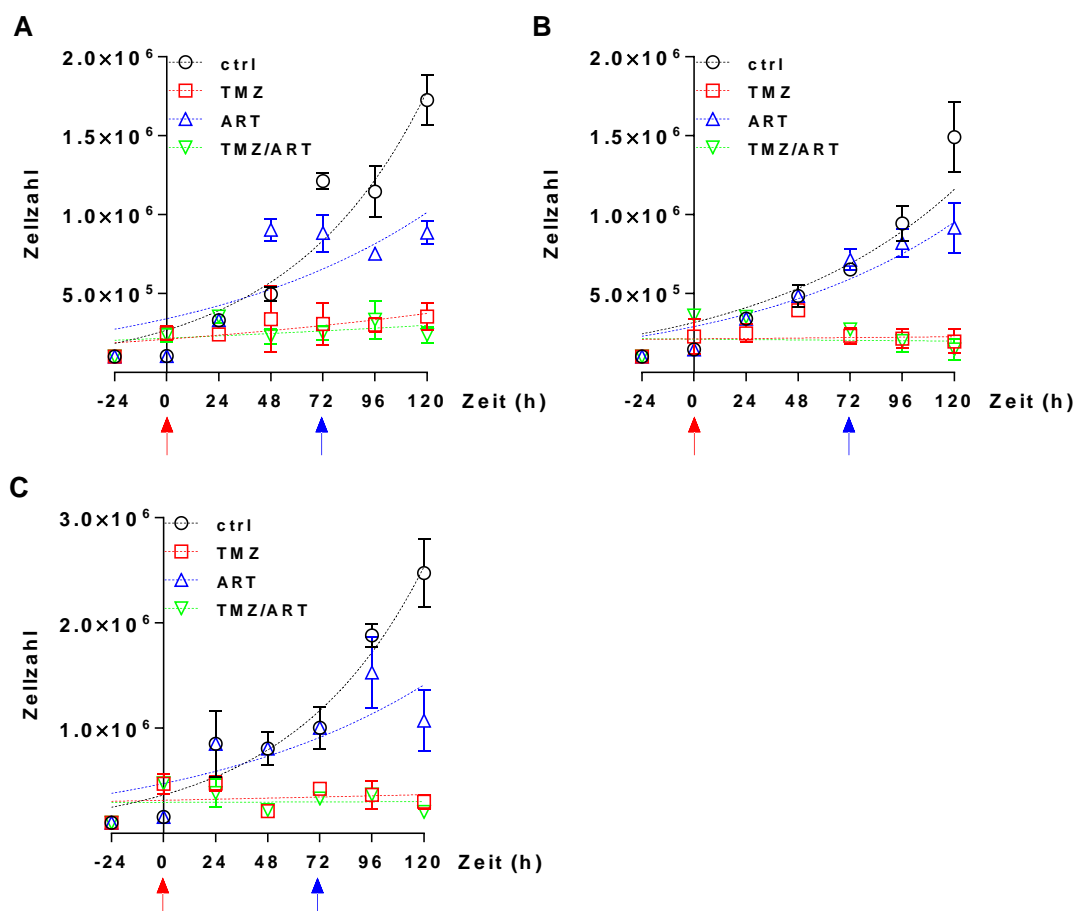


Abb. 19 Wachstumskurven der Glioblastomzelllinien nach Behandlung mit TMZ und/ oder ART. Mittels Trypanblau-Färbung und anschließender Zellzählung wurden die Anzahl vitaler Zellen der Kontroll- und Behandlungsgruppen über die Zeit bestimmt. Die TMZ-Behandlung ($50 \mu\text{M}$) erfolgte zum Zeitpunkt $t=0$ (roter Pfeil), die ART-Behandlung ($15 \mu\text{g/ml}$) zum Zeitpunkt $t=72$ h (blauer Pfeil). Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus mind. drei unabhängigen Experimenten für LN229- (A), A172- (B) und U87MG-Zellen (C).

3.1.4. Untersuchung der Zellzyklusverteilung nach kombinierter TMZ/ ART-Behandlung

Um zu klären, weshalb ART den TMZ-induzierten Zelltod in Glioblastomzellen signifikant steigert, wurde zunächst der Einfluss von ART auf den Zellzyklus zeitabhängig überprüft. Hierzu wurden LN229-, A172- und U87MG-Zellen analog zu den vorangegangenen Experimenten mit TMZ und/ oder ART behandelt, fixiert und der Zellzyklus mittels PI-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen (Abb. 20- Abb. 22) visualisiert. Dargestellt sind jeweils repräsentative Histogramme (Teilabb. A), sowie die entsprechende Quantifizierung der Zellzyklusphasen (Teilabb. B). Wurden LN229-Zellen (Abb. 20) mit ART behandelt, war im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine signifikante Abnahme der S-Phasen-Population zu beobachten. Dieser Unterschied war bereits 24 h nach ART-Zugabe (entspricht dem Zeitpunkt $t=96$ h) sichtbar und blieb über den untersuchten Zeitraum (48-72 h, respektive $t=120$ und $t=144$ h) erhalten. Bei der Betrachtung der Zellzyklusverteilung nach der TMZ-Behandlung fiel auf, dass sich die untersuchte Population in Richtung der G2-Phase signifikant verschob. Dieser Effekt war im Vergleich dazu noch ausgeprägter in den mit ART nachbehandelten LN229-Zellen. Über die Zeit (96-144 h) nahm der Anteil der G2-Phase-Zellen zu, der Anteil der S-Phase-Population ab.

Werden hingegen A172-Zellen (Abb. 21) mit ART behandelt, war über den untersuchten Zeitraum keine signifikante Änderung des Zellzyklus im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Auffällig war allerdings, dass die unbehandelte Kontrolle bereits einen sehr großen Anteil (75 %) an G1-Phase-Zellen aufwies. Wie erwartet vergrößerte die TMZ-Behandlung wiederum, verglichen mit der Kontrolle, den Anteil der G2-Population. Eine Nachbehandlung mit ART hatte jedoch keinen weiteren Einfluss auf die einzelnen Zellzyklusphasen 120 bzw. 144 h nach Behandlung, wobei 24 h nach der ART-Applikation ($t=96$ h) ein signifikanter Anstieg der G1-Phase zu beobachten war. Auch die Zellzyklusanalyse der TMZ-behandelten U87MG-Zellen (Abb. 22) entsprach den Erwartungen. Verglichen mit den unbehandelten Kontrollen nahm der Anteil der G2-Phasen-Population über den untersuchten Zeitraum zu, während sich die Anzahl der S-Phase-Zellen verringerte. Die Nachbehandlung mit ART hatte darauf keinen Einfluss. Eine signifikante Abnahme der S-Phase-Fraktion wurde jedoch nach 24 und 48 h (respektive $t=96$ h und $t=120$ h) nach der Einzelbehandlung mit ART beobachtet.

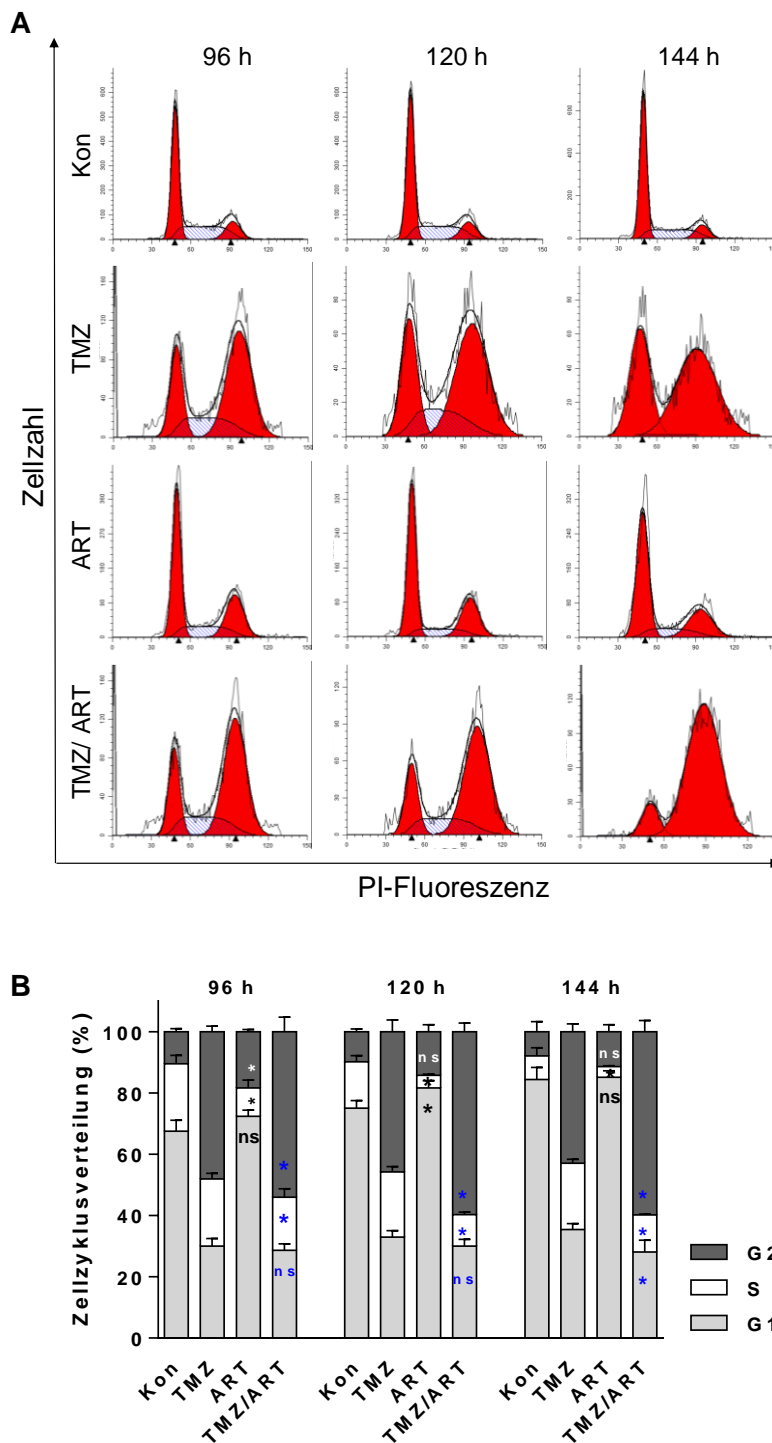


Abb. 20 Zellzyklusverteilung der LN229-Zellen nach TMZ- und/ oder ART-Behandlung. Mittels PI-Färbung wurde der DNA-Gehalt durchflusszytometrisch nach der Behandlung mit TMZ (50 μ M) und/ oder ART (15 μ g/ml) bestimmt. Die ART-Behandlung erfolgte 72 h nach der TMZ-Applikation. Dargestellt sind die Histogramme der Kontrollen (Kon) und Behandlungen nach 96 h-144 h (**A**) und die entsprechende Quantifizierung der G1-, S- und G2-Phasen (**B**). Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus mind. drei unabhängigen Experimenten, die Signifikanz wurde mittels einfaktorierler ANOVA und dem Post-hoc-Test nach Šidák berechnet. Schwarz=Kon vs. ART; blau: TMZ vs. TMZ/ART. *=signifikant, mind. $p \leq 0,05$, ns=nicht signifikant. Exakte statistischen Analyse: siehe Tab. 1 (Anhang).

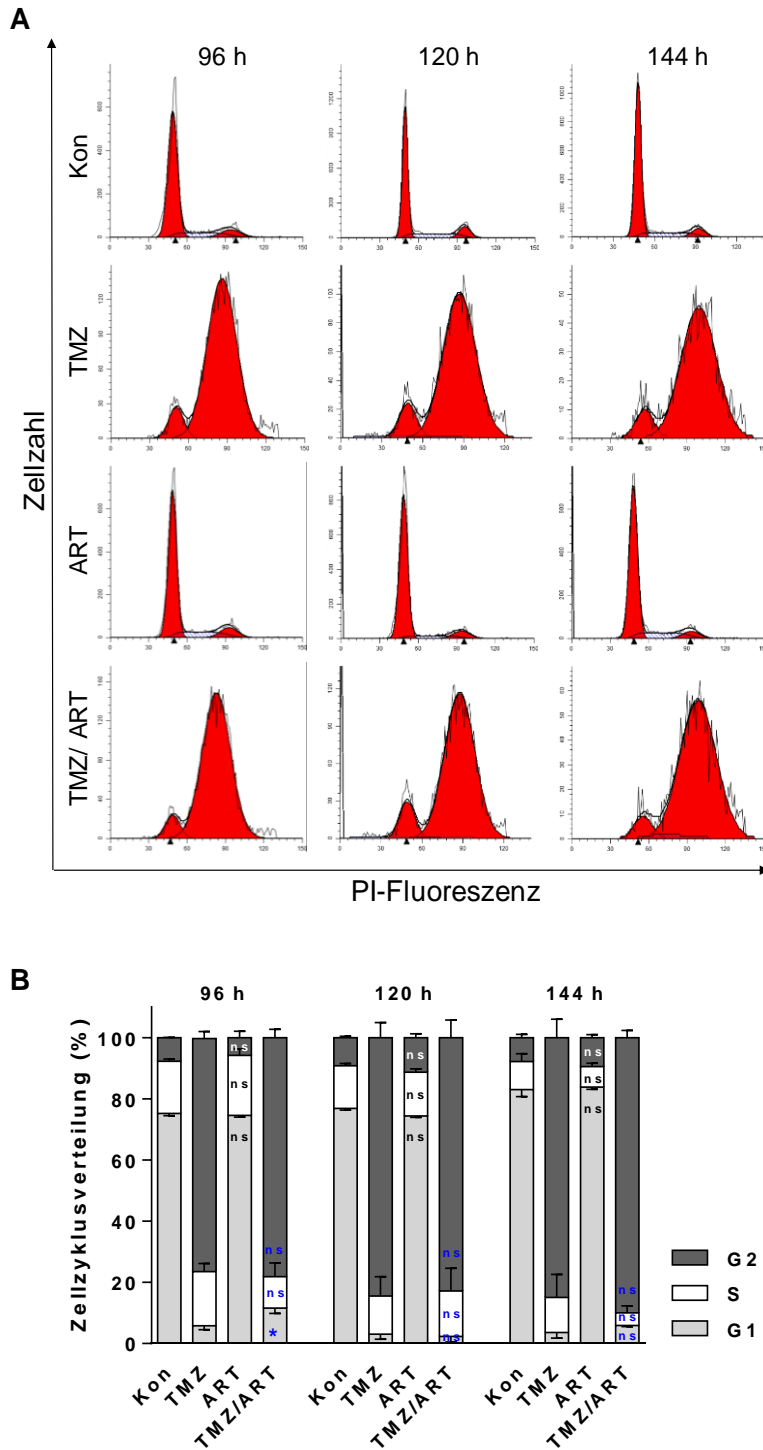


Abb. 21 Zellzyklusverteilung der A172-Zellen nach TMZ- und/ oder ART-Behandlung. Mittels PI-Färbung wurde der DNA-Gehalt durchflusszytometrisch nach der Behandlung mit TMZ (50 μ M) und/ oder ART (15 μ g/ ml) bestimmt. Die ART-Behandlung erfolgte 72 h nach der TMZ-Applikation. Dargestellt sind die Histogramme der Kontrollen (Kon) und Behandlungen nach 96 h-144 h (**A**) und die entsprechende Quantifizierung der G1-, S- und G2-Phasen (**B**). Angegeben sind die Mittelwerte +/- SD aus mind. drei unabhängigen Experimenten, die Signifikanz wurde mittels einfaktorieller ANOVA und dem Post-hoc-Test nach Šidák berechnet. Schwarz=Kon vs. ART; blau: TMZ vs. TMZ/ART. * $p \leq 0,05$, ns=nicht signifikant.

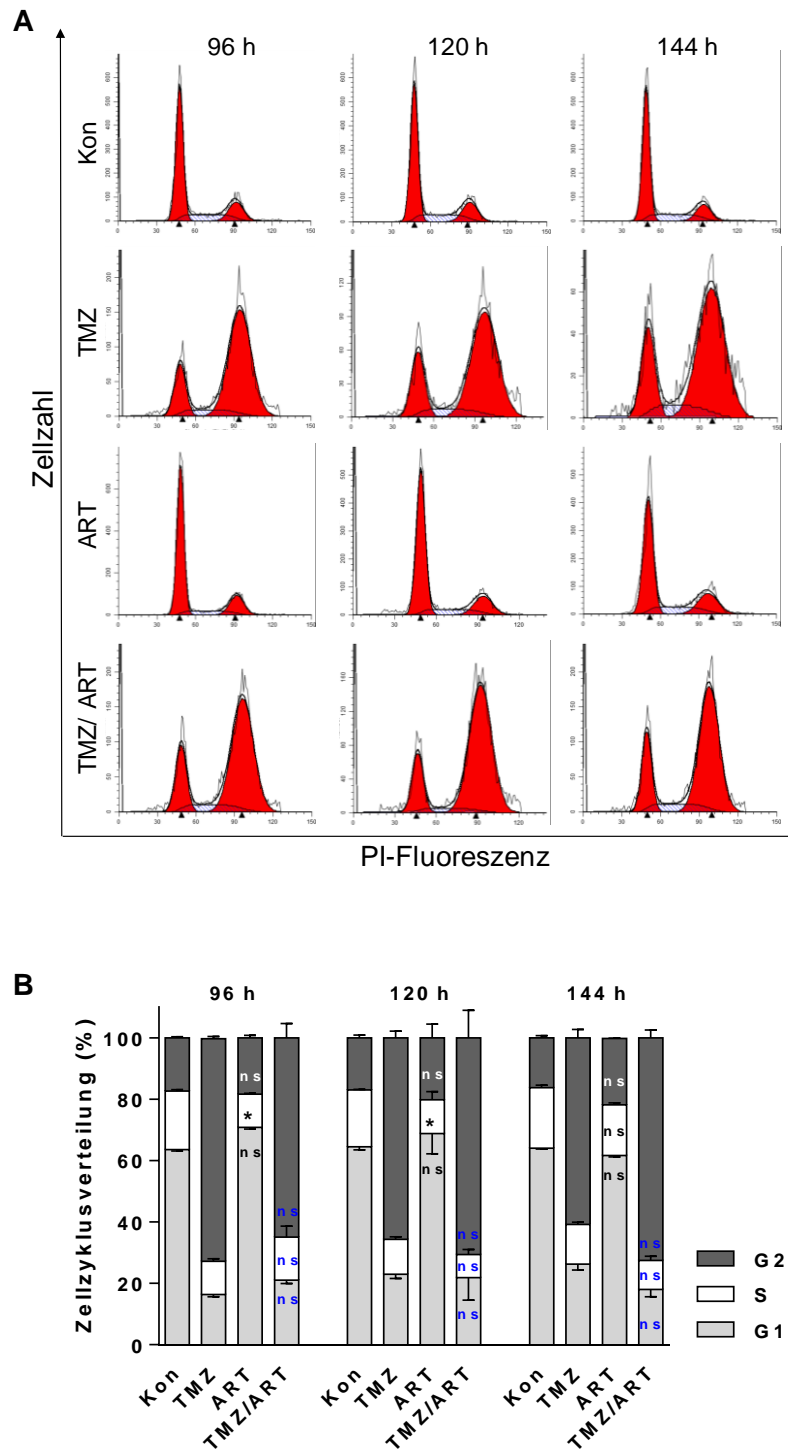


Abb. 22 Zellzyklusverteilung der U87MG-Zellen nach TMZ- und/ oder ART-Behandlung. Mittels PI-Färbung wurde der DNA-Gehalt durchflusszytometrisch nach der Behandlung mit TMZ (50 μ M) und/ oder ART (15 μ g/ml) bestimmt. Die ART-Behandlung erfolgte 72 h nach der TMZ-Applikation. Dargestellt sind die Histogramme der Kontrollen (Kon) und Behandlungen nach 96 h-144 h (**A**) und die entsprechende Quantifizierung der G1-, S- und G2-Phasen (**B**). Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus mind. drei unabhängigen Experimenten, die Signifikanz wurde mittels einfaktorier ANOVA und dem Post-hoc-Test nach Šidák berechnet. Schwarz=Kon vs. ART; blau: TMZ vs. TMZ/ART. *=signifikant, mind. $p \leq 0,05$, ns=nicht signifikant. Exakte statistischen Analyse: siehe Tab. 1 (Anhang).

Zusammengefasst zeigen die Zellzyklusanalysen keinen generellen, zelllinienübergreifenden Einfluss von ART auf die G1-, S- sowie G2-Phase der TMZ-behandelten Zellen im angegebenen Zeitraum. Die TMZ-Einzelbehandlung führte erwartungsgemäß zu einem G2-Arrest, aber ein durch die ART-Nachbehandlung-vermittelter Einfluss konnte lediglich in LN229- und A172-Zellen beobachtet werden. Hier wurde ein signifikanter Unterschied in den S- sowie G2-Phasen-Populationen detektiert. Auffällig war hierbei der Nachweis einer potenzierten Arretierung der LN229-Zellen in der G2-Phase. Die untersuchten A172-Zellen zeigten ebenfalls nach TMZ-Behandlung einen G2-Block, eine Nachbehandlung hatte lediglich in den ersten 24 h nach der ART-Gabe einen Einfluss auf die G1-Phase.

3.1.5. Untersuchung des Einflusses der ART-Nachbehandlung auf TMZ-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl TMZ als auch ART DSBs induzieren [66, 94]. Obwohl die zugrundeliegenden Mechanismen der DSB-Induktion differieren, war zu erwarten, dass die Kombinationsbehandlung einen synergistischen Effekt verursacht. Um dies zu überprüfen, wurde die Anzahl der DSB nach Einzel- und Kombinationsbehandlung in den Glioblastomzellen LN229, A172 und U87MG mittels Immunfluoreszenz-Färbung für γ H2AX bestimmt. Repräsentative Aufnahmen der Zellkerne (blau) und der γ H2AX-Foci (grün) 96 h nach Behandlung sind in Abb. 23 A dargestellt.

Die entsprechende Quantifizierung (Abb. 23 B) zeigte, dass ART (15 μ g/ ml) in den untersuchten Zelllinien kaum DSBs induzierte. In LN229-Zellen wurden 7, in A172-Zellen 5 und in U87MG-Zellen 2 γ H2AX-Foci/ Zelle nachgewiesen (hellgraue Balken). Im Gegensatz dazu bedingte die TMZ-Behandlung (50 μ M) einen drastischen Anstieg der DSBs (dunkelgraue Balken). Zu erwähnen ist auch, dass LN229-Zellen mit 65 Foci/ Zelle am sensitivsten reagierten. In A172- und U87MG-Zellen hingegen wurden 24 bzw. 15 Foci/ Zelle nachgewiesen. Überraschenderweise konnte kein Anstieg der DSB nach kombinierter TMZ/ ART-Behandlung (schwarze Balken) detektiert werden. Eine signifikante Abnahme der TMZ-induzierten γ H2AX-Foci war in A172-Zellen zu beobachten (Abb. 23 B).

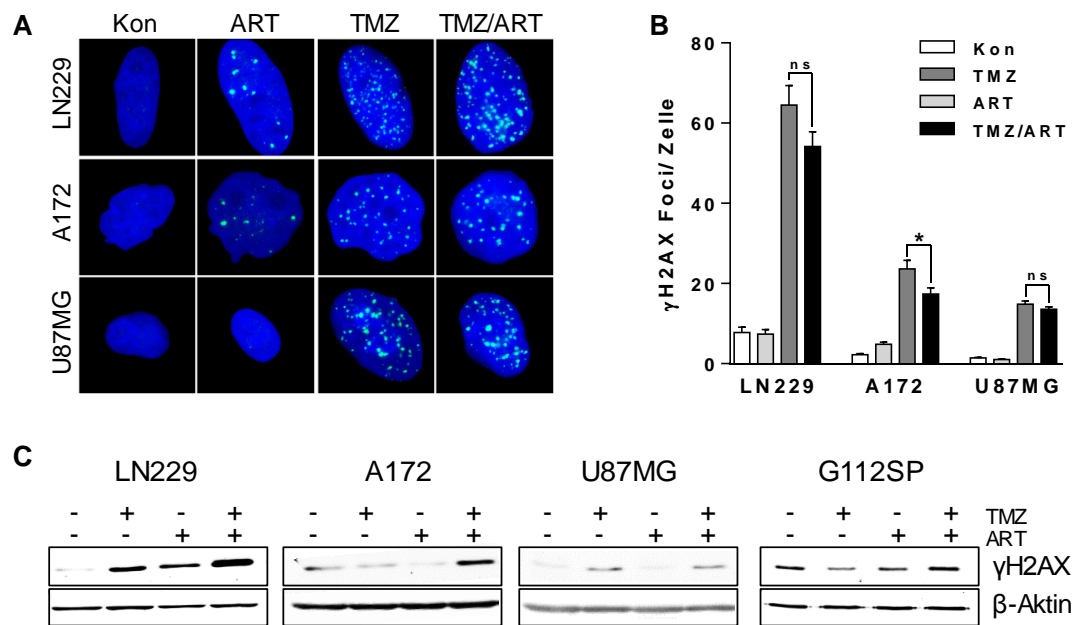


Abb. 23 Einfluss der ART-Nachbehandlung auf die TMZ-induzierten DSB. Die Glioblastomzellen wurden mit TMZ (50 µM; G112SP: 2 µM) und/ oder ART (15 µg/ ml) behandelt. Die ART-Behandlung erfolgte 72 h nach der TMZ-Applikation. Repräsentative Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen der Glioblastomzellen 96 h nach der Behandlung: grün=γH2AX-Foci, blau=Kernfärbung mit DAPI (A), die entsprechende Quantifizierung ist in (B) gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD aus drei unabhängigen Experimenten, deren Signifikanz mittels ungepaartem *t*-Test berechnet wurde: * $p \leq 0,05$; ns=nicht signifikant. (C) Westernblotanalyse des H2AX-Proteins (Ser 139) in Gesamtzellextrakten nach analoger Behandlung. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

Zusätzlich sollten diese Ergebnisse auf Proteinebene mittels Westernblotanalysen, die auch die Untersuchung von G112SP-Zellen einschloss, verifiziert werden. Die Behandlung der Zellen erfolgte analog, die γH2AX-Expression, analysiert in Gesamtzellextrakten, ist in Abb. 23 C dargestellt. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Auch hier ist eine klare γH2AX-Induktion nach TMZ-Behandlung in LN229- und U87MG-Zellen zu erkennen. G112SP-Zellen zeigten eine im Vergleich eher schwächere, A172-Zellen eine sehr schwache bis kaum detektierbare γH2AX-Expression. Die ART-Einzelbehandlung führte in LN229- sowie G112SP-Zellen zu einer klaren, aber im Vergleich zu TMZ schwächeren Induktion von DSBs. Für A172- und U87MG-Zellen konnte dies nicht bestätigt werden. Allerdings war nach Kombination von TMZ und ART ein deutlicher Anstieg der γH2AX-Expression in LN229-, A172 und G112-Zellen zu erkennen. In U87MG-Zellen erschien das Expressionsniveau vergleichbar zur TMZ-Probe. Zusammengefasst konnte auf Einzelzellebene zunächst nicht bestätigt werden, dass die ART-Nachbehandlung die Anzahl der TMZ-induzierten γH2AX-Foci, respektive ein Anstieg der DSBs, erhöht. Auf Proteinebene, die in Gesamtzellextrakten analysiert wurde, war eine deut-

liche Verstärkung der γ H2AX-Expression durch die Kombinationsbehandlung in 2 der 3 untersuchten Glioblastomzelllinien und den GSC G112SP-Zellen nachweisbar.

3.1.6. Einfluss der ART-Nachbehandlung auf die DNA-Schadensantwort

Primär wird die zelluläre DNA-Schadensantwort durch zwei verschiedene Kinasekaskaden, dem ATM-CHK2- und dem ATR-CHK1-Signalweg, koordiniert (vgl. Abb. 8). Wie eingangs beschrieben phosphorylieren ATM und ATR die abwärts agierenden Übermittlerkinasen CHK1 und CHK2 und können so, über weitere Zwischenstufen, u. a. den Zellzyklus (z.B. durch Akkumulation von p53) beeinflussen. Um zu überprüfen, ob die ART-Nachbehandlung einen Einfluss auf die TMZ-induzierte Schadensantwort hat, wurden der Zelltod nach spezifischer Hemmung der jeweiligen Kinasen untersucht. Hierzu wurden die Glioblastomzellen LN229, A172 und U87MG mit TMZ und/ oder ART behandelt. Die Hemmung der Kinasen erfolgte jeweils 1 h vor der Behandlung und wurde zur Aufrechterhaltung alle 48 h erneuert. Der Zelltod wurde 144 h nach der TMZ-Applikation mittels Annexin V/ PI-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Ergebnisse der Zelltodanalysen nach Inhibition der Initiatorkinasen ATM/ ATR sind in Abb. 24, die der Übermittlerkinasen CHK1 und CHK2 in Abb. 25 dargestellt. Sowohl die Inhibition von ATM (ATM_i; hellgraue Balken) als auch die von ATR (ATR_i; dunkelgraue Balken) zeigten keinen signifikanten Unterschied des Zelltodes nach der Behandlung in LN229-Zellen (Abb. 24 A). Auffällig ist jedoch, dass die Hemmung von ATR einen scheinbar protektiven Effekt auf die Zellen ausübt: Im Mittel betrug der TMZ-induzierte Zelltod 37 %. Nach Vorbehandlung verringerte sich dies auf 31 %. Wurden LN229-Zellen mit ART behandelt, starben 28 %, nach vorheriger ATR-Hemmung nur noch 18,5 % der untersuchten Population. Auch nach der Kombinationsbehandlung ist diese Tendenz zu beobachten. Die Zelltodrate sank von 57 % auf 46 %. Die Zelltoduntersuchungen der A172-Zellen (Abb. 24 B) zeigten nach Inhibition der Initiatorkinasen ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollbehandlung. Nach ATR-Inhibition war jedoch eine leicht protektive Tendenz des TMZ-induzierten Zelltodes zu beobachten. Die Hemmung von sowohl ATM als auch ATR bedingte allerdings einen eher sensitivierenden Effekt nach der ART-Einzelbehandlung: von 13 % stieg der Anteil der toten bzw. sterbenden Zellen auf 30 % bzw. 24 % (ATM_i bzw. ATR_i).

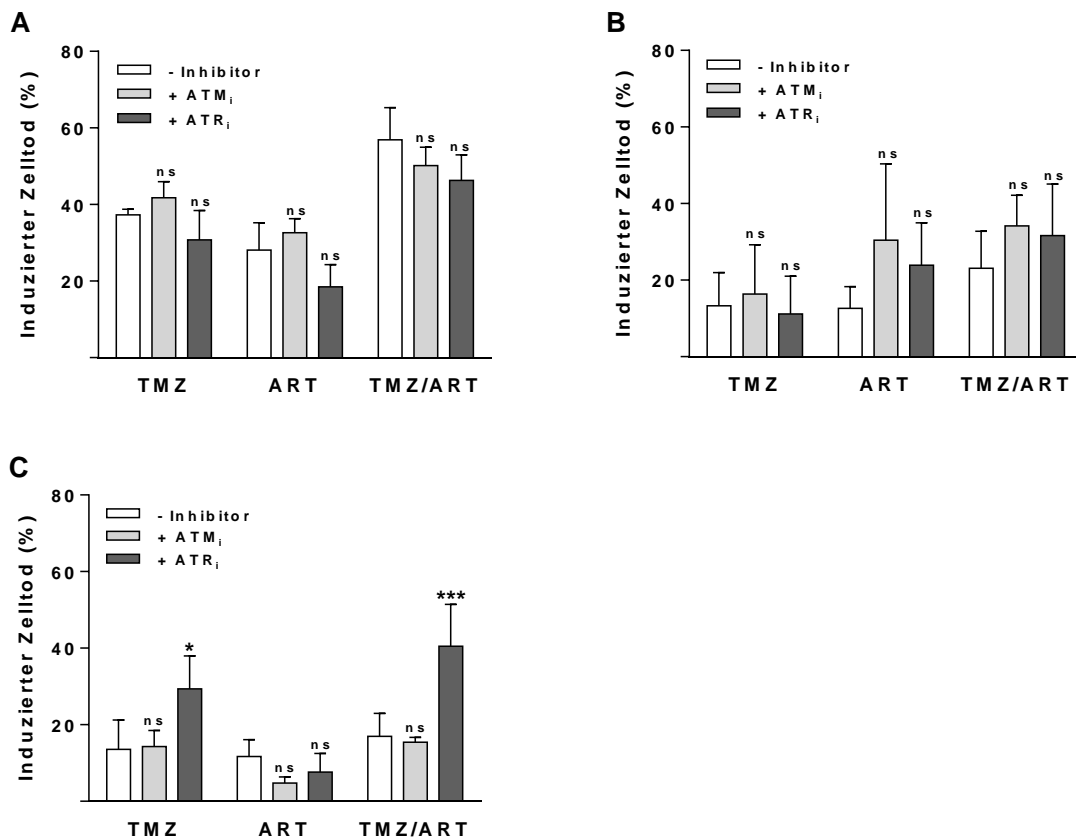


Abb. 24 Einfluss der ATM- bzw.ATR-Inhibition auf die ART-Nachbehandlung. Analyse des Zelltods mittels Annexin V/ PI-Färbung 144 h nach Behandlung mit TMZ (50 µM) und / oder ART (15 µg/ ml) in **(A)** LN229-, **(B)** A172- und **(C)** U87MG-Zellen. Die ART-Behandlung erfolgt 72 h nach TMZ-Applikation. ATM (hellgraue Balken) bzw. ATR (dunkelgraue Balken) wurden mittels Inhibitor 1 h vor der jeweiligen Behandlung gehemmt. Angegeben sind die Mittelwerte +/- SD aus drei unabhängigen Experimenten, Signifikanzanalyse mittels einfaktorieller ANOVA und dem Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest nach Šidák: * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$, ns=nicht signifikant.

Eine ähnliche Tendenz setzte sich auch im kombinierten Behandlungsregime durch. Der induzierte Zelltod nach der Kombinationsbehandlung betrug 23 %, welcher nach Inhibition der Kinasen auf 34 % (ATM_i) bzw. 32 % (ATR_i) im Mittel stieg. Konträr dazu sind die Ergebnisse der Zelltodanalysen der U87MG-Zellen (Abb. 24 C). Hier zeigte die Hemmung von ATM keinen nennenswerten Effekt auf den TMZ- bzw. den TMZ/ATR-induzierten Zelltod. Eine schützende Tendenz zeigte die ATM-Inhibition nach der Einzelbehandlung mit ART. Der ART-induzierte Zelltod reduzierte sich von 12 % auf 5 %. Signifikante Unterschiede des Behandlungs-induzierten Zelltods waren nach der Hemmung von ATR zu beobachten. Der TMZ-induzierte Zelltod verdoppelte sich von 14 % auf 30 %, im kombinierten Behandlungsansatz stieg die Zelltodrate von 17 % auf 41 %.

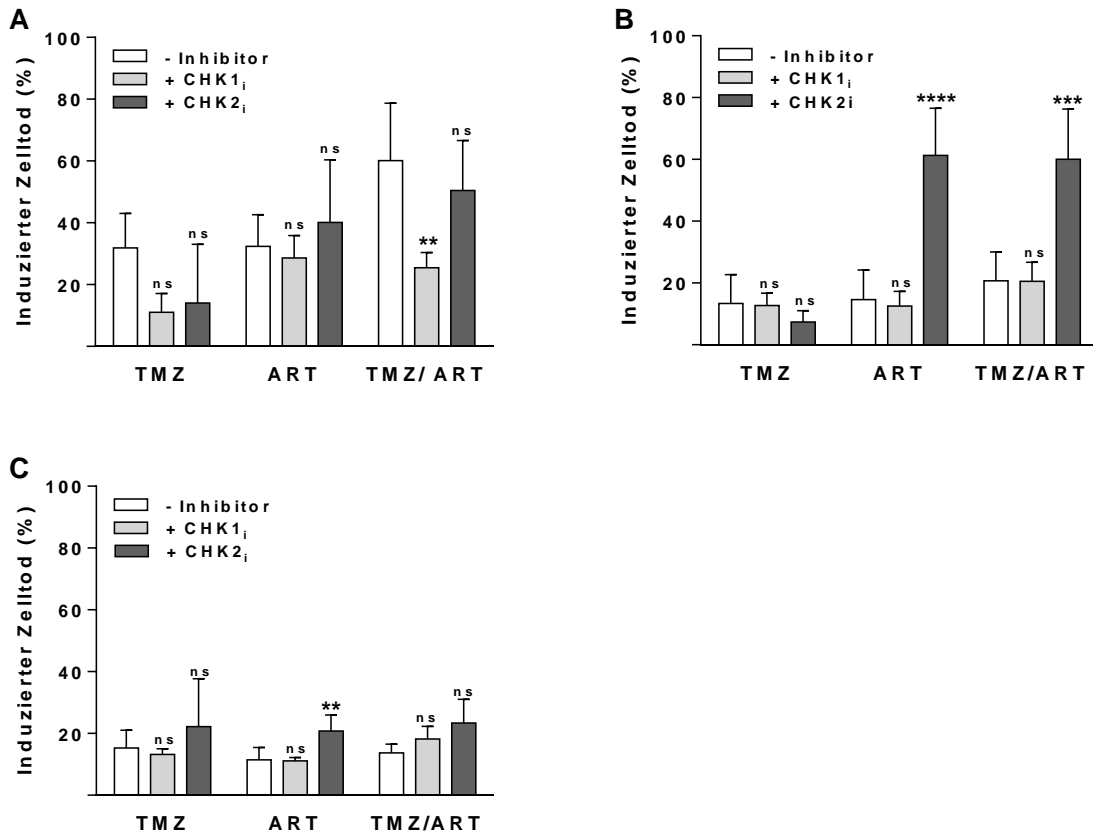


Abb. 25 Einfluss der CHK1- bzw. CHK2-Inhibition auf die ART-Nachbehandlung. Analyse des Zelltods mittels Annexin V/ PI-Färbung 144 h nach Behandlung mit TMZ (50 μ M) und/ oder ART (15 μ g/ ml) in **(A)** LN229-, **(B)**A172- und **(C)** U87MG-Zellen. Die ART-Behandlung erfolgt 72 h nach TMZ-Applikation. CHK1 (hellgraue Balken) bzw. CHK2 (dunkelgraue Balken) wurden mittels Inhibitor 1 h vor der jeweiligen Behandlung gehemmt. Angegeben sind die Mittelwerte +/- SD aus drei unabhängigen Experimenten, Signifikanzanalyse mittels einfaktorier ANOVA und dem Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest nach Šidák: * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$, ns=nicht signifikant.

Zur weiteren Analyse des Einflusses der ART-Nachbehandlung auf die TMZ-induzierte DNA-Schadensantwort wurde zusätzlich der Einfluss der Übermittlerkinasen CHK1 und CHK2 untersucht. Analog zu den vorangegangenen Experimenten wurden CHK1 bzw. CHK2 vor der Behandlung mit TMZ bzw. und/oder ART spezifisch inhibiert und der Zelltod bestimmt (Abb. 25).

Die Untersuchung der LN229-Zellen (Abb. 25 A) zeigte nach CHK1-Inhibition (CHK1_i; hellgraue Balken) einen protektiven Effekt gegenüber TMZ (Reduktion 32 % auf 11 %), einen etwas schwächeren schützenden Effekt gegenüber ART (Reduktion 32 % auf 27 %) und einen signifikanten Einfluss in Bezug auf die Kombination beider Agenzien. Hier verringerte die CHK1-Hemmung den Behandlungs-induzierten Zelltod von 60 % auf 25 %, was einer Reduktion von 35 % entsprach.

Im Vergleich dazu zeigte die Depletion von CHK2 (CHK2_i; dunkelgraue Balken) lediglich die Tendenz einer Schutzfunktion gegenüber dem TMZ-induzierten Zelltod, sowie im kombinierten Ansatz (von 32 % auf 14 % bzw. 60 % auf 40 %). Eine CHK1-Inhibition in A172-Zellen (Abb. 25 B) beeinflusste den Behandlungs-induzierten Zelltod marginal. Die spezifische Hemmung von CHK2 zeigte nach TMZ-Einzelbehandlung einen schwach protektiven Effekt und reduzierte den TMZ-induzierten Zelltod von 14 % auf 7 %. Gleichzeitig sensitivierte eine CHK2-Inhibition A172-Zellen signifikant gegenüber der ART-Einzelbehandlung. Der ART-vermittelte Zelltod stieg drastisch von 15 % auf 61 % an. Vergleichbares war auch in der Kombinationsbehandlung zu beobachten (21 % auf 60 %). Die TMZ-resistenten U87MG-Zellen (Abb. 25 C) zeigten sich in Bezug einer CHK1-Inhibition unbeeindruckt. Weder nach Einzel-, noch nach Kombinationsbehandlung verändert sich die Zelltodinduktion signifikant in Anwesenheit des Inhibitors. CHK2 hingegen scheint einen signifikanten Einfluss auf den ART-vermittelten Zelltod zu haben. Dieser steigt von 11 % auf 21 %.

3.1.7. Einfluss der ART-Nachbehandlung auf die DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur

Zur Reparatur von DSBs stehen einer Zelle zwei unterschiedliche Mechanismen zur Verfügung: die homologe Rekombination-Reparatur (HRR) und die nicht-homologe Endverknüpfung (engl. *non-homologous end-joining*, NHEJ). Zusätzlich zur initialen DSB-Entstehung und der entsprechenden DNA-Schadensantwort wurde auch der Einfluss der ART-Nachbehandlung auf die DSB-Reparatur selbst untersucht.

3.1.7.1. Einfluss auf die Homologe Rekombination

Um den Einfluss der ART-Nachbehandlung auf die HRR zu analysieren, wurde zunächst der Einfluss auf das Schlüsselprotein dieses Reparaturweges, RAD51, untersucht. Mittels Westernblotanalysen wurde in Gesamtzellentrakten der LN229-, A172-, U87MG- und der G112SP-Zellen nach der Behandlung mit TMZ und/oder ART das Expressionsniveau von RAD51 bestimmt (Abb. 26).

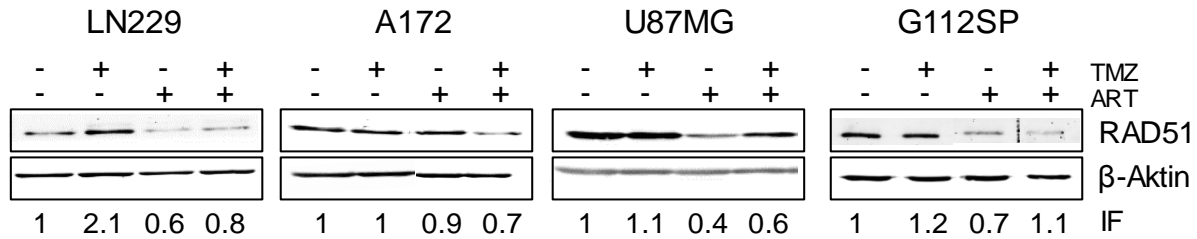


Abb. 26 Einfluss der ART-Nachbehandlung auf die RAD51-Proteinexpression. Mittels Westernblotanalyse wurden die RAD51-Proteinniveaus in Gesamtzellextrakten 96 h nach TMZ (50 µM, für G112SP: 2 µM) und/oder ART (15 µg/ml) bestimmt. Die ART-Behandlung erfolgte 72 h nach TMZ-Applikation. β-Aktin diente als Ladekontrolle. IF=Induktionsfaktor.

Die Analyse erfolgte 96 h nach der TMZ-Applikation und zeigte in LN229- und G112SP-Zellen einen TMZ-induzierten Anstieg des Proteins. In Anwesenheit von ART war dies überraschenderweise nicht zu beobachten und führte sogar vielmehr zu einer Abnahme der RAD51-Expression. Die Untersuchung der A172- und U87MG-Zellen zeigte keine eindeutige TMZ-vermittelte Verstärkung des Proteinniveaus, die ART-Behandlung führte jedoch auch hier zu einer Abnahme der RAD51-Expression, die auch in der Kombinationsbehandlung zu beobachten war.

3.1.7.2. Einfluss von ART auf die Reparatur-Kapazität der homologen Rekombination

Zusätzlich zur Analyse der RAD51-Proteinexpression wurde die HRR-Kapazität auch funktionell untersucht. Hierzu wurden exemplarisch LN229-Zellen mit einem HR-Reparatur-Plasmid ausgestattet (Kapitel 2.2.7) und ein spezifischer DSB mittels *I-SceI* induziert. Anschließend wurde deren Fähigkeit getestet, diesen DSB unter dem Einfluss von ART zu reparieren. Um Überlagerungen mit etwaigen Zelltodereignissen auszuschließen, wurde die ART-Dosis auf 5 bzw. 7,5 µg/ml reduziert und der Anteil der Population bestimmt, die diesen DSB mittels HRR reparierte (=GFP-positive Population). Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch über einen Zeitraum von 24 bis 72 h.

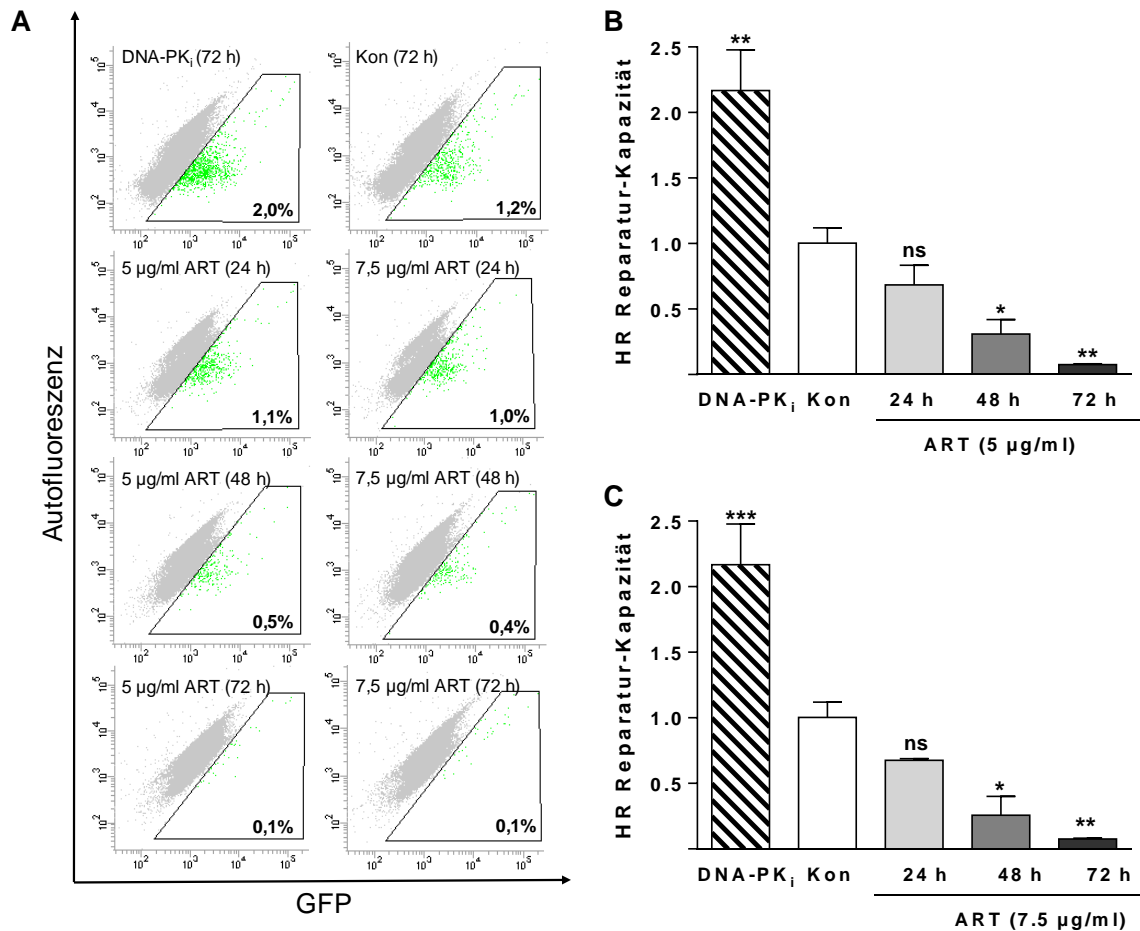


Abb. 27 Die Reparatur-Kapazität der homologen Rekombination in LN229-Zellen. Mittels des HR-Reparatur-Tests wurde die Reparatur-Kapazität eines spezifisch durch *I-SceI* induzierten DNA-Doppelstrangbruchs in LN229-Zellen und der Einfluss von ART auf dessen Reparatur untersucht. **(A)** Repräsentative Punktdiagramme; aufgetragen ist das GFP-Signal gegen die Autofluoreszenz. Die Teilmenge der GFP-positiven (= via HRR reparierte DSB) Population (grün) wurden mittels eines *Gates* markiert und in **(B)** und **(C)** entsprechend der ART-Konzentration quantifiziert dargestellt. Die Analyse wurde 72 h nach der Transfektion mit *I-SceI* durchgeführt. Die angegebenen Zeitwerte entsprechen der Expositionsdauer mit ART. Die simultane Inkubation mit DNA-PK_i (1 µM) diente als Positiv-Kontrolle (Depletion von DNA-PK, somit vorübergehendes Abschalten des NHEJ-Reparaturweges). Abgebildet sind die auf die Kontrolle normalisierten Mittelwerte +/- SD aus drei unabhängigen Experimenten, deren Signifikanz mittels einfaktorier ANOVA und dem Post-hoc-Test nach Šidák berechnet wurde: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; ns = nicht signifikant.

Die simultane Inhibition von DNA-PK (DNA-PK_i) und damit das vorübergehende Ausschalten des NHEJ-Reparaturweges diente als Positivkontrolle. Zur Quantifizierung wurden die Ergebnisse auf die Kontrolle normalisiert. Bereits die Punktdiagramme (Abb. 27 A) veranschaulichen einen zeitabhängigen Rückgang der GFP-positiven Population. Die ART-Konzentration schien dabei eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die Quantifizierung der HR-Reparatur-Kapazität zeigte sowohl in Anwesenheit von 5 µg/ml (Abb. 27 B) als auch von 7,5 µg/ml

(Abb. 27 C) ART einen signifikanten Abfall nach 48 h. Eine nahezu komplette Hemmung der HRR-Aktivität war 72 h nach ART-Applikation erreicht.

3.1.7.3. Einfluss von ART und dessen Kombination mit TMZ auf RAD51-defiziente Zellen

Um zu klären, ob die Herunterregulation von RAD51 und damit auch die HRR einen Einfluss auf das Zellüberleben nach einer kombinierten TMZ/ ART-Behandlung hat, wurde die Sensitivität in einem RAD51-defizienten Zellsystem überprüft. Das stabile Ausschalten des RAD51-Proteins wurde in LN229-Zellen durch shRNA erreicht und mittels Westernblotanalyse (Abb. 28 B) nachgewiesen. Die Bestimmung des Zelltods erfolgte nach Annexin V/ PI-Doppelfärbung. Die RAD51sh-Zellen (dunkelgraue Balken) sowie deren entsprechenden Transfektionskontroll-Zellen (pS-empty: hellgraue Balken) wurden mit TMZ (10 μ M) und/ oder ART (15 mg/ml) behandelt und der Behandlungs-induzierte Zelltod nach 144 h durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 28 A).

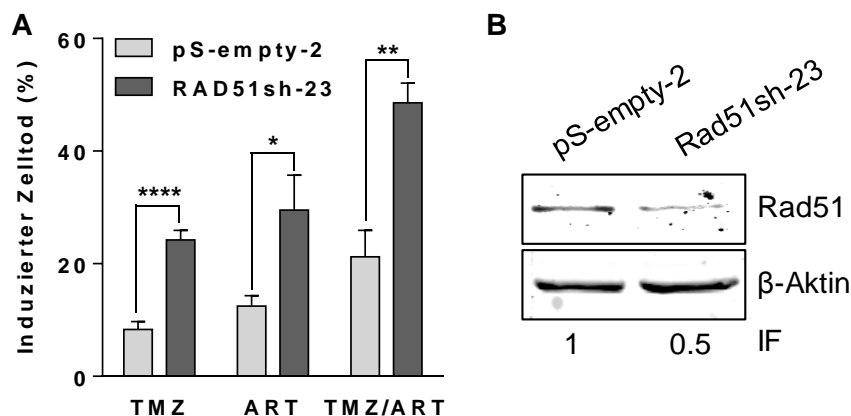


Abb. 28 Zelltodbestimmung nach kombinierter TMZ- und ART-Behandlung in RAD51-knockdown-Zellen der LN229-Zellen. Mittels Annexin V/ PI-Doppelfärbung und durchflusszytometrischer Analyse wurde der Zelltod 144 h nach Behandlung mit 10 μ M TMZ, 15 μ g/ ml ART oder der Kombination aus beidem bestimmt. Die ART-Behandlung folgte 72 h nach TMZ-Gabe. Abgebildet sind die Mittelwerte +/- SD des induzierten Zelltods aus drei unabhängigen Experimenten in RAD51-knockdown-Zellen (RAD51sh-23: dunkelgrau) und entsprechenden Transfektions-Kontroll-Zellen (pS-empty-2: hellgrau) (A). Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem *t*-Test berechnet: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$. Die Herunterregulation von RAD51 auf Proteinebene wurde mittels Westernblot überprüft (B). β -Aktin diente als Ladekontrolle. IF = Induktionsfaktor.

Sowohl die TMZ- als auch ART-Einzelbehandlung zeigte im Vergleich zu den Kontrollzellen einen signifikanten Anstieg des Zelltods. TMZ induzierte in den Kontrollzellen eine Zelltodrate von 8,3 %, die im RAD51-defizienten System auf 24,2 % anstieg. Durch die ART-

Behandlung starben 12,5 % der Kontrollpopulation, während sich der Anteil der sterbenden Zellen der RAD51-Defizienten mehr als verdoppelte (auf 30 %). Durch den kombinierten Behandlungsansatz wurden die RAD51sh-Zellen noch weiter sensitiviert. Der Zelltod stieg im Vergleich von 21 auf 49 %.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die HRR nicht nur den TMZ-induzierten Zelltod, sondern auch die durch ART vermittelte Sensitivierung von Glioblastomzellen beeinflusst.

3.1.7.4. Einfluss von ART auf die nicht-homologe Endverknüpfung

Ein weiterer Mechanismus der DNA-DSB-Reparatur ist die NHEJ. Ein wichtiger Faktor dieses Reparaturwegs ist die Kinase DNA-PK_{CS}. Durch die spezifische Hemmung dieses Proteins wurde der Einfluss der ART-Behandlung auf die NHEJ untersucht. Der Behandlungs-induzierte Zelltod wurde mittels Annexin V/ PI-Doppelfärbung 144 h nach der TMZ-Gabe durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 29). Die ART-Behandlung erfolgte 72 h nach TMZ.

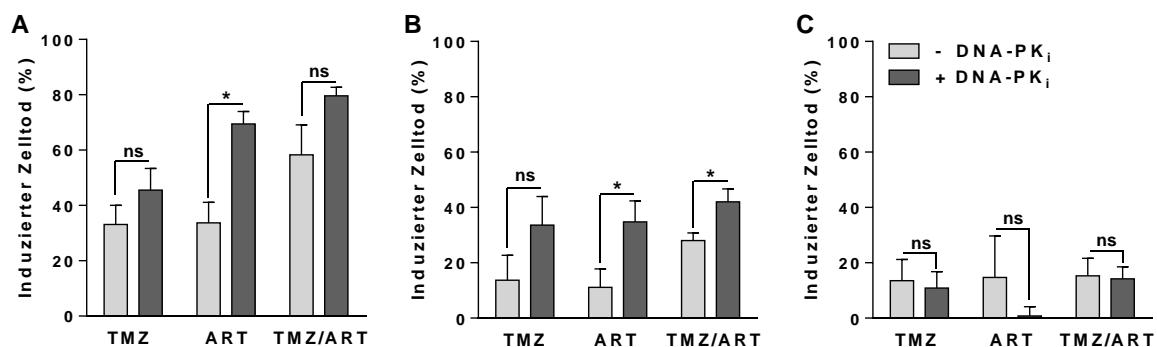


Abb. 29 Einfluss der DNA-PK-Inhibition auf den TMZ- und ART-induzierten Zelltod. Dargestellt ist der induzierte Zelltod 144 h nach TMZ-(50 µM) und/ oder ART-Behandlung (15 µg/ ml) mit/ ohne DNA-PK_i-Vorbehandlung (1 µM, 1 h). Der Zelltod in (A) LN229-, (B) A172- und (C) U87MG-Zellen wurde durchflusszytometrisch nach Annexin V/ PI-Doppelfärbung bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD aus drei unabhängigen Experimenten, deren Signifikanz mittels ungepaartem t-Test ermittelt wurde: * p ≤ 0,05, ns=nicht signifikant.

Die Inhibition von DNA-PK_{CS} (DNA-PK_i; dunkelgraue Balken) beeinflusste in LN229-Zellen (Abb. 29 A) weder den TMZ-, noch den TMZ/ART-induzierten Zelltod. Im Gegensatz dazu erhöhte sich die Zelltodfrequenz nach der ART-Einzelgabe signifikant von 33 % auf 70 %. In A172-Zellen (Abb. 29 B) ist dieser sensitivierende Effekt ebenfalls zu beobachten. Hier stieg die Zelltodrate signifikant von 11 auf 35 % nach der ART-Behandlung, von 28 auf 42 % nach der kombinierten Applikation von TMZ und ATR. In U87MG-Zellen (Abb. 29 C) konnte kein signifikanter Unterschied durch die Hemmung der NHEJ nachgewiesen werden. Im Vergleich

zum ART-vermittelten Zelltod (15 %) scheint der Hemmung der DNA-PK_{CS} eine protektive Funktion zuzukommen. Der induzierte Zelltod sank hier auf 1 % ab.

3.1.8. Einfluss der ART-Nachbehandlung auf die TMZ-induzierte Autophagie

Welche Rolle die Autophagie in Bezug auf Krebs spielt, ist noch nicht ganz geklärt. Es gibt Hinweise auf eine tumorsuppressorische Wirkung, ebenso aber auch Hinweise, die das Tumorüberleben begünstigen. In Krebszellen bietet die Autophagie einen Mechanismus, mit Zellstress umzugehen. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass TMZ Autophagie induziert und darüber hinaus als Überlebensmechanismus den programmierten Zelltod, die Apoptose, hemmt.

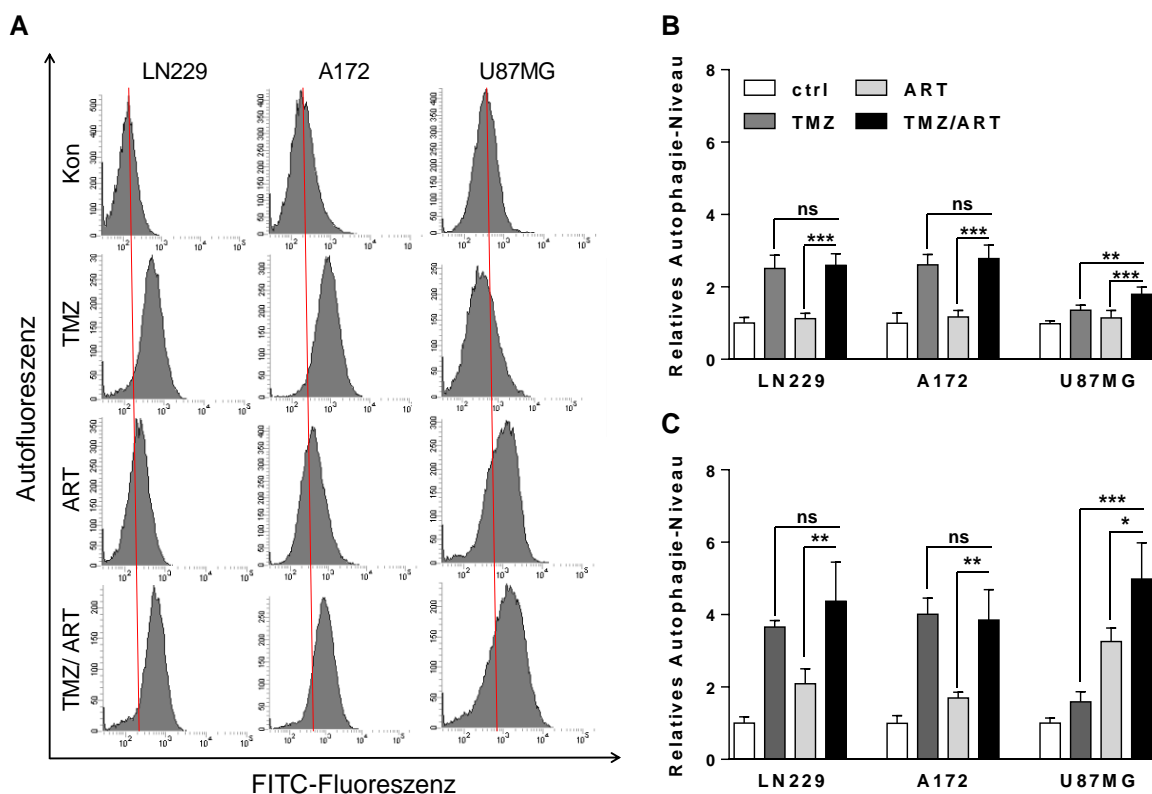


Abb. 30 Relatives Autophagie-Niveau der Glioblastomzelllinien LN229, A172 und U87MG. Die Zellen wurden mit TMZ (50 μ M) und/oder ART (15 μ g/ ml) behandelt. Repräsentative Darstellung der Histogramme des CYTO-ID®-Signals (=FITC-Fluoreszenz). Die rote Linie veranschaulicht die Verschiebung des Signals (A). Quantifizierung der relativen mittleren Intensität der gefärbten Zellen 96 h (B) und 120 h (C) nach Behandlung. Das Autophagie-Niveau wurde auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Angegeben sind die Mittelwerte +/- SD aus drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels einfaktorier ANOVA und dem Post-hoc-Test nach Šidák berechnet: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$, ns=nicht signifikant.

Durch Anfärben autophagischer Vakuolen mittels CYTO-ID® wurde der Einfluss der ART-Nachbehandlung auf die TMZ-induzierte Autophagie durchflusszytometrisch überprüft. Die Glioblastomzellen LN229, A172 und U87MG wurden mit TMZ (50 µM) und/ oder ART (15 µg/ml) behandelt. Die Analyse erfolgte 96 h bzw. 120 h nach der TMZ-Behandlung. Die mittlere Intensität der gefärbten Zellen wurde auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle normalisiert (Abb. 30).

Bereits die Histogramme verdeutlichten die erwartete Zunahme des FITC- und damit des Autophagie-Signals nach der TMZ-Einzelbehandlung (Abb. 30 A). Die entsprechenden Quantifizierungen nach 96 h (Abb. 30 B) und 120 h (Abb. 30 C) verifizierten dies. In allen untersuchten Zelllinien bestätigte sich die TMZ-induzierte Autophagie (dunkelgrauer Balken) im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle (weiße Balken). Diese war zum späteren Zeitpunkt sogar deutlich ausgeprägter. Die Autophagie-Level der ART-Einzelbehandlung (hellgraue Balken) befanden sich zum frühen Zeitpunkt (96 h; respektive 24 h ART) auf Kontrollniveau. Die Kombination beider Agenzien (schwarze Balken) zeigte in den LN229- und A172-Zellen keinen signifikanten Unterschied zur TMZ-Behandlung, wobei in U87MG-Zellen eine schwache, signifikante Erhöhung des Autophagie-Signals zu beobachten war. Die Untersuchungen zum späteren Zeitpunkt (120 h) zeigten ein analoges Ergebnis. Verglichen zur TMZ-induzierten Autophagie konnte in LN229- und A172-Zellen kein signifikanter Unterschied zur Kombinationsbehandlung nachgewiesen werden. Ebenfalls marginal war der Unterschied zwischen der ART-Behandlung und der entsprechenden Kontrolle. Im Gegensatz dazu zeigten die U87MG-Zellen zum einen eine signifikante Erhöhung des Autophagie-Signals nach ART-Einzelbehandlung (verglichen zur Kontrolle: Faktor 3), zum anderen auch eine eindeutige Steigerung des untersuchten Überlebensmechanismus nach der Kombinationsbehandlung. Im Vergleich zur TMZ-Einzelbehandlung erhöhte sich dieses Niveau von 1,6 auf 5.

Zusammengefasst scheint ART lediglich Zelllinien-spezifisch in den U87MG-Zellen die TMZ-induzierte Autophagie zu beeinflussen.

3.1.9. Einfluss der ART-Nachbehandlung auf die TMZ-induzierte Seneszenz

In früheren Studien wurde gezeigt, dass TMZ Seneszenz induziert und dadurch verschiedene Zelltodereignisse wie Apoptose und Nekrose reduziert [205]. Daher wurde der Einfluss der

ART-Behandlung auf die TMZ-induzierte Seneszenz untersucht. Hierzu wurden die LN229-, A172- und U87MG-Zellen analog zu den vorangegangenen Experimenten behandelt und die relative Seneszenz nach 96 h, 120 h und 144 h untersucht. Dies erfolgte zum einen qualitativ 144 h nach der Behandlung histochemisch (Abb. 31 A, C, E), zum anderen quantitativ am Durchflusszytometer (Abb. 31 B, D, F).

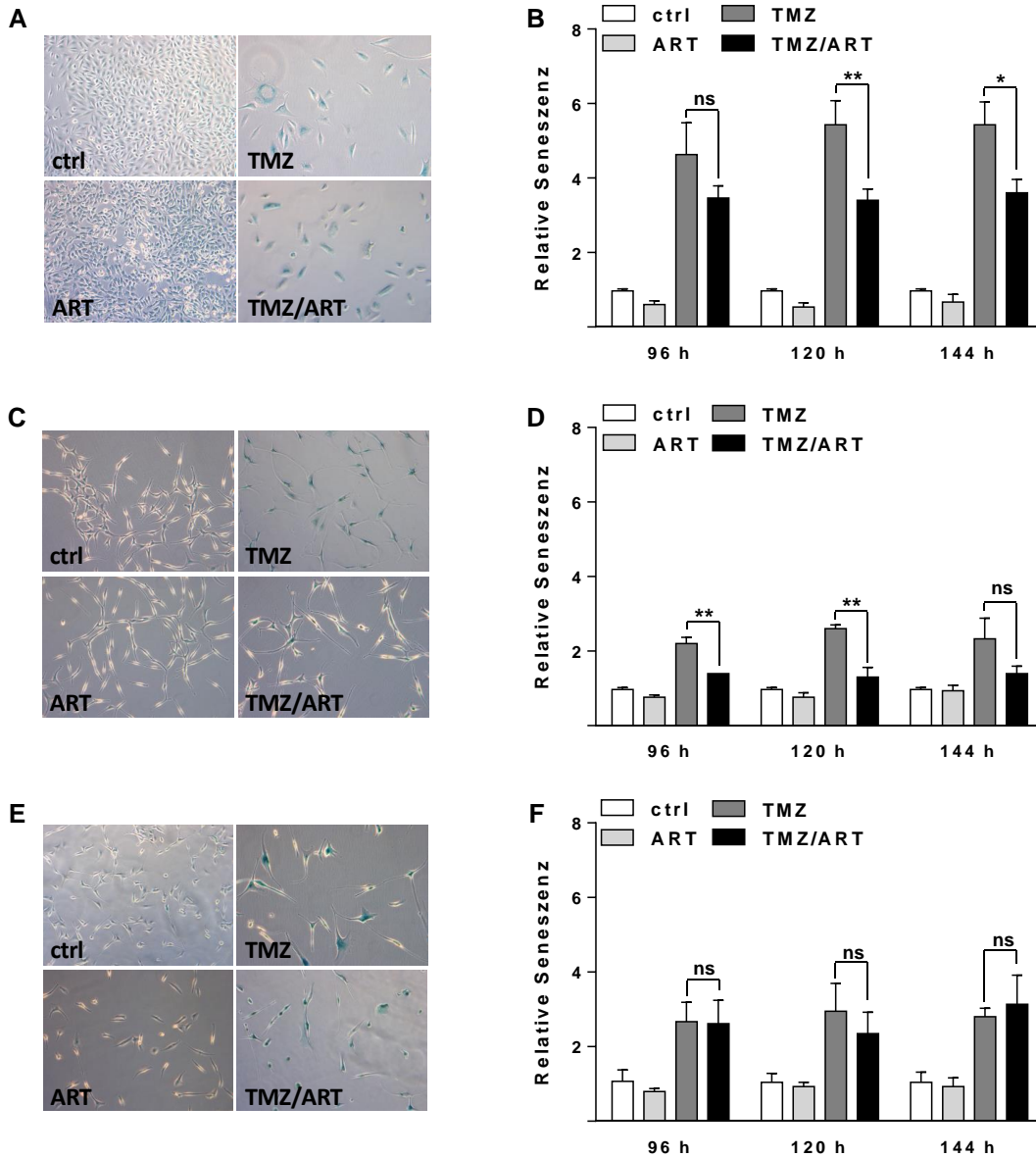


Abb. 31 TMZ-induzierte Seneszenz in LN229-, A172- und U87MG-Zellen. Lichtmikroskopisch qualitative Darstellung der SA-β-Galactosidase-Färbung 144 h nach Behandlung mit 50 μM TMZ, 15 μg/ml ART und in Kombination: (A) LN229-, (C) A172-, (E) U87MG-Zellen mit 10-facher Vergrößerung. Quantitative Darstellung der C₁₂FDG-Färbung 96 h, 120 h und 144 h nach Behandlung (50 μM TMZ und/oder 15 μg/ml ART). Abgebildet sind die mittleren Intensitäten +/- SD der C₁₂FDG-positiven (B) LN229-, (D) A172- und (F) U87MG-Zellen aus drei unabhängigen Experimenten. Das C₁₂-FDG Signal wurde auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert, die statistische Signifikanz zwischen der TMZ- und der TMZ/ ART-Behandlung mittels ungepaartem t-Test berechnet: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, ns=nicht signifikant.

Beiden Methoden gemeinsam ist die enzymatische Umsetzung eines β -D-Galactopyranosids durch die β -Galactosidase, dessen Spaltprodukt anschließend mikroskopisch bzw. durchflusszytometrisch detektierbar ist. Bereits qualitativ ließ sich die TMZ-induzierte Seneszenz (blaue Zellen) in allen untersuchten Zelllinien nachweisen (Abb. 31 A, C und E). Auch durchflusszytometrisch war diese in LN229-Zellen über den gesamten Untersuchungszeitraum eindeutig nachweisbar (Abb. 22 B, dunkelgraue Balken), während die ART-Einzelbehandlung keine Seneszenz induzierte (hellgraue Balken). Wurden die Behandlungen hingegen kombiniert (schwarze Balken), verringerte die ART-Nachbehandlung die TMZ-induzierte Seneszenz 120 h und 144 h nach der Behandlung signifikant.

Ein vergleichbares Ergebnis lieferte auch die Untersuchung der A172-Zellen (Abb. 31 D). Zu jedem untersuchten Zeitpunkt war die TMZ-induzierte Seneszenz (dunkelgraue Balken) ebenfalls nachweisbar, die ART-Einzelbehandlung (hellgraue Balken) beeinflusste diese wiederum nicht. Die Kombinationsbehandlung (schwarze Balken) hingegen sorgte auch in diesem Zellsystem für eine signifikante Reduktion der TMZ-induzierten Seneszenz 96 h und 120 h nach der Behandlung. Im Gegensatz dazu verhielt sich das Untersuchungsergebnis der U87MG-Zellen (Abb. 31 F). Zwar induzierte auch hier die TMZ-Behandlung (dunkelgraue Balken) Seneszenz, eine ART-Nachbehandlung (schwarze Balken) beeinflusste dies nicht.

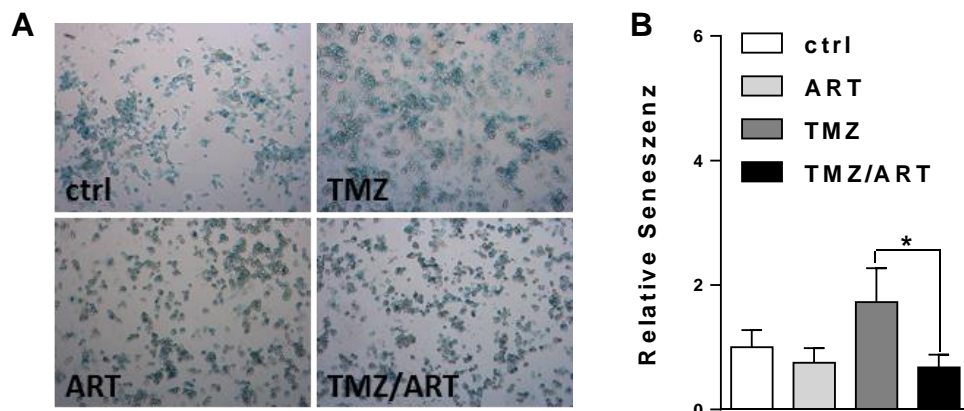


Abb. 32 TMZ-induzierte Seneszenz in Glioblastom *stem-like* Zellen G112SP. : (A) Lichtmikroskopische Darstellung der SA- β -Galactosidase-Färbung 144 h nach Behandlung mit 2 μ M TMZ, 15 μ g/ml ART und in Kombination. (B) Quantitative Darstellung der C_{12} FDG-Färbung 144 h nach Behandlung (zur MGMT-Depletion 1 h Vorbehandlung mit 10 μ M O^6 BG, anschließend 2 μ M TMZ, 15 μ g/ml ART und kombiniert). Abgebildet sind die mittleren Intensitäten \pm SD der C_{12} FDG-positiven G112SP-Zellen aus drei unabhängigen Experimenten. Das C_{12} -FDG Signal wurde auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert, die statistische Signifikanz zwischen der TMZ- und der TMZ/ ART-Behandlung wurde mittels ungepaartem t -Test berechnet: * $p \leq 0,05$.

Ferner wurde auch die Seneszenz in den G112SP-Zellen analysiert (Abb. 32). Aufgrund der zuvor ermittelten hohen Sensitivität dieser Zellen wurde die TMZ-Dosis auf 2 μ M reduziert. Die mikroskopische Analyse zeigte bereits in der unbehandelten Kontrolle einen seneszenten Phänotyp (Abb. 32 A). Unterschiede der einzelnen Behandlungen waren nur schwer erkennbar. Die Quantifizierung der durchflusszytometrischen Analyse zeigte allerdings, trotz der Normalisierung auf die Kontrolle, eine TMZ-induzierte Seneszenz (Abb. 32 B, dunkelgraue Balken) 144 h nach der Behandlung. Die ART-Einzelbehandlung zeigte im Vergleich zur Kontrolle keinen Unterschied, während die ART-Nachbehandlung auch in den GSCs die TMZ-induzierte Seneszenz signifikant reduzierte.

3.1.9.1. Der Einfluss der Proteine p53 und PTEN auf die TMZ-induzierte Seneszenz

Die zelluläre Seneszenz wird nach DNA-Schädigung u. a. durch p53 und PTEN reguliert. Ob diese Schlüsselproteine auch die durch die ART-Nachbehandlung hervorgerufene Reduktion der TMZ-induzierten Seneszenz beeinflussen, wurde im Folgenden untersucht. Aufgrund ihres starken seneszenten Ansprechens wurden exemplarisch LN229-Zellen analysiert. p53 wurde vor der jeweiligen Behandlung, die analog zu den vorangegangenen Experimenten erfolgte, durch den spezifischen Inhibitor Pifithrin- α depletiert (p53_i). Die TMZ-induzierte Seneszenz wurde am Durchflusszytometer 144 h nach der Behandlung analysiert (Abb. 33). Wie erwartet zeigten die p53-profizienten LN229-Zellen (hellgraue Balken) im Vergleich zur Kontrolle eine eindeutige TMZ-induzierte Seneszenz (6,7-fach), die durch die ART-Nachbehandlung signifikant um 43,3 % reduziert wurde (3,8-fach). Interessanterweise zeigten dies auch die p53-inhibierten Zellen (dunkelgraue Balken). Im Vergleich zur Kontrolle stieg die relative Seneszenz nach der TMZ-Behandlung um einen Faktor von etwa 4, während die ART-Nachbehandlung dieses Phänomen signifikant mehr als halbierte (1,7-fach). Somit betrug die ART-vermittelte Reduktion der TMZ-induzierten Seneszenz 61,4 %. Auch die TMZ- bzw. die Kombinationsbehandlungs-induzierte Seneszenz an und für sich unterschied sich signifikant zwischen p53-profizienten und -inhibierten LN229-Zellen. Dies lässt darauf schließen, dass p53 ein wichtiger Faktor der TMZ-induzierten Seneszenz darstellt. Die ART-vermittelte Reduktion dieser TMZ-induzierten Seneszenz lässt sich hiermit jedoch nicht klären.

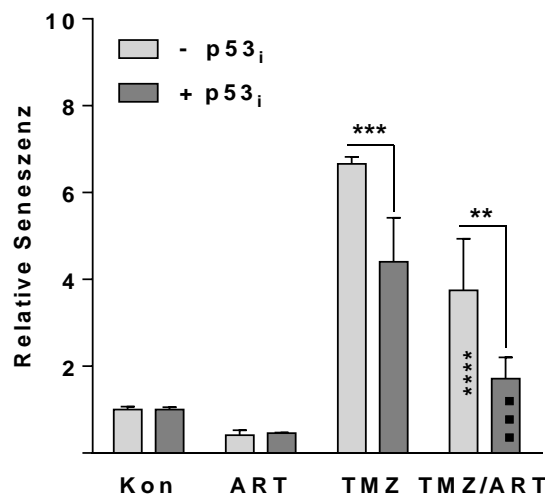


Abb. 33 Einfluss der ART-Nachbehandlung auf die TMZ-induzierte Seneszenz nach p53-Inhibition. Durchflusszytometrische Analyse der C₁₂FDG-Färbung 144 h nach Behandlung (50 μM TMZ und/ oder 15 μg/ml ART). p53-Hemmung (p53_i) durch Pifithrinα vor der jeweiligen Behandlung. Abgebildet sind die mittleren Intensitäten +/- SD der C₁₂FDG-positiven Zellen aus drei unabhängigen Experimenten. Das C₁₂-FDG Signal wurde auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert, die statistische Signifikanz zwischen TMZ vs. TMZ/ART der p53-profizienten (***) und p53-inhibierten Zellen (***), sowie TMZ vs. TMZ/p53_i und TMZ/ART vs. TMZ/ART/p53_i wurde mittels einfaktorieller ANOVA und dem Post-hoc-Test nach Šidák berechnet: ***p* ≤ 0,01; ***/** *p* ≤ 0,001; **** *p* ≤ 0,0001.

Ein weiteres Schlüsselprotein, das die Induktion der Seneszenz beeinflussen könnte, ist PTEN. Um p53 als Modulator auszuschließen, wurde der Einfluss der ART-Nachbehandlung auf die TMZ-induzierte Seneszenz in p53-mutierten Zellsystemen untersucht. Die untersuchten Zelllinien LN428, LN18, LN308 und U251 unterscheiden sich in ihren PTEN-Status. Die LN428- und LN18- Zellen sind wildtypisch (wt) für PTEN, LN308- und U251-Zellen mutiert (mt). Die Behandlung und Analyse erfolgte analog zu den vorangegangenen Experimenten, die Ergebnisse wurden auf die jeweilige Kontrolle normalisiert (Abb. 34).

Eine TMZ-induzierte Seneszenz (dunkelgraue Balken) ist auch im p53mt-System nachweisbar. Einzige Ausnahme stellen hierbei die LN18-Zellen (Abb. 34 B) dar. Die ermittelte relative Seneszenz bewegte sich unbeeinflusst durch Einzel- oder Kombinationsbehandlung auf Kontrollniveau. Die LN428-Zellen (Abb. 34 A) hingegen zeigten tendenziell ein bekanntes Untersuchungsergebnis: TMZ erhöhte das Seneszenzlevel, die ART-Einzelbehandlung (hellgraue Balken) beeinflusste dieses nicht, während die ART-Nachbehandlung (schwarze Balken) die TMZ-induzierte Seneszenz reduzierte. Die PTEN-mt Linien LN308 (Abb. 34 C) und U251 (Abb. 34 D) ähneln in ihrem seneszenten Ansprechen den U87MG-Zellen. Zwar vermittelte

die TMZ-Behandlung eine Induktion der Seneszenz, jedoch blieb diese durch eine ART-Nachbehandlung unbeeinflusst. Da beide *PTEN*-mt-Linien ein im Vergleich zu den anderen untersuchten Glioblastomzellen vermindertes Ansprechen in Bezug auf die Seneszenz zeigten und auch die U87MG-Zellen ein *PTEN*-mt Status aufweisen, wurde dies genauer untersucht. In einem *PTEN*-*knockdown*-System wurde exemplarisch in LN229-Zellen der Einfluss der ART-Nachbehandlung auf die TMZ-induzierte Seneszenz überprüft. Die stabile Herunterregulation des *PTEN*-Proteins wurde mittels der Transfektion von sh-RNA erreicht und durch einen *PTEN*-Westernblot (Abb. 35 A) bestätigt.

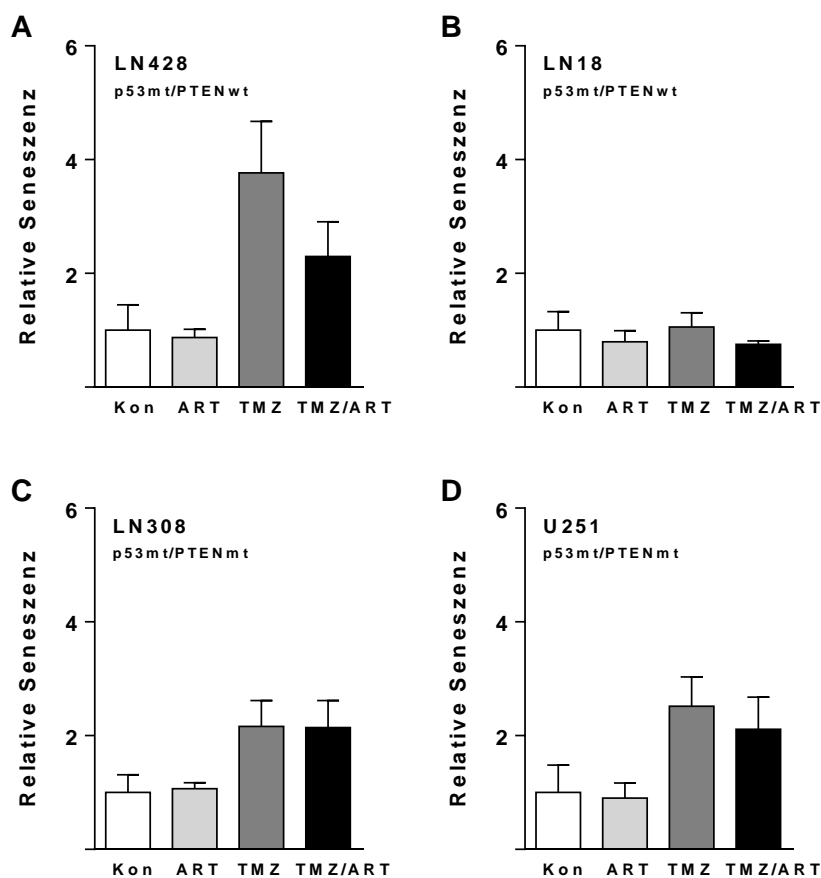


Abb. 34 Einfluss des *PTEN*-Status auf die TMZ-induzierte Seneszenz und deren ART-Nachbehandlung. Durchflusszytometrische Analyse der C_{12} FGD-Färbung 144 h nach Behandlung (50 μ M TMZ und/ oder 15 μ g/ml ART). Abgebildet sind die mittleren Intensitäten \pm SD der C_{12} FDG-positiven Zellen aus drei unabhängigen Experimenten. Das C_{12} -FDG Signal wurde auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert.

Im Vergleich zur Transfektionskontrolle (pS-empty) war kein spezifisches *PTEN*-Protein exprimiert. Des Weiteren wurde auch überprüft, ob diese Transfektion den p53-Status bzw. die Aktivierung des Proteins beeinflusst. Hierzu wurden die LN229-*PTEN*sh-Zellen für 24 h mit TMZ (50 μ M) behandelt und die Gesamtzellextrakte mittels Westernblot analysiert

(Abb. 35 B). Verglichen zur unbehandelten Kontrolle (Kon) induzierte die TMZ-Behandlung Phosphorylierungen an Serin 15, respektive Serin 46, des p53-Proteins. Dies lässt auf die Aktivierung von p53 schließen, was auch die Stabilisierung des p53-Proteins bestätigte.

Die Analyse der Seneszenz erfolgte durchflusszytometrisch. Analog zu den vorangegangenen Experimenten wurden die pS-empty- und PTENsh-Zellen mit TMZ und/ oder ART behandelt und nach 144 h untersucht. Beide Zellsysteme zeigten eine starke TMZ-induzierte Seneszenz (Abb. 35 C).

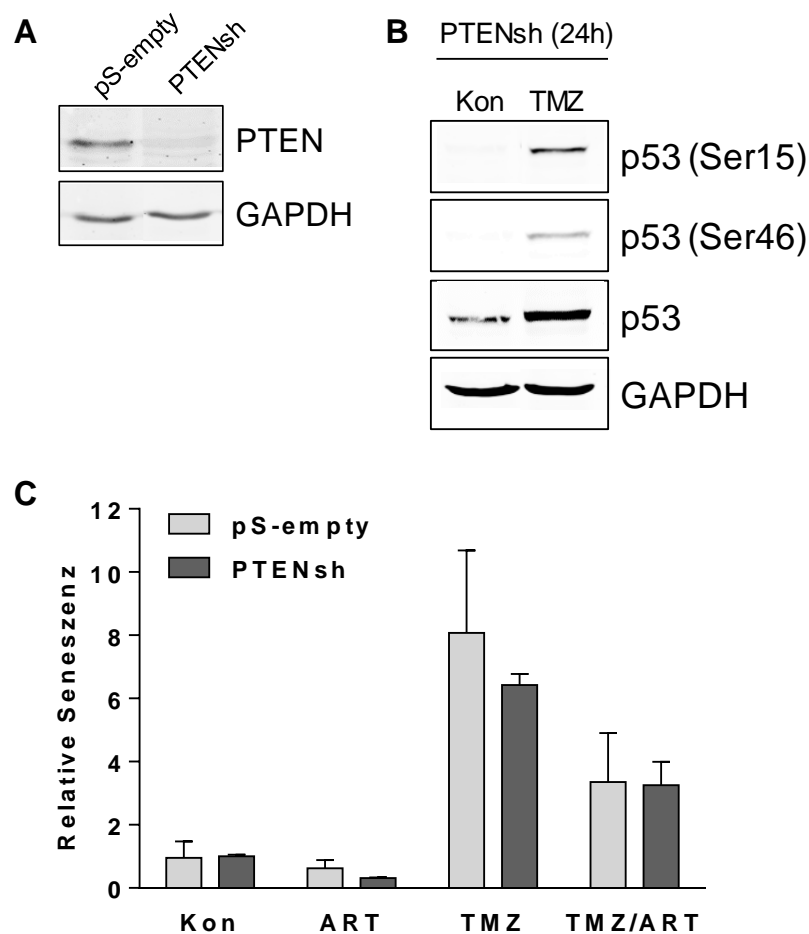


Abb. 35 Einfluss der ART-Nachbehandlung auf die TMZ-induzierte Seneszenz im PTEN-knockdown-System. Der stabile PTEN-knockdown wurde in LN229-Zellen durch Transfektion von PTEN-shRNA erreicht und mittels Westernblotanalyse überprüft (A). Die Aktivierung (=Phosphorylierung von p53 an Serin 15/ Serin 46) von p53 durch TMZ (50 μ M) ist unbeeinflusst und wurde ebenfalls durch Westernblotanalysen bestätigt (B). GAPDH diente als Ladekontrolle. Die Seneszenz wurde durchflusszytometrisch via C_{12} FDG-Färbung 144 h nach der Behandlung (50 μ M TMZ und/ oder 15 μ g/ml ART) bestimmt (C). Abgebildet sind die mittleren Intensitäten +/- SD der C_{12} FDG-positiven Zellen der Transfektionskontrollen (pS-empty, hellgraue Balken) und der PTEN-sh-Zellen (dunkelgraue Balken) aus drei unabhängigen Experimenten. Das C_{12} -FDG Signal wurde auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle normalisiert.

Verglichen zur jeweiligen Kontrolle war diese in den Kontrollzellen 8-fach (pS-empty, hellgraue Balken) bzw. in den *Knockdown*-Zellen 6,5-fach (PTENsh, dunkelgraue Balken) erhöht. Das seneszente Ansprechen der ART-Behandlung befand sich auf Kontrollniveau. Interessanterweise zeigte die Kombinationsbehandlung tendenziell auch hier eine Reduktion der TMZ-induzierten Seneszenz.

Zusammengefasst läßt sich feststellen, dass die ART-Nachbehandlung die TMZ-induzierte Seneszenz in den untersuchten Glioblastomzelllinien LN229, A172 sowie den GSCs G112SP-Zellen reduziert. U87MG-Zellen zeigten zwar eine TMZ-vermittelte Induktion, jedoch ließ sich diese nicht durch eine ART-Nachbehandlung modulieren. Die Tumorsuppressoren p53 und PTEN scheinen dies entscheidend zu beeinflussen, wobei p53 verglichen zu PTEN zweitrangig zu agieren scheint.

3.1.10. Einfluss der Inhibition von Ferroptose und ER-Stress auf den Behandlungs-induzierten Zelltod

Es ist bekannt, dass ART eine Eisen- und ROS-abhängige Form der programmierten Nekrose, die sog. Ferroptose, induziert. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass ART den ER-Stress modulieren könnte und daraus resultierend die Zellhomöostase oder damit zusammenhängende autophagy Prozesse. Um diesen Einfluss zu verifizieren, wurde nach selektiver pharmakologischer Inhibition dieser Prozesse der Zelltod in LN229-, A178- und U87MG-Zellen mittels Annexin V/PI-Doppelfärbung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Zellen wurden zur Inhibition der Ferroptose mit Ferrostatin-1 (Fer-1) und zur Inaktivierung des ER-Stresses mit Salubrinal (Sal) behandelt. Dies erfolgte jeweils 1 h vor der Behandlung mit TMZ und/ oder ART und wurde zur Aufrechterhaltung der Inhibition alle 48 h erneuert. Der Zelltod, respektive die Summe aus Apoptose und Nekrose, wurde 144 h nach der TMZ-Behandlung ermittelt (Abb. 36).

Bereits die Hemmung des ER-Stresses durch Sal (dunkelgraue Balken) bedingte eine Reduktion des TMZ-induzierten Zelltods, der bei der Untersuchung der U87MG-Zellen (Abb. 36 C) im Vergleich zur nicht inhibierten Kontrolle (weiße Balken) signifikant war.

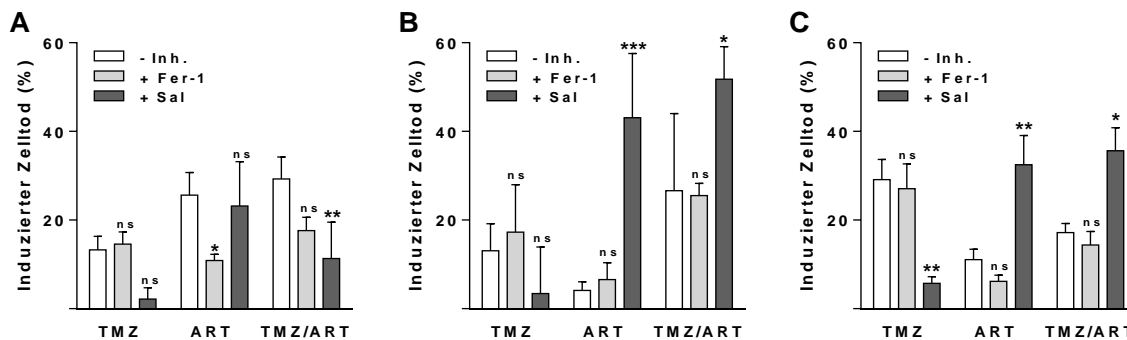


Abb. 36 Einfluss der Ferroptose und des ER-Stresses auf den TMZ und/oder ART-induzierten Zelltod in Glioblastomzellen. Dargestellt ist der induzierte Zelltod der LN229- (A), A172- (B) und U87MG-Zellen (C) 144 h nach der Behandlung mit TMZ (50 μ M) und/oder ART (15 μ g/ml). Vor der jeweiligen Behandlung wurde die Ferroptose mittels Fer-1 (hellgraue Balken) und der ER-Stress mittels Sal (dunkelgraue Balken) inhibiert. Der Zelltod wurde mittels Annexin V/PI-Doppelfärbung durchflusszytometrisch bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten, Signifikanzanalyse mittels einfaktorieller ANOVA und dem Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest nach Šidák: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, ns=nicht signifikant.

Die Hemmung der Ferroptose mittels Fer-1 (hellgraue Balken) hatte in den untersuchten Zelllinien keinen Einfluss auf den TMZ-induzierten Zelltod. Im Gegensatz dazu scheint dieses Zellschicksal zelllinienspezifisch durch ART induzierbar zu sein: Wurde die Ferroptose in LN229-Zellen (Abb. 36 A) spezifisch durch Fer-1 inhibiert, sank der ART-induzierte Zelltod. Vergleichbares konnte weder in A172- (Abb. 36 B) noch U87MG-Zellen (Abb. 36 C) beobachtet werden. Wurde hingegen der ER-Stress gehemmt, induzierte die ART-Einzelbehandlung einen signifikanten Anstieg des Zelltods in A172- und U87MG-Zellen von 4 auf 43% bzw. von 11 auf 32,5%. Die Inhibition hatte in LN229-Zellen keinen Einfluss auf den ART-induzierten Zelltod. Auf die Kombinationsbehandlung hatte das Ausschalten der Ferroptose und des ER-Stresses ebenfalls zelllinienspezifische Auswirkungen. Während die Hemmung der Ferroptose keine signifikanten Unterschiede zu den nicht inhibierten Behandlungskontrollen zeigte, bedingte die Hemmung des ER-Stresses in LN229-Zellen eine signifikante Reduktion, in A172- und U87MG-Zellen einen deutlichen Anstieg des Zelltods.

Zusammengefasst konnte lediglich für LN229-Zellen bestätigt werden, dass ART Ferroptose induziert. Interessanterweise konnte weiterhin beobachtet werden, dass der TMZ-induzierte Zelltod auch durch ER-Stress beeinflussbar ist und in allen untersuchten Zelllinien reduziert werden kann. Für LN229-Zellen war dieser protektive Effekt auch noch nach Kombination mit ART signifikant. Die Hemmung mit Sal zeigte in A172- und U87MG-Zellen hingegen einen stark sensitivierenden Effekt, der vermutlich auf die ART-Behandlung zurückzuführen ist.

3.1.11. Einfluss der ART-Behandlung auf den TMZ-induzierten therapeutischen Effekt *in vivo*

Nachdem bereits *in vitro* gezeigt werden konnte, dass die ART-Nachbehandlung einen sensitivierenden Effekt auf den TMZ-induzierten Zelltod ausübt, sollte abschließend auch der therapeutische Einfluss der ART-Behandlung auf den TMZ-Effekt untersucht werden. Hierzu wurde ein humanes Tumor-Xenograft-Modell genutzt. In athymische BALB/c Nacktmäuse wurden U87MG-Zellen subkutan injiziert und das Tumorstadium beobachtet. Hatten die Tumore ein definiertes Ausgangsvolumen erreicht, begann die Therapie. Verglichen wurde das mittlere Tumorgesamtvolumen folgender Behandlungsgruppen: 1) Die Kontrollgruppe (Kon, schwarz), 2) die TMZ-Gruppe (rot), 3) die ART-Gruppe (grau) und 4) die TMZ/ART-Gruppe (grün). Die Tiere wurden über einen Behandlungszeitraum von 57 Tagen beobachtet, die Quantifizierung des Tumorstadiums wurde auf das Anfangsvolumen normalisiert und als relatives Tumorstadium dargestellt (Abb. 37).

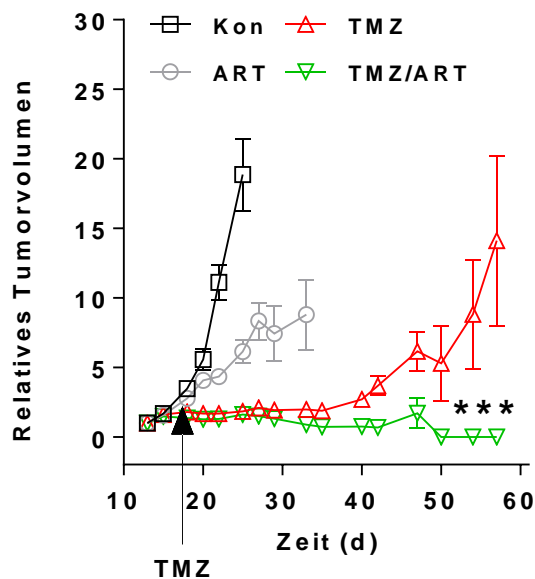


Abb. 37 Einfluss der ART-Behandlung auf das Tumorstadium *in vivo*. In U87MG-Xenograft-Experimenten wurde der Einfluss von TMZ und/ oder ART auf das Tumorstadium untersucht. U87MG-tumortragende BALB/c Nacktmäuse wurden gruppiert (mind. 5 Tiere/ Gruppe) und einmalig mit TMZ (200 mg/ kg KG; rot), ART (1 mg/ ml; grau) oder in Kombination (grün) behandelt. Die TMZ-Applikation erfolgte intraperitoneal, die ART-Gabe kontinuierlich über das Trinkwasser. Die Kontrollgruppe (Kon, schwarz) erhielt die entsprechenden Lösungsmittel der Therapeutika. Dargestellt ist das relative Tumorstadium als Funktion der Zeit: Angegeben sind die Mittelwerte +/- SEM des Tumorgesamtstadiums innerhalb der Behandlungsgruppe. Die Volumina wurden auf das jeweilige Anfangsvolumen relativiert. Der statistische Unterschied zwischen der TMZ- (rot) und Kombinationsgruppe (grün) wurde mittels des Mann-Whitney-Tests berechnet: *** $p \leq 0,001$. Dieses Experiment wurde von [redacted] und [redacted] durchgeführt.

Die TMZ-Applikation (200 mg/ kg KG) erfolgte einmalig intraperitoneal, während ART (1 mg/ml) kontinuierlich über das Trinkwasser verabreicht wurde. Da ART sehr bitter schmeckt, wurde dem Trinkwasser 2% Saccharose zugesetzt. Bereits die Einzelbehandlungen mit TMZ (rot) oder ART (grau) zeigten im Vergleich zur Kontrolle (schwarz) ein verlangsamtes Tumorwachstum, welches durch TMZ effektiver gehemmt wurde. Eine noch deutlichere Verlangsamung bzw. sogar eine Reduktion des Tumolvolumens wurde durch die Kombination von TMZ und ART (grün) erreicht. Die Tumore sind im Vergleich zur TMZ-Gruppe signifikant kleiner und korrelieren mit einem längeren Überleben der behandelten Tiere.

3.2. Gezielte Hemmung der homologen Rekombination-Reparatur: Pharmakologische HR-Inhibitoren in der *second-line*-Therapie maligner Gliome

3.2.1. Charakterisierung des *in vitro*-Modells

In folgenden *in vitro*-Untersuchungen wurden neben den bereits aus Kapitel 3.1 bekannten p53-Wildtyp Glioblastomzelllinien LN229 und U87MG, auch die p53-mutierten LN308-Zellen verwendet. Um den p53-Status zu verifizieren, wurde die Aktivierung des p53-Proteins durch die Behandlung mit ACNU (50 μ M) bzw. CCNU (30 μ M) induziert und die Phosphorylierung am Serin 15 mittels Westernblot in Gesamtzellextrakten 24 h nach der Behandlung analysiert (Abb. 38 A). Für LN229- und U87MG-Zellen konnte die Aktivierung des p53 durch die Zytostatikabehandlung nachgewiesen werden, wobei die LN229-Zellen im Vergleich zu den U87MG-Zellen eine stärkere Phosphorylierung zeigten. Ebenfalls nachweisbar war die p53-Expression. Die LN308-Zellen hingegen zeigten weder eine Aktivierung, noch Stabilisierung des p53-Proteins, was auf einen mutierten p53-Status schließen lässt. Ferner wurden die basale PTEN-Expression untersucht, welche lediglich in den LN229-Zellen detektiert werden konnte (Abb. 38 B).

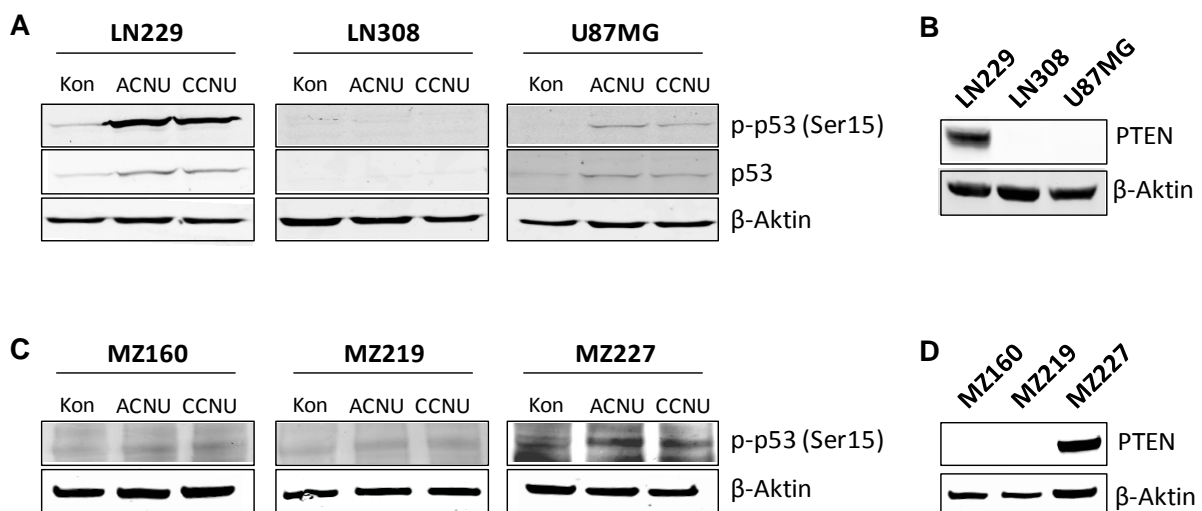


Abb. 38 p53- und PTEN-Status der Glioblastom- und Patientenzelllinien. Die Aktivierung von p53 (=Phosphorylierung des Serin-15 am p53) 24 h nach Behandlung (50 μ M ACNU, 30 μ M CCNU) sowie die basale PTEN-Expression wurden in Gesamtzellextrakten der LN229-, LN308- und U87MG-Zellen untersucht (A und B). Analog erfolgte die Analyse in den Patientenzelllinien MZ160, MZ219 und MZ227 (C und D). β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Neben den kommerziell erhältlichen Zelllinien wurden einige Aspekte auch unter Verwendung von primären Gliom-Patientenlinien untersucht. Der p53- und PTEN-Status der MZ160-, MZ219- und MZ227-Zellen wurde analog zu den etablierten Linien untersucht. Eine Zytostatika-induzierte Aktivierung von p53 konnte lediglich für die MZ227-Zellen gezeigt werden (Abb. 38 C). Selbige waren auch PTEN-profizient, während für die MZ160- und MZ219-Zellen kein PTEN-Protein nachgewiesen werden konnte (Abb. 38 D).

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Charakterisierung der verwendeten Zelllinien im Kontext DNA-Schäden-induzierender Agenzien, ist der MGMT-Status. Die MGMT-Aktivität, sowie der *MGMT*-Promotormethylierungsstatus und die *mgmt*-Expression wurden bereits im Vorfeld untersucht [273]: LN229-, LN308-, U87MG- und MZ227-Zellen sind promotormethyliert und besitzen keine bis sehr geringe (4 fmol/mg) MGMT-Aktivität. Die *MGMT*-Promotoren der Linien MZ160 und MZ219 sind unmethyliert und besitzen eine MGMT-Aktivität von 86 bzw. 45 fmol/mg. Eine Inhibition des MGMT-Proteins durch O^6 -Benzylguanin (O^6 -BG) und damit ein Ausschluss der Reparatur der O^6 CIETG-Läsion durch MGMT, wird für diese Zelllinien empfohlen.

3.2.2. CCNU induziert Interstrang-Crosslinks in Abwesenheit von MGMT

Wie in der Literatur beschrieben, führt CCNU in Abwesenheit von MGMT zur Ausbildung von Interstrang-Crosslinks (ICL), die während der Replikation das Fortschreiten der Replikationsgabel blockieren und somit S-Phase-spezifisch zur Entstehung von DSBs beitragen können. Ob diese CCNU-induzierten ICLs auch in den ausgewählten Glioblastomzelllinien LN229, LN308 und U87MG ausgebildet werden, wurde mittels modifizierter SCGE überprüft. Die in Abb. 39 dargestellten Ergebnisse bestätigten diese Annahme.

Repräsentative Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen einer unbehandelten LN229-Zelle und einer entsprechenden Positiv-Kontrolle (mit 8 Gy bestrahlt) sind in Teilabb. 39 A dargestellt. Bereits 24 h (Abb. 39 B) nach der Behandlung mit CCNU (50 μ M) verringerte sich die mittlere *Tail*-Intensität der durch IR-induzierten Kometen signifikant.

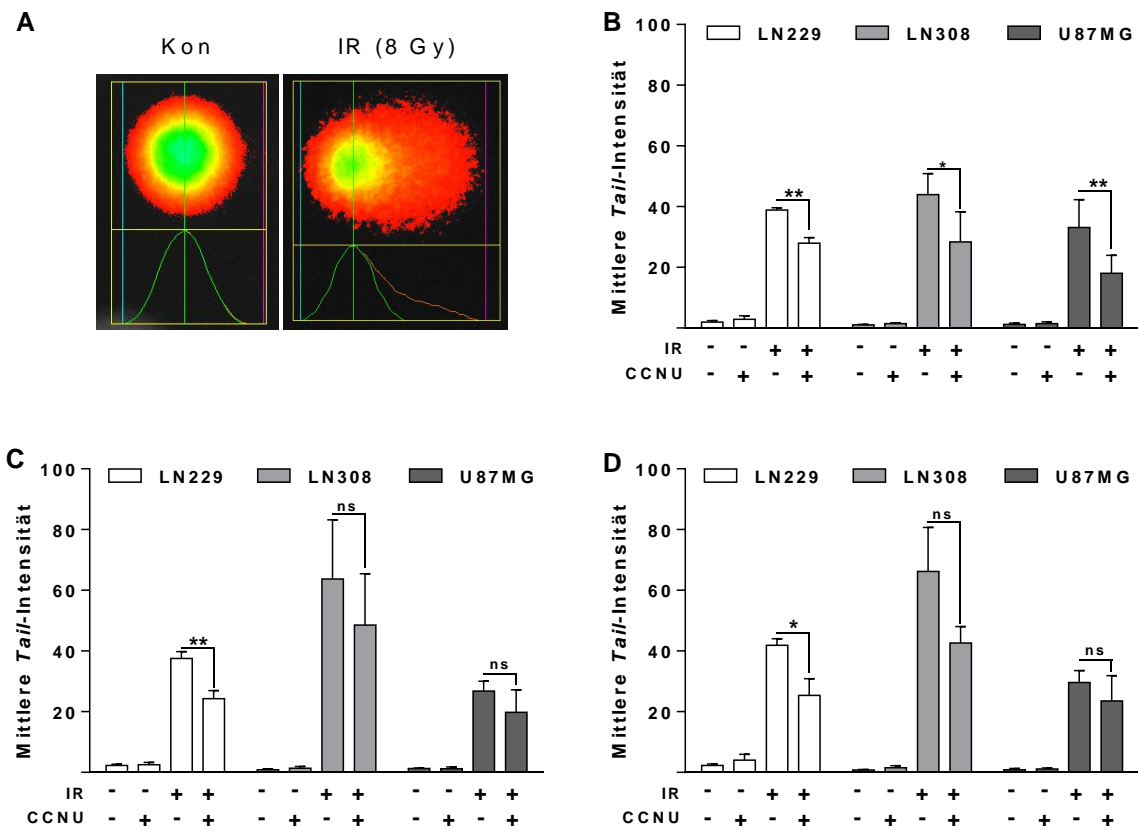


Abb. 39 CCNU-induzierte Interstrang-Crosslinks (ICL) in Glioblastomzellen. Mittels modifizierter SCGE wurden CCNU-induzierte ICL in den LN229-, LN308- und U87MG-Zellen fluoreszenzmikroskopisch detektiert. Mikroskopische Aufnahmen einer unbehandelten LN229-Zelle (Kontrolle) und einer Positiv-Kontrolle (8 Gy) sind exemplarisch in (A) gezeigt. Die Zellen wurden mit 50 μ M CCNU (1 h) behandelt und zur Induktion von ESB unmittelbar vor der Ernte mit 8 Gy bestrahlt. Die ICL wurden 24 h (B), 48 h (C) und 72 h (D) nach CCNU-Behandlung untersucht. Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte \pm SD der Tail-Intensitäten aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels einfaktorieller ANOVA und dem Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest nach Šidák berechnet: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, ns=nicht signifikant.

Dieser Vergleich der CCNU-vorbehandelten und anschließend bestrahlten Zellen mit Zellen, die lediglich der IR ausgesetzt waren, zeigt indirekt die Ausbildung der CCNU-induzierten ICL. Diese persistierten in LN229-Zellen (weiße Balken) signifikant über die Zeit (Abb. 39 C: 48 h und Abb. 39 D: 72 h). Die Ausbildung der CCNU-induzierten ICLs in LN308-Zellen (hellgraue Balken) und U87MG-Zellen (dunkelgraue Balken) zeigte sowohl nach 48 h (Abb. 39 C) als auch nach 72 h (Abb. 39 D) lediglich eine zu LN229-Zellen vergleichbare Tendenz, aber keinen gesicherten, signifikanten Unterschied.

3.2.3. Die eingesetzten pharmakologischen Hemmstoffe der homologen Rekombination sind effektiv in Glioblastomzellen

Die Effizienz der eingesetzten pharmakologischen Hemmstoffe B02, Mirin und RI-1 auf die Inhibition der homologen Rekombination-Reparatur (HRR), wurde mittels eines HR-Reparatur-Tests analysiert. Hierzu wurde überprüft, ob LN229-Zellen einen spezifisch induzierten DSB *via* HRR in An- bzw. Abwesenheit der Inhibitoren reparieren. Erfolgt die DSB-Reparatur mittels der HR, exprimieren die Zellen GFP und können so durchflusszytometrisch quantifiziert werden. Eine vorübergehende pharmakologische Hemmung von DNA-PK (DNA-PK_i) und somit das Abschalten des alternativen NHEJ-Reparaturweges, wurde als Positiv-Kontrolle für diesen Test genutzt.

Repräsentative Punktdiagramme sind in Abb. 40 A dargestellt und zeigen einen Rückgang der GFP-positiven Zellen (grüne Population) in Anwesenheit der Rad51-Inhibitoren bzw. des MRE11-Hemmstoffs.

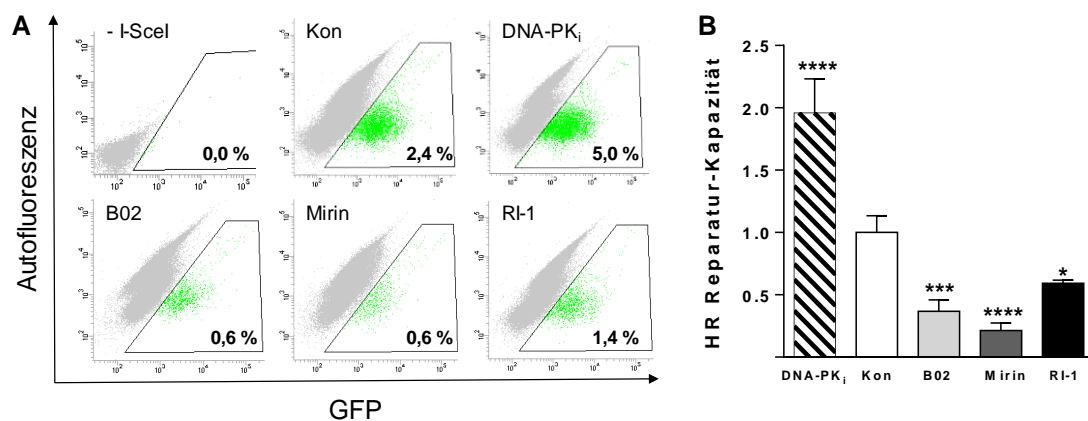


Abb. 40 Einfluss der pharmakologischen HR-Inhibitoren auf die Reparatur-Kapazität der homologen Rekombination. Mittels des HR-Reparatur-Tests wurde die entsprechende Reparatur-Kapazität eines spezifisch durch I-SceI induzierten DNA-Doppelstrangbruchs in LN229-Zellen und der Einfluss von HR_i auf dessen Reparatur untersucht. **(A)** Repräsentative Darstellung der am Durchflusszytometer generierten Punktdiagramme. Aufgetragen ist das zu untersuchende GFP-Signal gegen die Autofluoreszenz. Die Teilmenge der GFP-positiven (= *via* HR reparierte DSB) Population (grün) wurden mittels eines Gates markiert und in **(B)** entsprechend der HR-Hemmung mittels B02, Mirin und RI-1 quantifiziert dargestellt. Die Analyse wurde 72 h nach der Transfektion mit I-SceI durchgeführt. Die simultane Inkubation mit DNA-PK_i (1 μ M) diente als Positiv-Kontrolle (Depletion von DNA-PK, somit vorübergehendes Abschalten des NHEJ-Reparaturweges). Abgebildet sind die auf die Kontrolle normalisierten Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten, deren Signifikanz mittels einfaktorieller ANOVA und dem Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest nach Šidák berechnet wurde: * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

Die entsprechende Quantifizierung (Abb. 40 B) dieser Population 72 h nach Induktion des DSB, bestätigte die signifikante Verminderung der HR-Reparatur-Kapazität in Anwesenheit der Inhibitoren. Die Wirksamkeit der Hemmstoffe im untersuchten Zellsystem konnte zuverlässig verifiziert werden.

3.2.4. Der durch CCNU und die Hemmung der HR vermittelte Effekt auf die DNA-Replikation

Um zu überprüfen, ob die O^6 CIG-vermittelten ICLs tatsächlich in der Lage sind, das Fortschreiten der Replikationsgabel zu verhindern und somit einen Einfluss auf die Synthesephase erreichen, wurde zunächst mittels Zellzyklusanalysen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 41 dargestellt. Die Untersuchung zum frühen Zeitpunkt (6 h nach Behandlung, linke Spalte) zeigte in keiner der untersuchten Zelllinie (Abb. 41 A: LN229, C: LN308, E: U87MG) einen signifikanten Unterschied der Zellzyklusphasen nach der Behandlung mit CCNU (30 μ M) und/ oder der Inhibitoren (B02: 10 μ M, Mirin: 25 μ M, RI-1: 20 μ M).

Vielmehr zeigten sie ein gewöhnliches Zellzyklusprofil: LN229-Zellen befanden sich, unbeeinflusst durch die Behandlung, im Mittel zu ca. 54 % in der G1-, zu ca. 14 % in der S- und etwa 30 % in der G2-Phase. Ein sehr geringer Anteil (ca. 2 %) zeigte ein fragmentiertes DNA-Profil (SubG1). Ähnlich verhielt es sich für die LN308- (Abb. 41 C) und U87MG-Zellen (Abb.41 E). Etwa 57-69 % bildeten die G1-Fraktion, 16 % (LN308) bzw. 10 % (U87MG) befanden sich in der S-Phase, 26 % (LN308) bzw. 21 % in der G2-Phase des Zellzyklus. Dies änderte sich jedoch bei Betrachtung der Zellzyklusverteilung 16 h nach Behandlung (rechte Spalte). Durchgängig für alle untersuchten Zellen (Abb. 41 B: LN229, D: LN308, F: U87MG) war im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle (Kon) nach CCNU-Behandlung eine signifikante Verschiebung der G1-Phase hin zur G2-Phase zu erkennen. Die G1-Population verringerte, die Gesamtpopulation der G2-Phase erhöhte sich. Im Speziellen halbierte sich in etwa die G1-Population der LN229-Zellen (Abb. 41 B) von 64 % auf 33 % nach CCNU-Behandlung, die der LN308-Zellen (Abb. 41 D) von 60 % auf 38 % und die der U87-Zellen (Abb. 41 E) von 70 % auf 40 %. Die Anteile der G2-Phase-Zellen stiegen entsprechend von 30 % auf 48 % (LN229-Zellen), von 23 % auf 40 % (LN308-Zellen) und von 22 % auf 42 % (U87-Zellen).

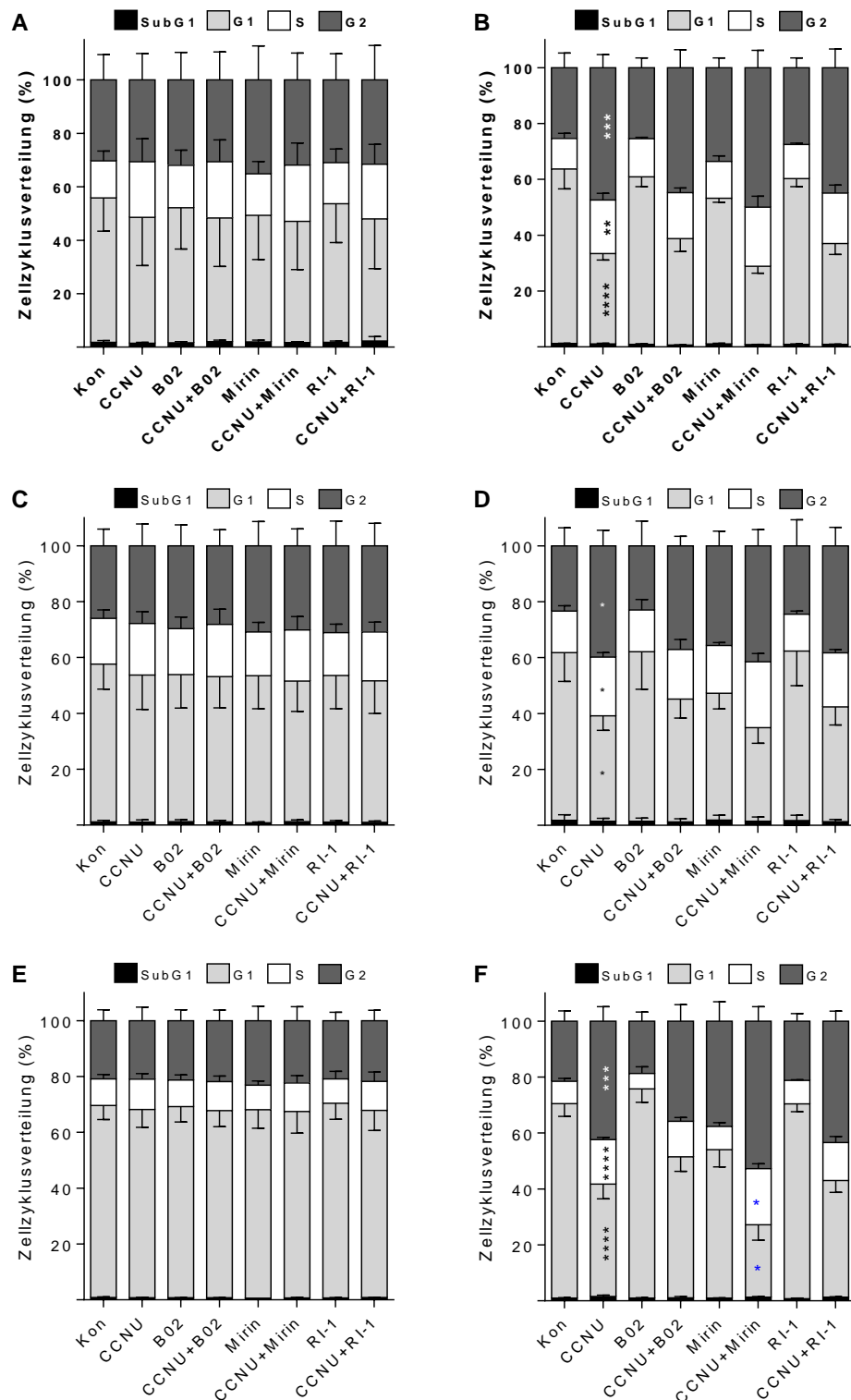


Abb. 41 Einfluss der CCNU-Behandlung und/ oder HR-Inhibition auf die Zellzyklusverteilung der LN229-, LN308- und U87MG-Zellen. Mittels PI-Färbung wurde die Zellzyklusverteilung in fixierten Glioblastomzellen 6 h (linke Spalte) und 16 h (rechte Spalte) nach Behandlung mit 30 μ M CCNU und/ oder HR_i (B02: 10 μ M, Mirin: 25 μ M, RI-1: 20 μ M) durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Zellzyklusphasen +/- SD aus drei unabhängigen Experimenten mit LN229- (**A und B**), LN308- (**C und D**) und U87MG-Zellen (**E und F**). Signifikanzanalyse zwischen den Zellzyklusphasen der Kon (Kontrolle) und CCNU (*), sowie CCNU und Kombinationsbehandlungen (*) mittels ANOVA und Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest nach Šidák: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Auch die jeweiligen Anteile an S-Phase-Zellen nahmen signifikant zu (LN229: von 11 % auf 19 %; LN308: von 15 % auf 21 %; U87MG: von 8 % auf 16 %).

Ähnliches war auch nach den Kombinationsbehandlungen zu beobachten, wobei der Effekt keinen signifikanten Unterschied zur Verteilung der CCNU-Einzelbehandlung zeigte. Eine Ausnahme stellte jedoch die CCNU-Mirin-Kombinationsbehandlung der U87MG-Zellen dar. Im Vergleich zur CCNU-Einzelbehandlung verringerte sich der Anteil der G1-Fraktion (von 40 % auf 26 %) signifikant, die Population-Anteil der S-Phase-Zellen stieg um 4 %. Die Tendenz, dass die G2-Phasen-Fraktion entsprechend anstieg, wurde beobachtet, zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied. Zusammengefasst zeigte weder die CCNU-Einzel-, noch die Kombinationsbehandlung mit den HR-Inhibitoren einen Zellzykluseffekt auf die untersuchten Glioblastomzellen zu einem frühen Zeitpunkt (6 h). Auch 16 h nach der Behandlung mit CCNU und/ oder den HR-Hemmstoffen war kein signifikanter Anstieg in der SubG1-Population erkennbar, wobei die Zellen nach CCNU-Behandlung aus der G1-Phase auslaufen und nach Durchschreiten der S-Phase in der folgenden G2-Phase arretieren. Dieser Effekt scheint in U87MG-Zellen durch die Kombination mit Mirin steigerbar.

Im weiteren Verlauf wurde auf Einzelzellebene der Einbau des Thymidinanalogons EdU in die DNA nach CCNU-Behandlung und/ oder HR-Inhibition untersucht. Die Ergebnisse dieser fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung sind in Abb. 42 dargestellt.

Die Teilabb. 42 A zeigt repräsentative, konfokale Aufnahmen der LN229-Zellen 16 h nach der Behandlung mit CCNU (30 μ M) und/ oder der HR-Inhibitoren (B02: 10 μ M, Mirin: 25 μ M, RI-1: 20 μ M). Zellen, die EdU während der Replikation in die DNA eingebaut haben, erscheinen grün, die Zellkerne blau. Die Quantifizierung 6 h nach der Behandlung (Abb. 42 B) ergab im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kon) weder für die CCNU- und HR_i-Einzel-, noch für die Kombinationsbehandlungen einen signifikanten Unterschied. Eine signifikante Reduktion des EdU-Signals, demnach auch ein verminderter EdU-Einbau und eine reduzierte Synthesegeschwindigkeit, war erst 16 h nach der CCNU-Behandlung zu beobachten. Die mittlere EdU-Intensität der mit CCNU behandelten Zellen verringerte sich im Vergleich zur Kontrolle um 32 %. Zusätzlich gesteigert, nämlich um weitere 18 bzw. 15 %, wurde dieser proliferationsinhibierende Effekt, indem CCNU zum einen mit B02 oder zum anderen mit Mirin kombiniert wurde. Durch die RI-1-Kombination wurde keine zusätzliche, signifikante Beeinträchtigung der DNA-Synthese nach CCNU-Behandlung festgestellt.

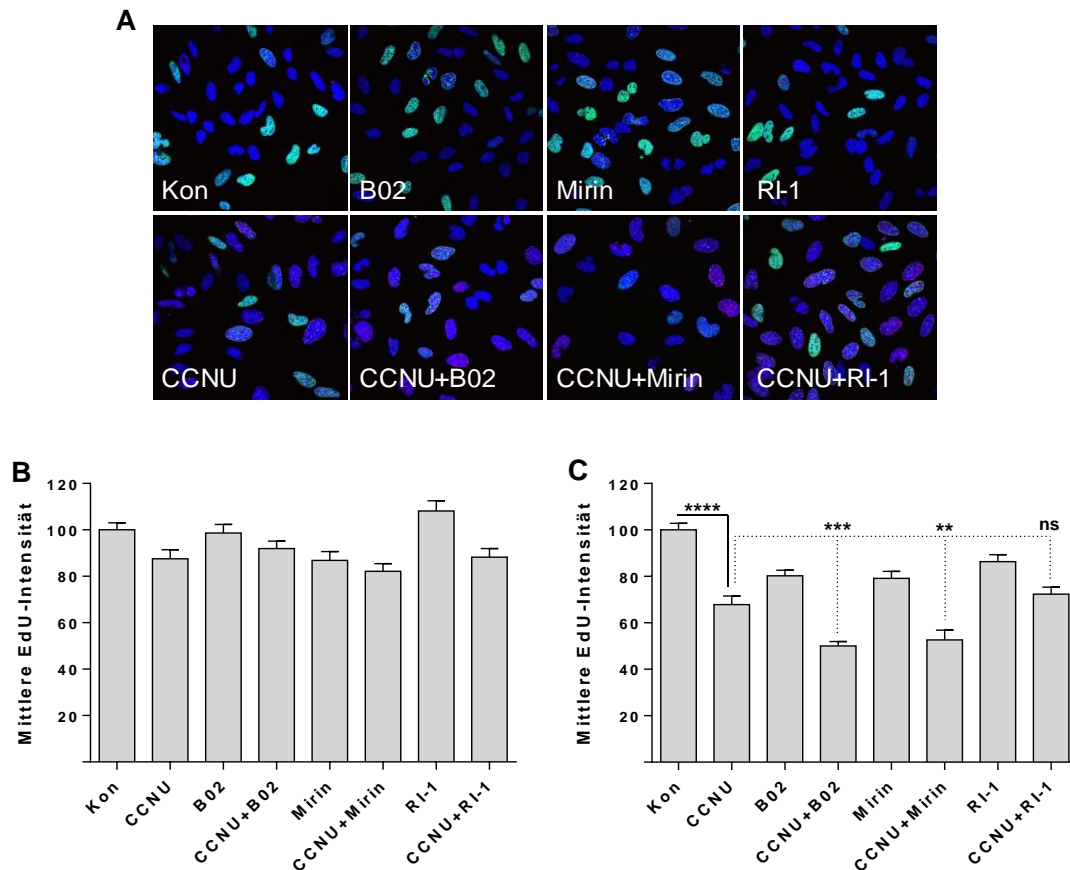


Abb. 42 Einfluss der CCNU-Behandlung und/ oder HR-Inhibition auf die DNA-Synthese und Proliferation. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des EdU-Einbaus in LN229-Zellen nach CCNU-Behandlung (30 μ M, 1 h) und/ oder HR_i (B02: 10 μ M, Mirin: 25 μ M, RI-1: 20 μ M). **(A)** Repräsentative konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen 16 h nach Behandlung: grün=EdU-Einbau, blau=Kernfärbung mit To-Pro-3. Quantifizierung der mittleren EdU-Intensitäten 6 h **(B)** und 16 h **(C)** nach Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM aus drei unabhängigen Experimenten, deren Signifikanz mittels einfaktorier ANOVA und dem Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest nach Šidák berechnet wurde: ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$, ns=nicht signifikant.

Zusammengefasst zeigt die Behandlung mit CCNU nach 16 h einen proliferationshemmenden Effekt, ebenso wie die Inhibitoren selbst, wobei dieser Einfluss auf die DNA-Synthese durch die Kombinationen CCNU+B02 und CCNU+Mirin noch weiter gesteigert wird.

Um nun diese Replikationshemmung genauer zu untersuchen, wurde die Struktur der neu synthetisierten DNA mittels des sog. DNA-Fiber-Tests analysiert. Hierbei wurden verschiedene Thymidinanaloga in die DNA inkorporiert und anschließend visualisiert. Beispiele der verschiedenen DNA-Fiber-Strukturen nebst Definition sind in Abb. 43 A dargestellt. Die Verteilung dieser Fiber-Strukturen wurde 6 h (Abb. 43 B) und 16 h (Abb. 43 C) nach Behandlung mit CCNU (30 μ M) und/ oder der HR-Inhibitoren (B02: 10 μ M, Mirin: 25 μ M, RI-1: 20 μ M) in LN229-Zellen untersucht.

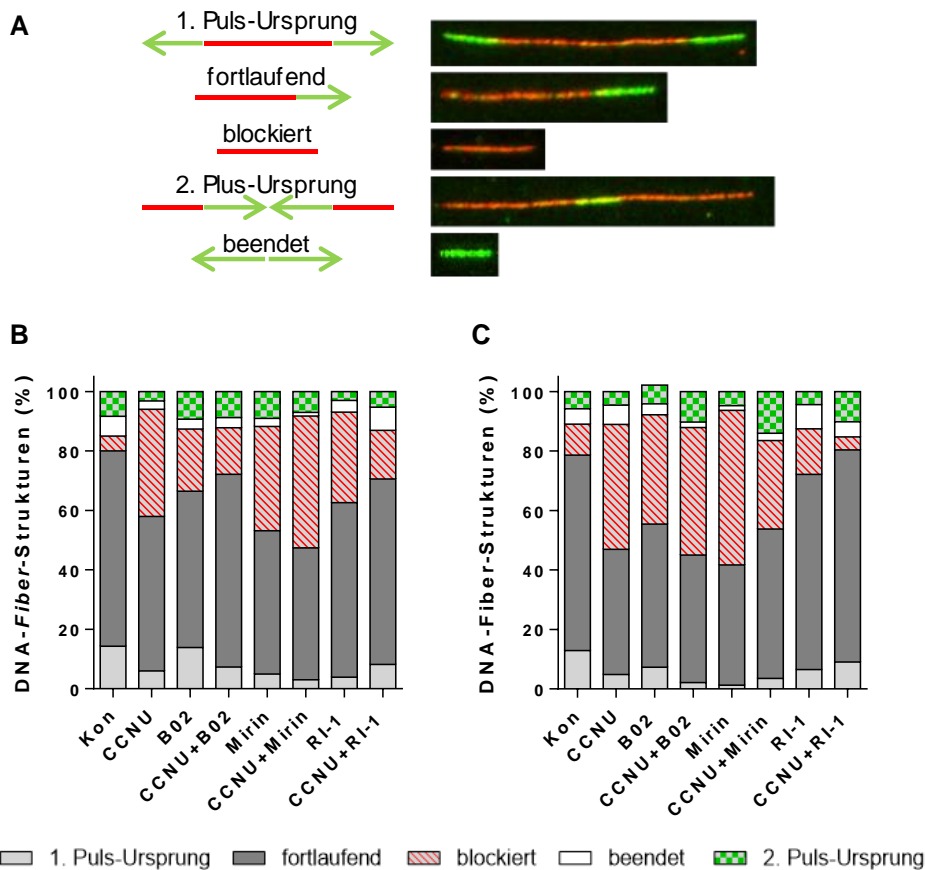


Abb. 43 Mechanistische Untersuchung der Replikationshemmung. Fluoreszenzmikroskopische Analyse der LN229-Zellen nach Behandlung mit CCNU (30 μ M, 1 h) und/ oder HR; (B02: 10 μ M, Mirin: 25 μ M, RI-1: 20 μ M). Mittels DNA-Fiber-Test wurde die Strukturen der replizierten DNA 6 bzw. 16 h nach Behandlung untersucht. **(A)** Schematische Präsentation gefärbter DNA-Fiber und repräsentative Aufnahmen der entsprechenden Fiber-Struktur. Die mittlere prozentuale Verteilung dieser Strukturen aus drei unabhängigen Experimenten ist in **(B)** 6 h und in **(C)** 16 h nach der Behandlung dargestellt. Kon=unbehandelte Kontrolle.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kon) zeigten die Behandlungen bereits 6 h danach (Abb. 43 B) einen deutlichen Anstieg in der Häufigkeit der blockierten Replikationsgabeln (roter Anteil der Balken). Dieser Effekt war 16 h nach der Behandlung (Abb. 43 C) noch ausgeprägter. Auch die Inhibitoren selbst beeinflussten die fortlaufende Replikation, was durch die Applikation von CCNU weiter verstärkt wurde. Interessanterweise scheint die Hemmung von Rad51 durch RI-1 den CCNU-induzierten Replikationsblock aufzuheben. Zusammengefasst zeigen die Daten, dass die CCNU-induzierten DNA-Läsionen- sehr wahrscheinlich ICLs- die Replikation lediglich moderat beeinflussen, die Hemmstoffe B02 und Mirin, nicht aber RI-1, den replikationsinhibierenden Effekt des CCNU verstärken.

3.2.5. Inhibition der homologen Rekombination erhöht den CCNU-induzierten Replikationsstress

Das Blockieren der Replikation während der S-Phase kann schwerwiegenden Folgeschäden einer Zelle initiieren. Das Zusammenbrechen der Replikationsgabel und die daraus resultierende genomische Instabilität ist lediglich nur ein Beispiel dafür. Eines der Schlüsselfaktoren in der Schadensantwort und demnach auch ein Marker für replikativen Stress, ist das *Replication protein A* (RPA), welches an einzel-strängige DNA (engl. *single-stranded DNA*, ssDNA) bindet. In Immunfluoreszenzanalysen wurde die Ausbildung sog. RPA-Foci in den Glioblastomzelllinien LN229, LN308 und U87MG nach der Behandlung mit CCNU (30 μ M) und/ oder der HRR-Inhibitoren (B02: 10 μ M, Mirin: 25 μ M, RI-1: 20 μ M) zeitabhängig untersucht. Repräsentative Fluoreszenzmikroskopaufnahmen (24 h nach Behandlung) sind in Abb. 44 für LN229- (Abb. 44 A), LN308- (Abb. 44 C) und U87MG-Zellen (Abb. 44 E) gezeigt. Die RPA-Foci sind grün, der Zellkern blau dargestellt. Bereits 24 h nach der CCNU-Behandlung wurden in LN229-Zellen (Abb. 44 B, hellgraue Balken) im Mittel 43 RPA-Foci pro Zelle markiert. Wurde CCNU mit den HR-Hemmstoffen kombiniert, zeigte sich ein vergleichbares Bild. Im Mittel wurden 48, 46 und 49 Foci pro Zelle in Kombination mit B02, Mirin und RI-1 nachgewiesen. Letztere persistierten über die Zeit (72 h nach Behandlung, dunkelgraue Balken), während sich die Anzahl der durch CCNU-Einzelbehandlung-induzierten RPA-Foci signifikant verringerte. Ein vergleichbares Ergebnis lieferte auch die Untersuchung der LN308- (Abb. 44 D) und U87MG-Zellen (Abb. 44 E). Initial (24 h nach CCNU-Behandlung, hellgraue Balken) wurden in LN308-Zellen im Mittel 44 RPA-Foci pro Zelle ausgebildet. In Kombination mit den Rad51-Inhibitoren B02 und RI-1 stieg die Anzahl der Foci (52 und 63 Foci/ Zelle) weiter an, während die Hemmung von MRE11 die CCNU-induzierten RPA-Foci (36 Foci/ Zelle) kaum beeinflusste. Die Analyse 72 h nach der Behandlung (dunkelgraue Balken) zeigte auch in den LN308-Zellen eine signifikante Reduktion der CCNU-induzierten RPA-Foci. Lediglich 3 Foci pro Zelle waren detektierbar. Die Inhibitoren B02 und Mirin verhinderten auch in diesem Zellsystem nachweislich den Abbau der Foci und damit wahrscheinlich die Reparatur der ssDNA. Dies konnte in diesem Fall durch RI-1 nicht bestätigt werden. Die analoge Untersuchung der U87MG-Zellen lieferte ein weniger aussagekräftiges Ergebnis. Zwar wurden initial RPA-Foci 24 h nach der Behandlung (hellgraue Balken) induziert, aber im Vergleich zu den bereits untersuchten Zelllinien in abgeschwächter Form (zwischen 11-30 Foci/ Zelle). Auch war kein signifikanter Unterschied über die Zeit erkennbar. Konträr zu den

bisherigen Ergebnissen stieg die Anzahl der CCNU-induzierten RPA-Foci durch die Kombination mit B02 zum später untersuchten Zeitpunkt (72 h, dunkelgraue Balken) signifikant an. Zusammengefasst zeigen die Daten dennoch, dass durch die CCNU-Behandlung RPA-induzierende Läsionen gebildet werden, die HRR-Inhibitoren, besonders B02, jedoch die Reparatur dieser verlangsamen bzw. verhindern.

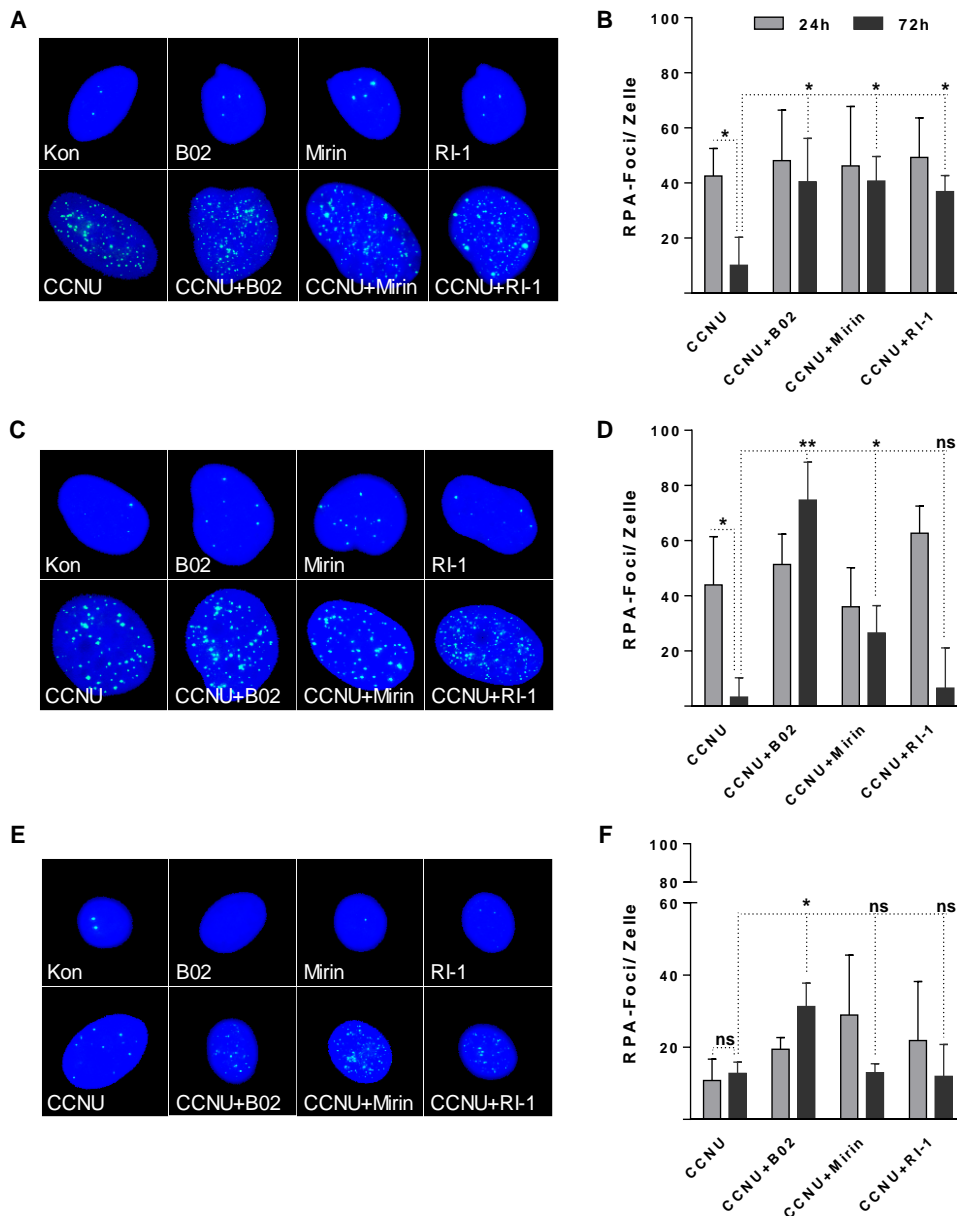


Abb. 44 Einfluss der HR-Inhibition auf die Reparatur-Kinetik der CCNU-induzierten RPA2-Foci. Repräsentative konfokale Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen der LN229- (A), LN308- (C) und U87MG-Zellen (E) 24 h nach der Behandlung mit CCNU (30 μ M, 1 h) und/ oder HR_i (B02: 10 μ M, Mirin: 25 μ M, RI-1: 20 μ M): grün=RPA2-Foci, blau=Kernfärbung mit To-Pro-3. Die entsprechend induzierten RPA2-Foci/ Zelle 24 h (hellgrau) und 72 h (dunkelgrau) nach Behandlung sind rechts quantifiziert: (B) LN229-, (D) LN308- und (F) U87MG-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SD aus drei unabhängigen Experimenten, deren Signifikanz mittels ungepaartem t-Test berechnet wurde: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns=nicht signifikant.

3.2.6. Einfluss der HRR-Inhibition auf die Reparatur-Kinetik der CCNU-induzierten DSBs

Wie bereits erwähnt, können unreparierte ICLs u.a. über das Blockieren der Replikationsgabeln zu DSBs führen. Eine seit Jahren etablierte Methode zum Nachweis von DSBs ist die Detektion von γ H2AX-Foci. Um die Entstehung von CCNU-induzierten DSBs und den Einfluss der HRR-Inhibitoren auf die Reparatur dieser zu analysieren, wurde die Induktion von γ H2AX-Foci immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Hierzu wurden LN229-Zellen nach der Behandlung mit CCNU (30 μ M) und/ oder der HRR-Inhibitoren (B02: 10 μ M, Mirin: 25 μ M, RI-1: 20 μ M) nach 6 bzw. 16 h fixiert und spezifisch gefärbt. Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen sind in Abb 45 A (6 h) und Abb. 45 B (16 h) gezeigt. Die spezifischen γ H2AX-Foci sind rot, die DNA der Zellkerne mittels DAPI blau dargestellt.

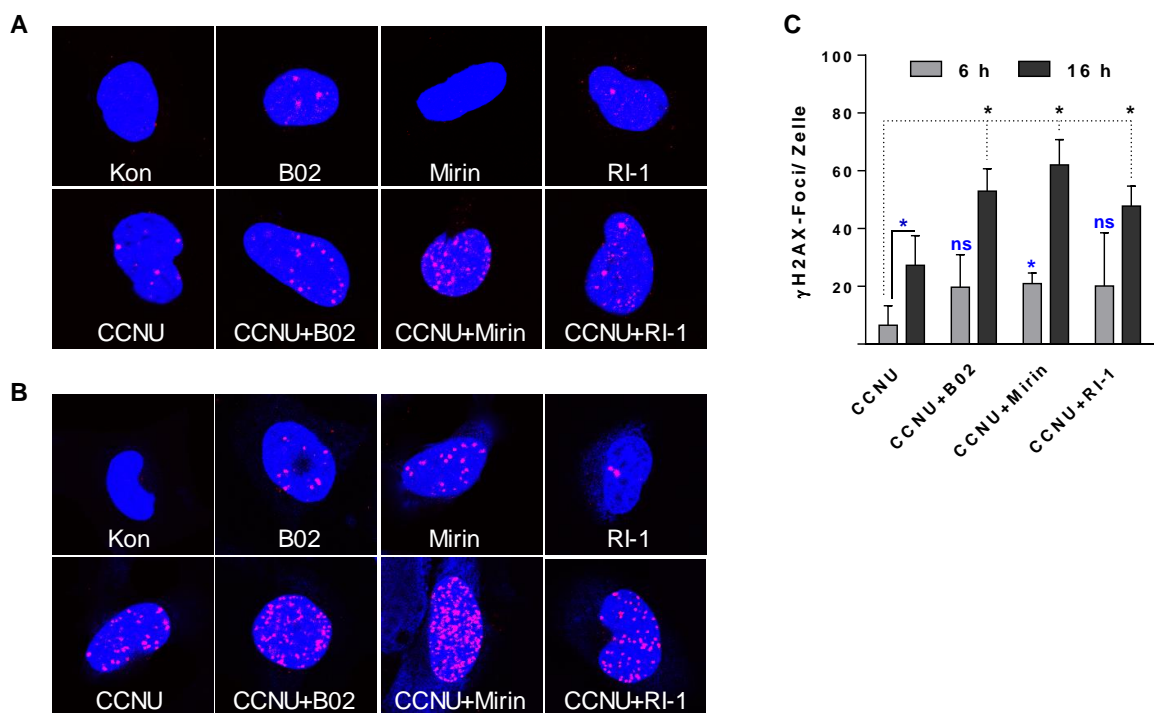


Abb. 45 Einfluss der HR-Inhibition auf die Reparatur-Kinetik der CCNU-induzierten DSB in LN229-Zellen. Repräsentative Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen der LN229-Zellen 6 h (A) und 16 h (B) nach der Behandlung mit CCNU (30 μ M, 1 h) und/ oder HR_i (B02: 10 μ M, Mirin: 25 μ M, RI-1: 20 μ M): rot= γ H2AX-Foci, blau=Kernfärbung mit DAPI. Die entsprechende Quantifizierung 6 h (hellgrau) und 16 h (dunkelgrau) ist in (C) gezeigt. Induziert dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten, deren Signifikanz mittels ungepaartem t-Test berechnet wurde: * $p \leq 0,05$, ns=nicht signifikant.

Bereits 6 h nach der Behandlung waren einige wenige CCNU-induzierte γ H2AX-Foci (7 Foci/ Zelle) nachweisbar (Abb. 45 C, hellgraue Balken), signifikant mehr Foci waren in Kombination mit dem MRE11-Inhibitor (21 Foci/ Zelle) zu beobachten. Die simultane Hemmung von RAD51 mittels B02 oder RI-1 zeigte zwar eine zunehmende Tendenz in der Anzahl der CCNU-induzierten DSBs (jeweils ca. 20 Foci/ Zelle), war jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Im Gegensatz dazu, zeigte die Quantifizierung 16 h nach der Behandlung (dunkelgraue Balken) eine deutliche Erhöhung der CCNU-induzierten γ H2AX-Foci (von 7 auf 27 Foci/ Zelle), was auch in Anwesenheit der Hemmstoffe weiter gesteigert wurde. In Kombination mit den RAD51-Inhibitoren erhöhte sich die Anzahl der nachgewiesenen DSBs auf 53 bzw 48 Foci/ Zelle (B02 bzw. RI-1), im Fall der MRE11-Hemmung mittels Mirin auf 62 Foci/ Zelle. Zusammengefasst zeigen die Daten, dass zum einen schon zu einem frühen Zeitpunkt, nämlich bereits nach 6 h CCNU-induzierte DSBs entstehen und über die Zeit zunehmen. Zum anderen unterstützen diese Ergebnisse auch die Annahme, dass die CCNU-induzierten ICLs, die bereits nachgewiesener Weise zu blockierten Replikationsgabeln führen, vor allem in Anwesenheit der HRR-Hemmstoffe, zu DSBs akkumulieren.

Um die Reparatur-Kinetik der CCNU-induzierten DSBs und den Einfluss der RAD51- bzw. MRE11-Inhibition auf die DSBR zu überprüfen, wurden vergleichbare Experimente durchgeführt. Die Induktion der γ H2AX-Foci wurde hierbei 24-72 h nach der Behandlung (CCNU: 30 μ M, B02: 10 μ M, Mirin: 25 μ M, RI-1: 20 μ M) in verschiedenen Glioblastomzellen untersucht. Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen sind in Abb. 46 A (72 h) gezeigt. Die spezifischen γ H2AX-Foci sind grün, die DNA der Zellkerne mittels DAPI blau dargestellt. Im Vergleich zum bereits beschriebenen 16 h-Wert stieg die Anzahl der CCNU-induzierten DSBs in LN229-Zellen 24 h nach Behandlung weiter an (Abb. 46 B, hellgraue Balken). Im Mittel wurden durch die CCNU-Behandlung 61 Foci pro Zelle induziert, auch die Kombinationsbehandlungen mit den HRR-Hemmstoffen führten zur Ausbildung einer vergleichbaren Anzahl an DSBs (je 61 Foci/ Zelle nach B02 bzw. Mirin; 52 Foci/ Zelle nach RI-1). Die Analyse nach 72 h (dunkelgraue Balken) lässt darauf schließen, dass die CCNU-induzierten DSBs repariert wurden. Die Anzahl der γ H2AX-Foci reduzierte sich im Vergleich zum 24 h-Wert signifikant um etwa 50 %. Eine analoge Verminderung der DSBs nach Kombination von CCNU und den HRR-Hemmstoffen war nicht zu beobachten. Auch nach 72 h waren in Kombination mit den RAD51-Inhibitoren B02 und RI-1 75 bzw. 57 Foci/ Zelle, nach Hemmung von MRE11 mittels Mirin 63 Foci/ Zelle detektierbar.

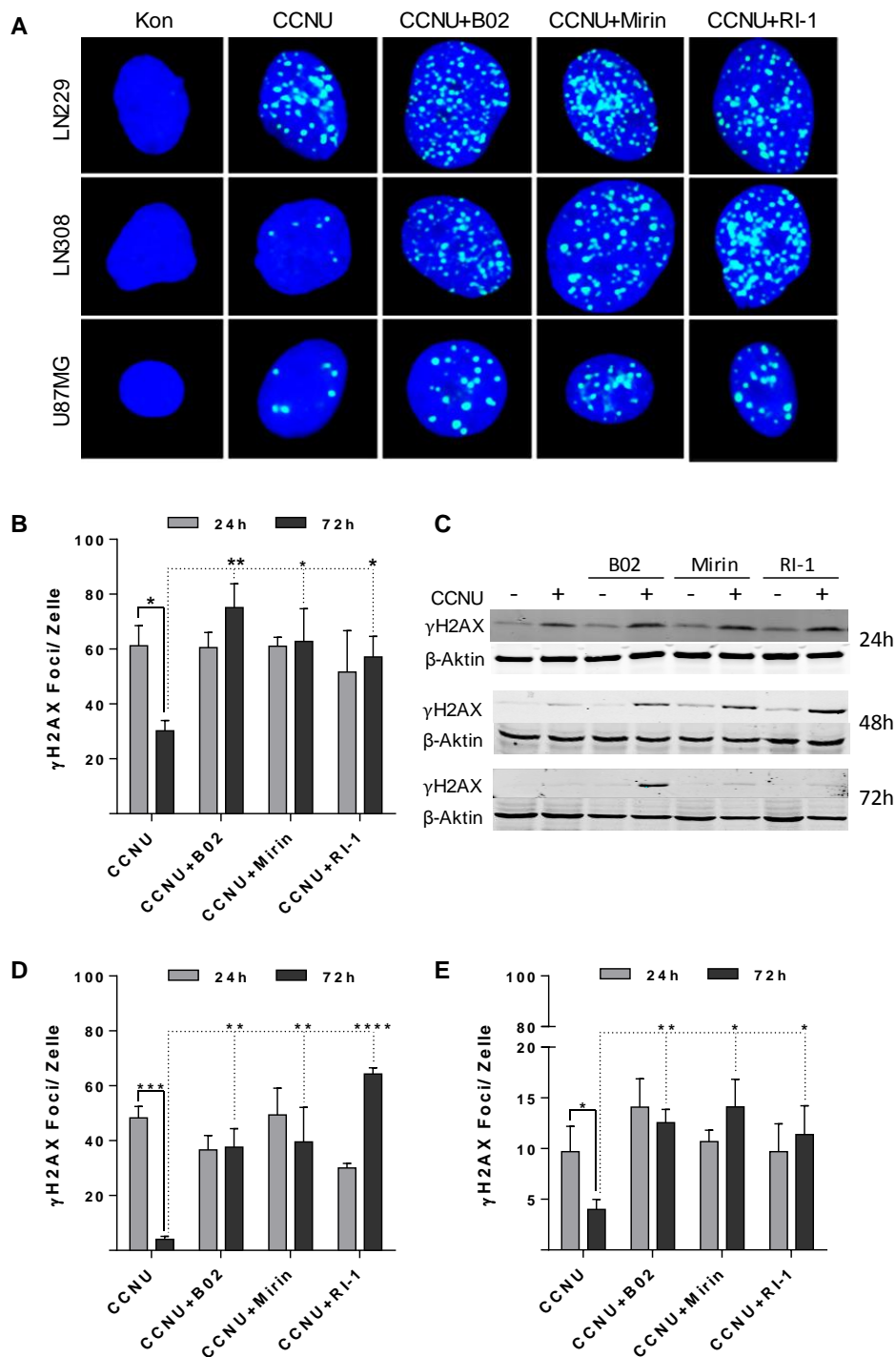


Abb. 46 Einfluss der HR-Inhibition auf die Reparatur-Kinetik der CCNU-induzierten DSB. Repräsentative Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen der Glioblastomzellen 72 h nach der Behandlung mit CCNU (30 µM, 1 h) und/ oder HR_i (B02: 10µM, Mirin: 25 µM, RI-1: 20 µM): grün=γH2AX-Foci, blau=Kernfärbung mit DAPI (A). Die entsprechende Quantifizierung nach Behandlung (24 h: hellgrau; 72 h: dunkelgrau) ist in (B) für LN229-, in (D) für LN308- und in (E) für U87MG-Zellen gezeigt. Induziert dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM aus drei unabhängigen Experimenten, deren Signifikanz mittels ungepaartem t-Test berechnet wurde: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$. (C) Kinetik der CCNU-induzierten Phosphorylierung des H2AX-Proteins (Ser 139) in LN229-Zellen nach analoger Behandlung. Gesamtzellextrakt wurden 24, 48 und 72 h nach Behandlung hergestellt und mittels Westernblot analysiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

Um dies zu verifizieren, wurden analog zu den Immunfluoreszenzanalysen Immunoblots aus Gesamtzell-Extrakten angefertigt. Wie in Abb. 46 C dargestellt, zeigte sich ein vergleichbarer Verlauf auch auf Proteinebene. Das γ H2AX-Protein wurde bereits 24 h nach der CCNU-Behandlung induziert. Nach 48 h schien die Reparatur einzusetzen, das Proteinsignal wurde schwächer. In Kombination mit der HRR-Hemmstoffen war dieses jedoch noch eindeutig detektierbar. Weitere 24 h später war lediglich in der CCNU+B02-Probe ein klares Signal nachweisbar, während die Kombination mit Mirin und RI-1 nur noch ein sehr schwache, kaum detektierbare Proteininduktion zeigte.

Die Immunfluoreszenzanalysen der CCNU-induzierten γ H2AX-Foci der LN308- und U87MG-Zellen lieferten ein vergleichbares Ergebnis. In LN308-Zellen (Abb. 46 D) wurden durch CCNU nach 24 h (hellgraue Balken) im Mittel 48 γ H2AX-Foci pro Zelle, in Kombination mit den HRR-Hemmstoffen B02, Mirin und RI-1 37, 49 bzw. 30 Foci pro Zelle induziert. Die durch CCNU-Einzelbehandlung erzeugten DSBs wurden über die Zeit (nach 72 h, dunkelgraue Balken) fast restlos repariert. Ebenfalls signifikant persitierten auch in diesem Zellsystem die CCNU-induzierten DSB nach Hemmung der HRR. Die Untersuchung der U87MG-Zellen (Abb. 46 E) vervollständigten das bereits vertraute Bild: Die nach 24 h durch CCNU-induzierten γ H2AX-Foci (10 Foci/ Zelle, hellgraue Balken) wurden repariert (72 h: Foci/ Zelle, dunkelgraue Balken), während die Präsenz der HRR-Hemmstoffe die Reparatur signifikant verhinderte. Zusammenfassend zeigen alle untersuchten Zelllinien eine deutliche durch CCNU-vermittelte Entstehung von DSBs, die jedoch in Anwesenheit der HRR-Hemmstoffe B02, Mirin und RI-1 nicht bzw. sehr verlangsamt repariert werden.

3.2.7. Die Hemmung von RAD51 und MRE11 führt zu Chromosomenaberrationen

Werden DSBs nicht bzw. nicht fehlerfrei repariert, kann dies zu genomischer Instabilität führen. Auch Mutagene, z. B. CCNU, können klastogenes Potential aufweisen. Um den Einfluss der pharmakologischen Hemmung der HRR auf die CCNU-induzierte Klastogenität zu überprüfen, wurden die Metaphasen der LN229-, LN308- und U87MG-Zellen nach CCNU-Behandlung (30 μ M) und/ oder HRR-Inhibition (B02: 10 μ M, Mirin: 25 μ M, RI-1: 20 μ M) untersucht. Die Glioblastomzelllinien differieren in ihrem Karyotyp: LN229- und LN308-Zellen sind hypertriploid (ca. 82 und 75 Chromosomen), während U87MG-Zellen ein diploides Karyogramm aufweisen. Nach Behandlung zeigten nahezu alle untersuchten Zellen einen aneuploiden Karyotypen, wobei sich die Chromosomenanzahl zwischen 44 und 47 pro Metaphase bewegte. Die zelllinienspezifischen Unterschiede nebst repräsentativer Lichtmikroskopaufnahme nach CCNU-B02-Kombinationsbehandlung sind in Abb. 47 für LN229- (Abb. 47 A), LN308- (Abb. 47 B) und U87MG-Zellen (Abb. 47 C) dargestellt. Die roten Pfeile verweisen auf die strukturellen Veränderungen der Metaphase-Chromosomen, wobei hier im Speziellen auf Chromosomenbrüche, Translokationen und Komplexbildungen geachtet wurde. Neben der Bestätigung, dass CCNU in allen untersuchten Zelllinien ein signifikant erhöhtes Klastogenitätspotential aufweist, zeigen die Daten, dass dies durch Kombination mit den RAD51-Hemmstoffen B02 und RI-1 deutlich gesteigert werden kann. Ein signifikantes Ansteigen der Aberrationen in Kombination mit Mirin war lediglich in LN308-Zellen (Abb. 47 B) zu beobachten.

Im Vergleich der Zelllinien untereinander, reagierten LN229-Zellen am sensitivsten auf die RAD51-Inhibition, wobei hier im Besonderen nach der Behandlung von CCNU und B02 viele Metaphase-Chromosomen komplexen Re-Arrangements (mehr als 50 %) aufwiesen. Zusammengefasst beweisen die Daten den klastogene CCNU-Effekt, welcher durch HRR-Inhibition potenziert wird.

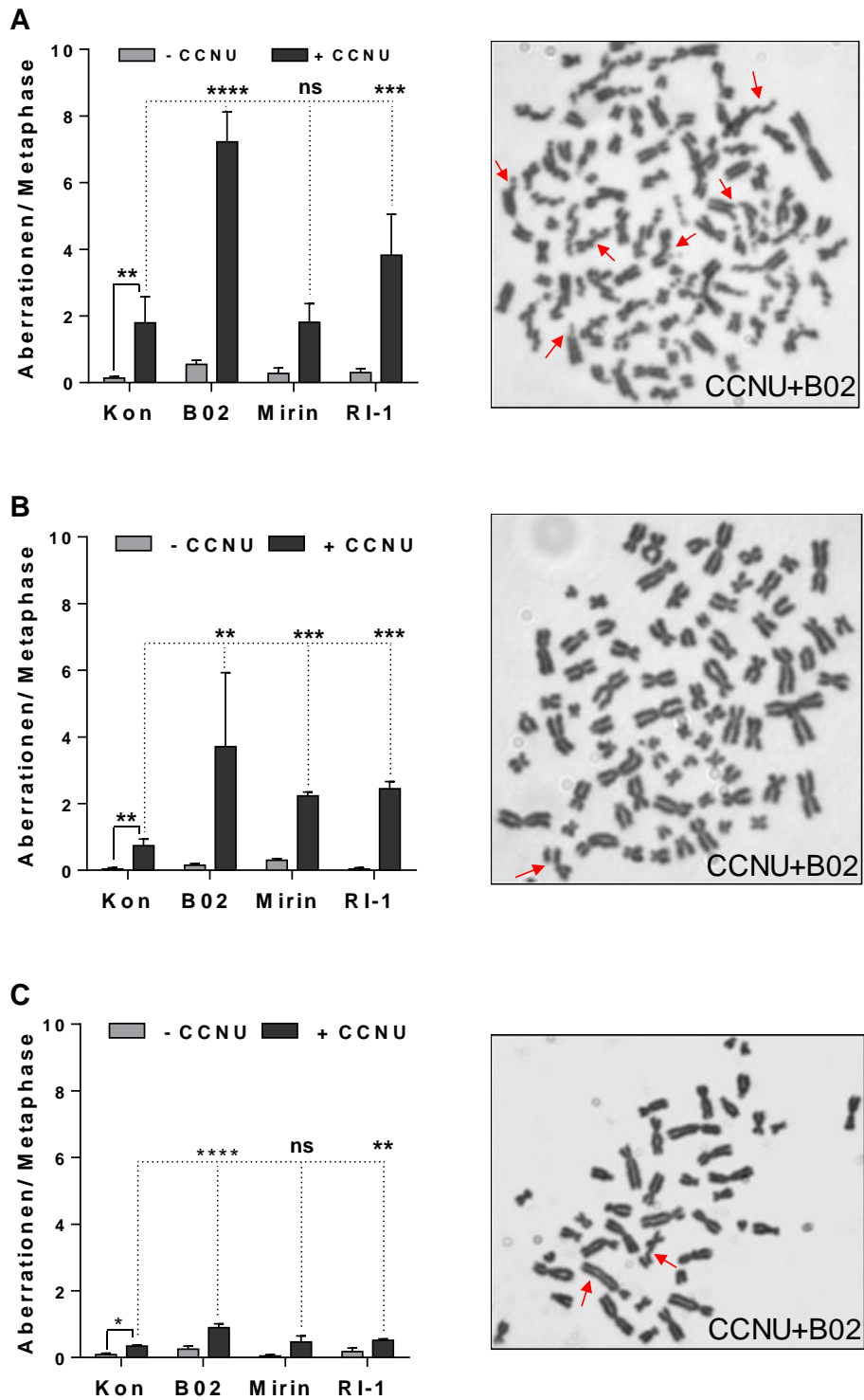


Abb. 47 Einfluss der HR-Inhibition auf die CCNU-induzierten Chromosomenbrüche. Dargestellt ist die Häufigkeit der Chromosomenaberration (CA)/ Metaphase in LN229- (A), LN308- (B) und U87MG-Zellen (C) nach CCNU-Behandlung (15 µM, 1 h) und/ oder HR-Inhibition (B02: 10µM, Mirin: 25 µM, RI-1: 20 µM). Abgebildet ist der Mittelwerte +/- SD aus drei unabhängigen Experimenten, Signifikanzanalyse mittels einfaktorieller ANOVA und dem Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest nach Šidák: ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$, ns=nicht signifikant. Rechts: Repräsentative Aufnahmen der Metaphasen mit CA (rote Pfeile) nach Behandlung mit CCNU und B02.

3.2.8. Die Inhibition von RAD51 und MRE11 verringert das klonogen Überleben und verbessert die CCNU-induzierte Zytotoxizität

3.2.8.1. Einfluss der HRR-Hemmung auf das reproduktive Zellüberleben

Um abschließend auch den Phänotyp und den Einfluss der RAD51- bzw. MRE11-Inhibition auf das klonogene Überleben zu untersuchen, wurden Koloniebildungstests durchgeführt. Hierzu wurden Glioblastomzellen mit CCNU (10 μ M, 1 h) und/ oder den HRR-Inhibitoren (B02: 2,5 μ M; Mirin: 12,5 μ M und RI-1: 5 μ M) behandelt. Das mittlere Überleben wurde auf die unbehandelte Kontrolle (Kon) normalisiert und ist in Abb. 48 für LN229- (Abb. 48 A), LN308- (Abb. 48 B) und U87MG-Zellen (Abb. 48 C) dargestellt.

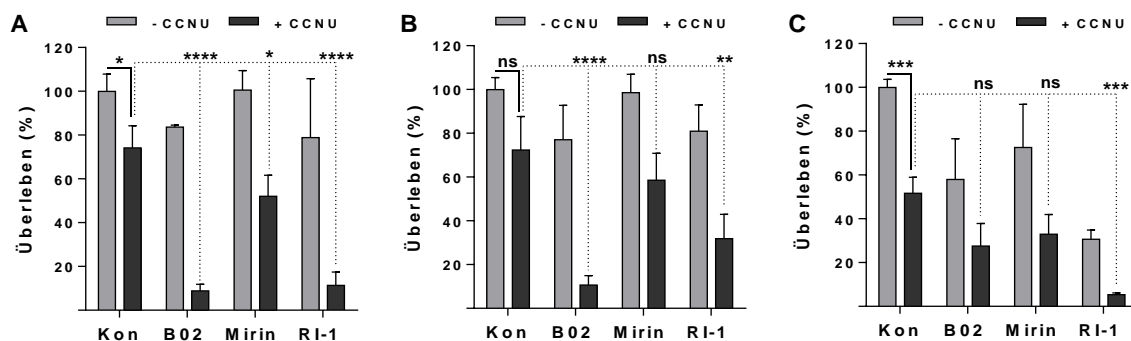


Abb. 48 Einfluss von CCNU und HR-Inhibition auf die Überlebensraten von Glioblastomzellen. Dargestellt sind die mittels Koloniebildungstest ermittelten Überlebensraten nach Behandlung mit CCNU (10 μ M, 1 h) und/ oder HR-Inhibitoren (B02: 2,5 μ M, Mirin: 12,5 μ M, RI-1: 5 μ M). Das Überleben wurde auf die unbehandelte Kontrolle (Kon) normalisiert und ist in (A) für LN229-, in (B) für LN308- und in (C) für U87MG-Zellen quantifiziert. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten, Signifikanzanalyse mittels einfaktorieller ANOVA und dem Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest nach Šidák: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$, ns=nicht signifikant.

In LN229-Zellen (Abb. 48 A) verringerte CCNU die mittlere Überlebensrate signifikant um 26 %, während in LN308-Zellen (Abb. 48 B) lediglich eine Tendenz eines reduzierten Überlebens beobachtet wurde und annähernd die Hälfte aller U87MG-Zellen (Abb. 48 C) ein reproduktives Zellüberleben signifikant einstellte. Die Inhibitoren B02 und RI-1 zeigten bereits durch die Hemmung von RAD51 einen zelllinienspezifischen Effekt, der in LN229- und LN308-Zellen moderat toxisch war (84 und 79 % bzw. 77 und 81 % Überleben) und in U87MG-Zellen mit 58 bzw. 31 % einen reproduktionshemmenden Einfluss hatte. Mirin erschien in allen untersuchten Zellsystemen subtoxisch (zw. 99-73 % Überleben). Wurde hingegen CCNU mit

den jeweiligen Hemmstoffen kombiniert, sanken die mittleren Überlebensraten drastisch. In LN229-Zellen überlebten nach Kombination mit B02 und RI-1 lediglich 9 bzw. 11 %, in LN308-Zellen 11 bzw. 32 %. Dieser signifikante Effekt wurde auch in Ko-Behandlung mit RI-1 für U87MG-Zellen (5 % Überleben) nachgewiesen. Die Inhibition von MRE11 durch Mirin hatte lediglich in LN229-Zellen einen klaren Effekt auf die CCNU-verminderte Überlebensrate. Hier überleben noch 52 % der Zellen, während LN308- und U87MG-Zellen noch 59 bzw 33 % klonogenes Überleben aufwiesen. Dies zeigte zwar eine ähnliche Tendenz, ist jedoch im Vergleich zu der CCNU-induzierten Toxizität nicht signifikant unterschiedlich. Ähnliche Ergebnisse lieferten auch die Kombinationsbehandlungen von TMZ und den HRR-Hemmstoffen (Abb. 57). Sowohl in LN229-, LN308- als auch U87MG-Zellen hatte TMZ einen signifikant reduzierenden Einfluss auf die mittleren Überlebensraten, die in Kombination mit einer RAD51-Hemmung durch B02 bzw. RI-1 weiter deutlich sanken. Die MRE11-Hemmung zeigte eine analoge Tendenz, war allerdings im Vergleich zur TMZ-induzierten Reduktion des Überlebens nicht gesichert unterschiedlich. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse ein signifikant reduziertes Überleben nach CCNU/ TMZ-HRR_i-Behandlung, wobei die konsistentesten Ergebnisse für einen gesteigerten reproduktiven Zelltod in Kombination mit RI-1 erreicht wurden.

3.2.8.2. Einfluss der HRR-Hemmung auf die CCNU-vermittelte Sensitivität

In Anlehnung an die Koloniebildungstests wurde auch der Einfluss der RAD51- und MRE11-Hemmung auf den CCNU-induzierten Zelltod untersucht. Hierzu wurden LN229-, LN308- und U87MG-Zellen mit CCNU (15 μ M, 1 h) und/ oder den HRR-Inhibitoren (B02: 10 μ M; Mirin: 25 μ M und RI-1: 20 μ M) behandelt und deren Sensitivität nach 120 h (LN229-Zellen) oder 144 h (LN308- und U87MG-Zellen) durchflusszytometrisch analysiert. Die mittleren induzierten Zelltodraten, dargestellt als die Summe aus Apoptose und Nekrose, sind in Abb. 49 gezeigt. Der Vergleich der untersuchten Zelllinien untereinander visualisiert, dass LN229-Zellen (Abb. 49 A) und LN308-Zellen (Abb. 49 B) ähnlich auf CCNU ansprechen. Insgesamt starben 5 bzw. 4,3 % nach CCNU-Einzelbehandlung. Die U87MG-Zellen (Abb. 49 C) waren mit einer induzierten Zelltodrate von 2 % resistenter. Wurde die CCNU-Behandlung jedoch mit den HRR-Inhibitoren kombiniert, zeigte sich ebenfalls ein vergleichbares Ergebnis: In Kombination mit den RAD51-Hemmstoffen B02 und RI-1 erhöhten sich die Zelltodraten signifikant auf

35 % (U87MG-Zellen) sowie 42 und 40 % (LN229- und LN308-Zellen) bzw. je 36 % (LN229- und LN308-Zellen). U87MG-Zellen schienen in Kombination mit RI-1 zwar besser auf die CCNU-Behandlung anzusprechen (13,4 % Zelltod), der Unterschied zwischen Einzel- und Kombinationsbehandlung war jedoch statistisch nicht gesichert. Ähnlich verhielt es sich auch für die Kombination mit dem MRE11-Hemmstoff Mirin. Die U87MG-Zellen zeigten lediglich eine leichte Tendenz im Anstieg des Zelltodes. LN229- und LN308-Zellen wiesen im Gegensatz dazu eine deutliche Sensitivierung von 23 bzw. 35 % auf. Im Vergleich der Hemmstoffe untereinander scheinen die RAD51-Inhibitoren, innerhalb der hier untersuchten, kommerziellen Glioblastomzelllinien, die Potenteren zu sein. Die Untersuchung der in Mainz etablierten Patientenlinien MZ160-, MZ219- und MZ227-Zellen (Abb. 59) zeigten ebenfalls diese Tendenz, wobei im Speziellen die MZ160-Zellen deutlich auf die Kombination mit B02 ansprechen. Die Untersuchung von LN229-Zellen, die das Schlüsselprotein der HRR, RAD51, stabil herunterregulieren, zeigte zwar im Vergleich zur Kontrolltransfektanten als auch den parentalen LN229-Zellen eine weitaus deutlichere Sensitivität gegenüber CCNU, aber ein geringeres Ansprechen verglichen zur pharmakologischen Inhibition von RAD51 mittels B02 und RI-1. Zusammengefasst konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, dass die HRR-Hemmung einen deutlich steigernden Effekt auf den CCNU-induzierten Zelltod entfaltet und zusätzlich vor allem die Apoptosefrequenz, sprich ein sehr kontrolliertes Zellsterben, in Glioblastomzellen fördert.

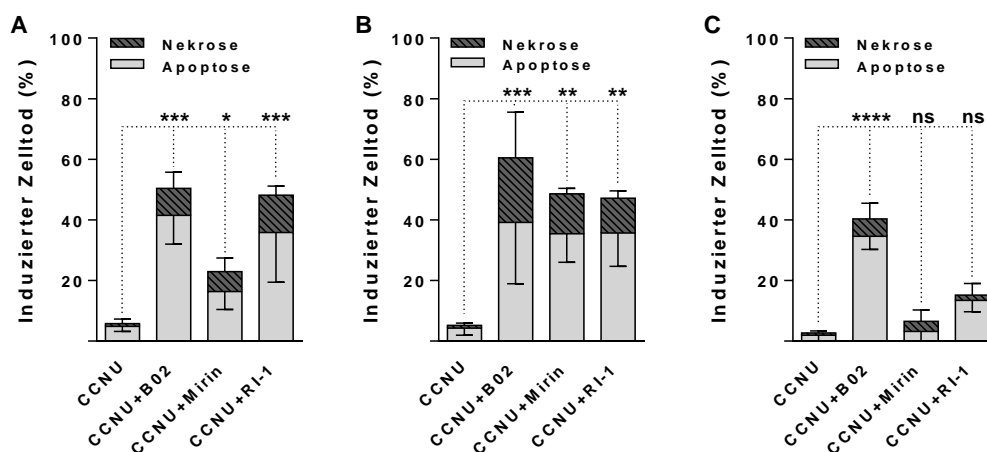


Abb. 49 Einfluss der HR-Inhibition auf den CCNU-induzierten Zelltod in Glioblastomzellen. Mittels Annexin V/ PI-Färbung wurden Apoptose- (hellgrau) und Nekrosefrequenz (schraffiert) durchflusszytometrisch 120 h (LN229) bzw. 144 h (LN308 und U87MG) nach der Behandlung mit CCNU (15 μ M, 1 h) und/ oder HR-Inhibitoren (B02: 10 μ M, Mirin: 25 μ M, RI-1: 20 μ M) bestimmt. Dargestellt ist der induzierte Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose) für LN229- (A), LN308- (B) und U87MG-Zellen (C). Angegeben sind die Mittelwerte +/- SD aus drei unabhängigen Experimenten, Signifikanzanalyse mittels einfaktorier ANOVA und dem Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest nach Šidák: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$, ns=nicht signifikant.

3.2.8.3. Einfluss der HRR-Inhibition auf die Caspasen-Aktivierung

Die Sensitivitäts-Experimente zeigten, dass die HRR-Inhibitoren einen deutlichen Einfluss auf den CCNU-induzierten Zelltod haben. Im Speziellen erhöhte die Kombinationsbehandlung den Anteil der Apoptose, der damit für den Untergang der Glioblastomzellen maßgeblich verantwortlich war. Caspasen zählen zu den wichtigsten Enzymen der Apoptose. Daher wurde zusätzlich der Einfluss der HRR-Inhibition auf die Caspase-Aktivierung untersucht. Die Glioblastomzellen wurden mit CCNU (30 μ M, 1 h) und/ oder den HRR-Hemmstoffen (B02: 10 μ M; Mirin: 25 μ M und RI-1: 20 μ M) behandelt, mit einem *in situ*-Marke gefärbt, fixiert und durchflusszytometrisch 72 h (für LN229-Zellen) bzw. 96 h (für LN308- und U87MG-Zellen) nach Behandlung analysiert. Die gemittelten Anteile der Zellpopulationen, die aktivierte Caspasen aufweisen, sind in Abb. 50 dargestellt.

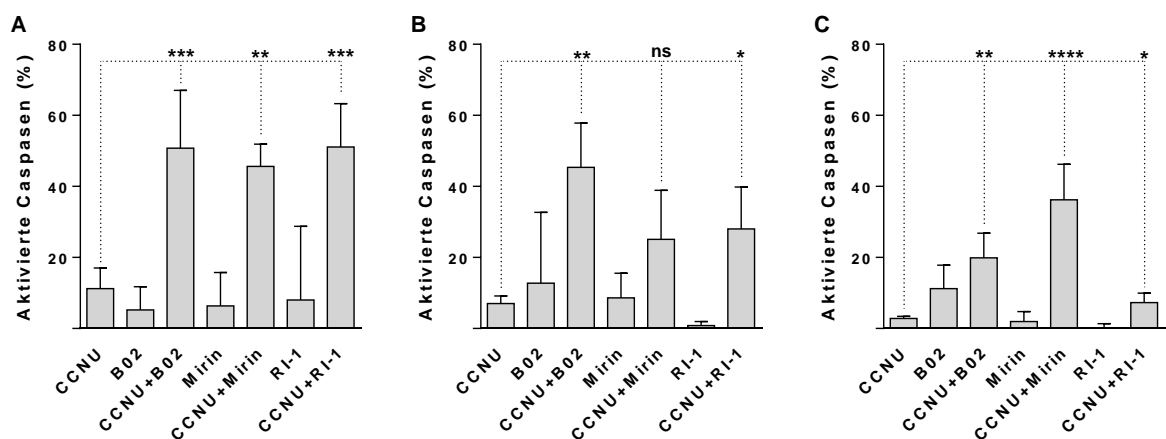


Abb. 50 Einfluss der HR-Inhibition auf die Caspase-Aktivierung in Glioblastomzellen. Aktivierte Caspasen wurden mittels eines Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten *in situ* Markers gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Caspase-aktiven Populationen 72 h (LN229) und 96 h (LN308 und U87MG) nach Behandlung mit CCNU (30 μ M, 1 h) und/ oder HR-Inhibitoren (B02: 10 μ M, Mirin: 25 μ M, RI-1: 20 μ M) in LN229- (A), LN308- (B) und U87MG-Zellen (C). Angegeben sind die Mittelwerte +/- SD aus drei unabhängigen Experimenten, Signifikanzanalyse mittels einfaktorieller ANOVA und dem Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest nach Šidák: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$, ns=nicht signifikant.

Der Vergleich der Zelllinien untereinander zeigte, dass die Inhibitoren selbst eine leichte bis moderate Caspase-Aktivierung bedingen. In LN229-Zellen (Abb. 50 A) bewegte sich die mittlere Aktivierung zwischen 5-8 %, in LN308-Zellen (Abb. 50 B) zwischen 1-13 % und U87MG-Zellen (Abb. 50 C) reagierten mit einem Anteil von 0,3 bis 11 % aktivierter Caspasen auf die HRR-Hemmung. Auch die CCNU-Einzelbehandlung scheint lediglich einen sehr moderaten

Zellanteil zu stimulieren. LN229-Zellen erschienen mit 11 % noch als die sensitivsten, während in nur 7 bzw. 3 % der LN308- und U87MG-Zellen der Zelltod via Caspasen aktiviert wird. Wurde allerdings CCNU mit den HRR-Hemmstoffen kombiniert, stieg die Frequenz der Caspasen-Aktivierung, analog zum zuvor beschriebenen Anstieg des Zelltods, signifikant an. Die Kombination der RAD51-Inhibitoren resultierte in LN229-Zellen in der Aktivierung jeder zweiten Zelle (B02- und RI-1-Kombination je 51 %), in LN308-Zellen wurden durch CCNU-B02-Behandlung 45 % und mittels CCNU-RI-1-Behandlung 28 % der Caspasen aktiviert. Im Vergleich dazu reagierten U87MG-Zellen etwas träger (20 und 7,3 %), wobei hier der Einfluss auf den MRN-Komplex durch die Hemmung von MRE11 eine eindeutigere Rolle zu spielen scheint (36 % Caspase-Aktivierung). Verglichen zu den RAD51-Inhibitoren antworteten LN229-Zellen mit ähnlicher Aktivierungs-Frequenz (46 %) auf die Mirin-Kombination, während LN308-Zellen zumindest diese Tendenz bestätigten (25 %). Zusammengefasst reagieren die untersuchten Glioblastomzellen vor allem in Kombination mit den HRR-Hemmstoffen mit einer sehr ausgeprägten Caspasen-Aktivierung auf die CCNU-Behandlung. Dies korreliert mit den zuvor beschriebenen Sensitivitätsdaten.

3.2.9. RI-1 verbessert den durch CCNU-induzierten therapeutischen Effekt *in vivo*

Um abschließend den therapeutischen Einfluss der HRR-Inhibition auf den CCNU-Effekt zu untersuchen, wurden humane Tumor-Xenograft-Modelle genutzt. In athymische BALB/c Nacktmäuse wurden zum einen U87MG-Zellen (Abb. 51), zum anderen LN229-Zellen (Abb. 52) subkutan injiziert und das Tumorstadium beobachtet. Aufgrund der geringeren *in vitro*-Toxizität und der damit einhergehenden besseren Verträglichkeit, wurden für die *in vivo*-Experimente zur Hemmung der HRR der RAD51-Inhibitor RI-1 eingesetzt. Hatten die Tumore ein definiertes Ausgangsvolumen erreicht, begann die Therapie. Verglichen wurde das mittlere Tumorgesamtvolumen folgender Behandlungsgruppen: 1) Die Kontrollgruppe (Kon, schwarz), 2) die CCNU-Gruppe (rot), 3) die RI-1-Gruppe (grau) und 4) die CCNU/ RI-1-Gruppe (grün). Tiere des U87MG-Xenografts wurden über einen Behandlungszeitraum von 27 Tagen (Abb. 51), Tiere des LN229-Xenografts über einen Zeitraum von 151 Tagen (Abb. 52), beobachtet. Repräsentative Aufnahmen der U87MG-Xenograft-Tiere am 17. Behandlungstag sind in Abb. 51 A dargestellt und zeigten bereits einen eindrucksvollen Effekt

der Kombinationsbehandlung. Die genaue Quantifizierung des Tumorwachstums der einzelnen Behandlungsgruppen über den gesamten Therapiezeitraum ist in Abb. 51 B gezeigt. Die Inhibition von RAD51 scheint hierbei das Tumorwachstum im Vergleich zur Kontrolle nicht zu beeinflussen. Die Behandlung mit CCNU hingegen reduzierte die Progression des Tumors, was durch die Kombinationsbehandlung mit RI-1 noch weiter verstärkt wurde. Die mittlere Tumorgöße dieser beiden Gruppen unterschied sich bereits 11 Tage nach Therapiebeginn signifikant. Des Weiteren wurde auch die Therapie an und für sich gut vertragen. Trotz einer systemischen Applikation wurden keine Veränderungen des Gesundheitsstatus festgestellt, auch verursachte die Therapie keine nennenswerte Gewichtsabnahme (Abb. 51 C).

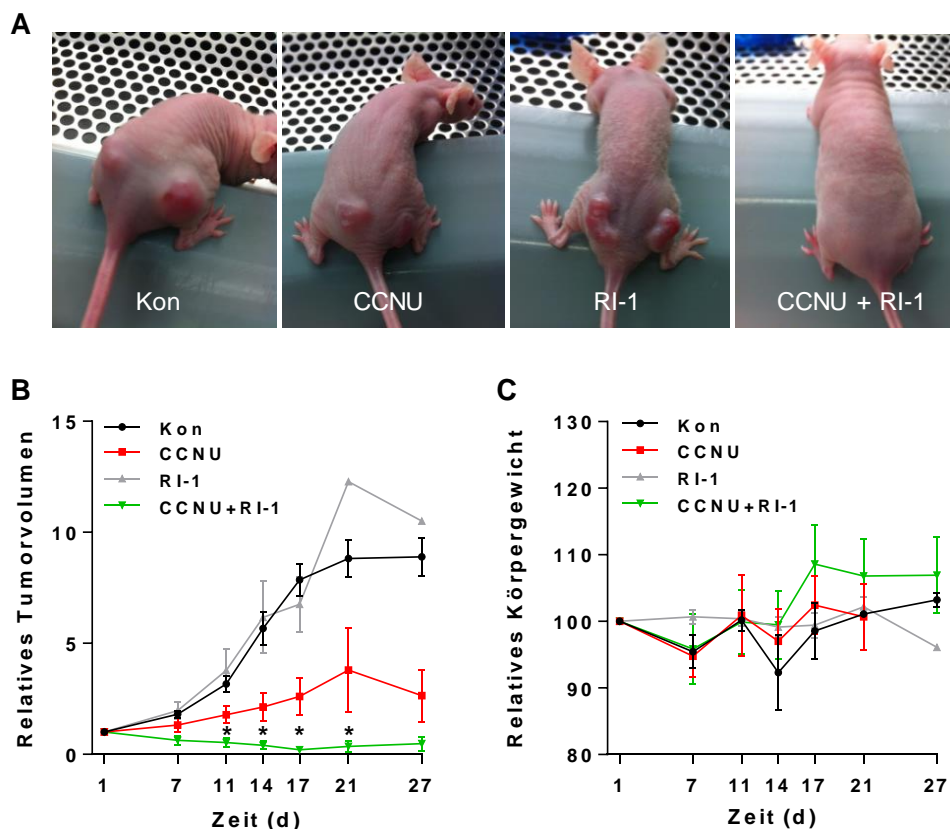


Abb. 51 Einfluss der Rad51-Inhibition auf das Tumorwachstum *in vivo*. In U87MG-Xenograft-Experimenten wurde der Einfluss von CCNU und/ oder RI-1 auf das Tumorwachstum untersucht. U87MG-Tumortragende BALB/c Nacktmäuse wurden gruppiert (mind. 5 Tiere/ Gruppe) und einmalig mit CCNU (25 mg/ kg KG; rot), RI-1 (50 mg/ kg KG; grau) oder in Kombination (grün) behandelt. Die Applikation erfolgte intraperitoneal, die Kontrollgruppe (Kon, schwarz) erhielt die entsprechenden Lösungsmittel der Therapeutika. **(A)** Repräsentative Aufnahmen der unbehandelten (Kon) und behandelten Tiere an Tag 17 nach Therapiebeginn. **(B)** Relatives Tumolvolumen als Funktion der Zeit: Angegeben sind die Mittelwerte +/- SEM des Tumorgesamtvolumens innerhalb der Behandlungsgruppe. Die Volumina wurden auf das jeweilige Anfangsvolumen am Tag der Behandlung (=Tag 1) relativiert. Der statistische Unterschied zwischen der Wachstumskurve der CCNU- (rot) und Kombinationsgruppe (grün) wurde mittels des Mann-Whitney-Tests berechnet: * $p \leq 0,05$. **(C)** Relatives Körpergewicht als Funktion der Zeit: Angegeben sind die Mittelwerte +/- SD des Körpergewichts (KG) innerhalb der Behandlungsgruppe, das Gewicht wurde bezogen auf Tag 1 relativiert.

Im Gegenteil, die Kombinationsgruppe zeigte sogar eine leichte Zunahme des Körpergewichts im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen. Das Vermögen der RAD51-Hemmstoffe B02 und RI-1 auch im murinen System den CCNU-induzieren Zelltod zu verstärken, wurde ebenfalls untersucht und bestätigt (Abb. 60).

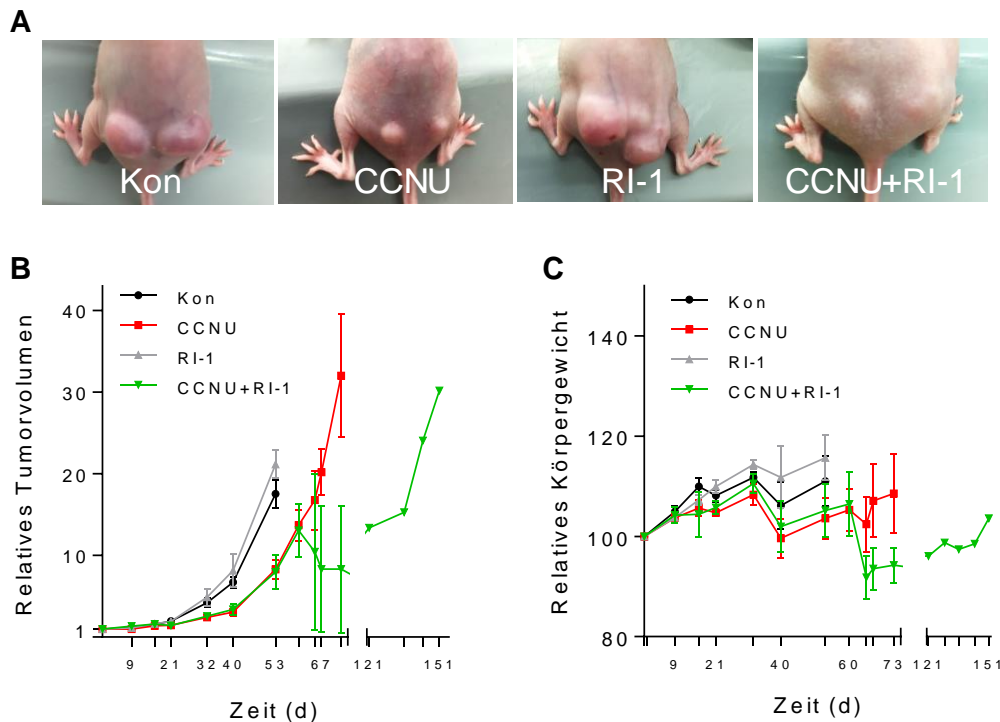


Abb. 52 Einfluss der Rad51-Inhibition auf das Tumorwachstum im LN229-Xenograft-Modell. In LN229-Xenograft-Experimenten wurde der Einfluss von CCNU und/ oder RI-1 auf das Tumorwachstum untersucht. U87MG-Tumortragende BALB/c Nacktmäuse wurden gruppiert (mind. 5 Tiere/ Gruppe) und einmalig mit CCNU (16 mg/ kg KG; rot), RI-1 (50 mg/ kg KG; grau) oder in Kombination (grün) behandelt. Die Applikation erfolgte intraperitoneal, die Kontrollgruppe (Kon, schwarz) erhielt die entsprechenden Lösungsmittel der Therapeutika. **(A)** Repräsentative Aufnahmen der unbehandelten (Kon) und behandelten Tiere an Tag 45 nach Therapiebeginn. **(B)** Relatives Tumolvolumen als Funktion der Zeit: Angegeben sind die Mittelwerte +/- SEM des Tumorgesamtvolumens innerhalb der Behandlungsgruppe. Die Volumina wurden auf das jeweilige Anfangsvolumen am Tag der Behandlung (=Tag 1) relativiert. **(C)** Relatives Körpergewicht als Funktion der Zeit: Angegeben sind die Mittelwerte +/- SD des Körpergewichts (KG) innerhalb der Behandlungsgruppe, das Gewicht wurde bezogen auf Tag 1 relativiert.

Analog zum U87MG-Xenograft erfolgte auch die Behandlung im LN229-Xenograft-Modell. Repräsentative Aufnahmen der Tiere, hier allerdings 45 Tage nach Therapiestart, sind in Abb. 52 A dargestellt und zeigen ebenfalls einen deutlichen Effekt der Kombinationstherapie. Auch die Quantifizierung des Tumolvolumens der einzelnen Behandlungsgruppen (Abb. 52 B) bestätigten dies. Im Vergleich zur Kontrolle hatte die RI-Einzelbehandlung auch im LN229-Xenograft-Modell keinen Einfluss auf das Tumorwachstum, während sowohl die

CCNU- als auch die Kombinationsbehandlung die Tumorprogression verlangsamen. Eindeutiger wurde der Unterschied dieser beiden Gruppen allerdings erst ab Tag 73. Hier mussten die verbleibenden Tiere der CCNU-Gruppe aufgrund ihres Tumolvolumens getötet werden. Dieses Kriterium wurde von der Kombinationsgruppe erst am 151. Behandlungstag erreicht. Insgesamt wurde die Therapie auch in diesem Xenograft-Modell gut vertragen, was u.a. die kaum vorhandenen Gewichtsschwankungen (Abb. 52 C), auch über diesen langen Zeitraum, unterstützen.

Um den Effekt des verlängerten Überlebens der Kombinationsbehandlung zu visualisieren, wurden die Ergebnisse des LN229-Xenograft-Modells nochmals in einer Kaplan-Meier-Überlebenskurve dargestellt (Abb. 53).

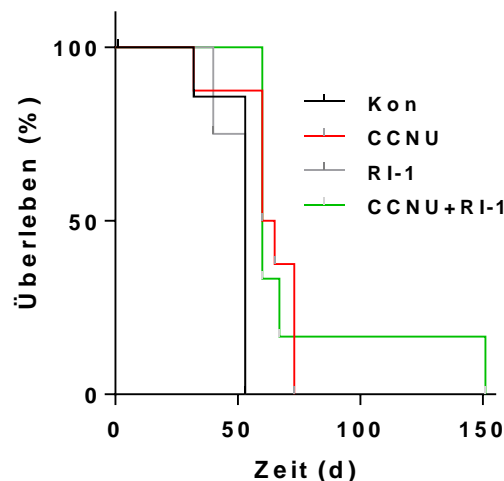


Abb. 53 Kaplan-Meier-Überlebenskurve des LN229-Xenograft-Modells. Aufgetragen ist die Überlebensrate (=Tag der Tötung, gemäß §8 TierSchuG) als Funktion der Zeit. Gruppierung und Behandlung analog zum beschriebenen Xenograft.

Aufgrund des schnelleren Tumorwachstum mussten die Tiere der Kontroll- und RI-1-Gruppe zu einem im Vergleich frühen Zeitpunkt getötet werden, während sowohl die Tiere der CCNU- als auch die der Kombinationsgruppe länger überlebten. Das letzte Tier, welches die Kombinationstherapie erhielt, wurde 78 Tage nach dem letzten mittels CCNU behandelten Tieres getötet.

Zusammengefasst zeigen die *in vivo*-Daten, dass eine systemische Hemmung von RAD51 durch RI-1 im Xenograft-Modell selbst über einen langen Zeitraum toleriert wird. Ein Tumorregressions-Effekt wurde allerdings erst in Kombination mit CCNU beobachtet. Im U87MG-

Xenograft-Modell war dieser inhibierende Effekt auf das Tumorwachstum bereits nach 11 Behandlungstagen zu beobachten. Im LN229-Xenograft-Modell war eine solche Tendenz der Tumorregression zu einem späteren Zeitpunkt zu beobachten. Die Überlebensrate der Kombinationsgruppe verdoppelte sich im Vergleich zur CCNU-Einzelbehandlung.

4. DISKUSSION

Krebs zählt als lebensbedrohliche Erkrankung zu einer der führenden Todesursachen weltweit. Obwohl konventionelle Therapien auf einer direkten Entfernung des Tumors und einer zytotoxischen Chemo- und Radiotherapie basieren, sind diese Ansätze in vielen Fällen nur begrenzt wirksam. Darüber hinaus sind aktuelle Antikrebs-Regime häufig mit signifikant erhöhten Toxizitäten und dem Auftreten von Arzneimittelresistenzen verbunden. Eine der großen Herausforderungen in der Krebsbekämpfung bleibt damit die Entwicklung hochwirksamer Medikamente, die sich durch eine hohe Spezifität gegenüber malignen Zellen auszeichnen, gleichzeitig jedoch kaum oder nur sehr geringe Nebenwirkung auf die gesunden Zellen der Patienten ausüben.

Viele Forschungsschwerpunkte konzentrieren sich auf die Entwicklung neuer und effizienterer Chemotherapien. Einerseits fokussieren diese auf die Aufklärung der antineoplastischen Wirkmechanismen neuartiger Verbindungen, andererseits kann dies auch die Bewertung von Arzneimitteln betreffen, die üblicherweise einen anderen klinischen Einsatz finden. Letzteres wird als *Drug-Repurposing* bezeichnet. Dies hat den Vorteil, dass solche Medikamente nicht neu zugelassen werden müssten. Für die Krebstherapie wurde das Antimalariamittel Artesunat (ART) als ein vielversprechender Kandidat identifiziert und besitzt, wie der natürliche sekundäre Pflanzeninhaltsstoff Artemisinin, eine toxische Wirkung auf Tumorzellen. Es sensitiviert chemo- und strahlungsresistente Zelllinien *in vitro* bereits im Nano- und Mikromolarbereich [83, 84]. Ob dies auf Glioblastomzelllinien übertragbar ist, sollte in dieser Arbeit verifiziert werden. Zusammen mit dem in der GB-Therapie eingesetzten Standard-Chemotherapeutikum Temozolomid (TMZ) wurden im einem kombinierten Behandlungsregime verschiedene zytotoxische Endpunkte untersucht, die im Folgenden (Kap. 4.1) diskutiert werden.

Eine weitere Möglichkeit der Therapieoptimierung sind zielgerichtete Strategien. Diese sind vielfältig, nutzen jedoch immer bestimmte, spezifische Eigenschaften des Tumorgewebes bzw. der Krebszellen aus. Der genetisch hergestellte monoklonale Antikörper Bavacizumab bindet z. B. an den Wachstumsfaktor VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) und verhindert so den Prozess der Tumorangiogenese, während niedermolekulare Verbindungen (sog. *small molecules*) wie Imatinib gezielt in Stoffwechselforgänge eingreifen. In dieser Arbeit wurde der gezielte Therapieansatz ebenfalls durch den Einsatz von *small molecules* ver-

folgt. Allerdings wurde hier die Hemmung eines DNA-Reparaturweges als *Target* gewählt. Zusammen mit dem *second-line* applizierten Alkylanz Lomustin (CCNU) wurden auch hier diverse Endpunkte fokussiert und in Kapitel 4.2 diskutiert.

4.1. Das Antimalariamittel Artesunat als *Sensitizer* der Temozolomid-basierten Glioblastomtherapie

Artesunat (ART) ist ein halb-synthetisches Derivat des Artemisinins. Dies ist ein Pflanzeninhaltsstoff der *Artemisia annua*, deren Extrakte bereits seit Jahrhunderten in der traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) eingesetzt werden. ART hat gegenüber dem Naturstoff Artemisinin eine deutlich verbesserte Bioverfügbarkeit, ist wasserlöslich und übersteigt die kurze Halbwertszeit von ca. 2,5 h des Artemisinins [275, 276]. Die halb-synthetischen Derivate werden aus Dihydroartemisinin (DHA), dem aktiven Metaboliten des Artemisinins, hergestellt. Signifikante Antitumor-Wirkungen des Pflanzenstoffs und dessen Derivate wurden *in vitro* und im Tiermodell dokumentiert. Im Fokus stehen dabei die aktivsten Substanzen, nämlich DHA und ART [277]. ART zeigt hierbei eine inhibierende Aktivität gegen Leukämien, Kolonrektalkarzinom-, Melanom-, Brustkrebs-, Ovarialkarzinom- und Prostatakarzinomzellen [84]. Auch DHA wirkt auffallend antineoplastisch (z. B. gegen Bauchspeicheldrüsen- und Lungenkrebszellen) [278]. In umfangreichen Studien wurden die zugrundeliegenden Mechanismen des ART-induzierten Zelltods der Krebszellen untersucht. Diese bestätigten die bereits einleitend erwähnte ROS-Produktion und die damit einhergehende oxidative DNA-Schädigung. Diese resultiert in der Bildung von DSBs und induziert apoptotische und nekrotische Zelltodprozesse [93, 94]. Ferner waren auch DSBR-defizienten Zelle hypersensitiv gegenüber ART, was darauf schließen lässt, dass ART-induzierte DSBs den Zelltod bewirken [93]. Untersuchungen an der Glioblastomzelllinie LN229 bestätigten dies: ART bedingt durch eine kontinuierliche ROS-Produktion die Bildung von DSBs [94]. Da TMZ durch die Prozessierung der O^6 -MeG/T-Fehlpaarung mittels MMR ebenfalls DSBs induziert [274], war anzunehmen, dass eine gleichzeitige Applikation von TMZ und ART die Anzahl der DSBs steigert und dadurch die Zelltodrate der Glioblastomzellen erhöhen würde.

4.1.1. Artesunat verbessert die TMZ-induzierte Zytotoxizität in Glioblastom- und in Gliomstammzellen

Zur Überprüfung der Hypothese, dass ART die TMZ-vermittelte Zytotoxizität erhöht, wurden die aus hochgradigen Gliomen abgeleiteten Zelllinien LN229, A172 und U87MG als Modellsystem gewählt. Wie ein Großteil der Gliome verfügen diese Zellen über funktionelles p53-Protein [279, 280] und besitzen einen methylierten *MGMT*-Promotor (Abb. 12 B), der die Expression des Reparaturproteins unterbindet. Damit konnte die Reparatur der TMZ-vermittelten O^6 -MeG-Läsion durch MGMT ausgeschlossen werden. Koloniebildungstests (Abb. 14-16) und Zelltodanalysen (Abb. 18) zeigten, dass ART die TMZ-induzierte Toxizität signifikant erhöht. Sogar die im Vergleich TMZ-resistenteren U87MG-Zellen wurden durch die ART-Nachbehandlung sensitiviert (Abb. 16, Abb. 18 C). Auch die GSC G112SP, die bereits überraschenderweise sehr empfindlich gegenüber TMZ (2 μ M) reagierten, steigerten die Zelltodrate durch die ART-Nachbehandlung (Abb. 18 D). Die TMZ-vermittelte Zelltodinduktion ist in Glioblastomzellen hauptsächlich auf die Erhöhung der Apoptoserate zurückzuführen [274, 281]. Aufgrund der Prozessierung des O^6 -MeG ist dies ein spätes Ereignis [274], was u. a. die hier zeitlich verzögerte ART-Nachbehandlung 72 h nach der TMZ-Applikation begründet. Ein ART-Behandlung lediglich 24 h nach der TMZ-Gabe blieb in dem hier untersuchten *in vitro*-Setup ohne Effekt (Abb. 55). Vermutlich ist dies auf die in der Literatur beschriebenen ART-vermittelten Proliferationshemmung zurückzuführen [83, 84], was mit der replikationsabhängigen Prozessierung des TMZ-induzierten DNA-Schadens interferiert. Diese ist zwingend notwendig für die TMZ-vermittelte Apoptose [274]. Ferner ist anzumerken, dass die hier applizierten TMZ-Dosen, die 50 μ M nicht überschritten, als moderat einzustufen sind. Die Plasmaspiegel der Patienten, die eine TMZ-basierte Chemotherapie erhalten, liegen im Vergleich bei etwa 80 μ M [282]. Auch die ART-Konzentrationen (bis 15 μ g/ml) sind sehr gering gewählt. Ein Malaria-Patient erhält per Infusion 1-8 mg/kg Körpergewicht des Medikaments, was Plasmakonzentrationen von etwa 0,4-0,6 μ g/ml entspricht [283, 284]. Für eine TMZ-basierte Gliomtherapie wäre somit auch eine begleitenden ART-Applikation in höheren Dosen denkbar.

Frühere Studien zeigten, dass ART ROS induziert und somit zur Entstehung von DSBs beiträgt [94]. Dies war Ausgangspunkt für die Annahme, dass ART-induziertes ROS in der Zelltodinduktion involviert ist. Analysen der ROS-Mengen zeigten zunächst zelllinienspezifische Un-

terschiede des basalen ROS-Niveaus (Abb. 54 A). LN229-Zellen wiesen im Vergleich zu den A172- und U87MG-Zellen ein signifikant höhere basale Menge auf. Wurden die Zellen mit ART behandelt, erhöhten sich die ROS-Spiegel, wobei interessanterweise in U87MG-Zellen im Vergleich final der höchste ROS-Gehalt nachgewiesen werden konnte (Abb. 54 B). Dies war unerwartet, da die U87MG-Zellen im Vergleich als ART-resistenter einzustufen waren (Abb. 13 B). Offensichtlich führt die ART-vermittelte ROS-Produktion in diesen Zellen nicht zum Zelltod.

Die Untersuchungen der Wachstumsraten und der Zellzyklusverteilungen sollten zum einen Aufschluss über den beschriebenen ART-induzierten proliferationsinhibierenden Effekt geben, zum anderen auch Einflüsse der Behandlungen auf den Zellzyklus aufdecken. In allen untersuchten Zelllinien verhinderte die TMZ-Behandlung gemessen nach 48-72 h die Proliferation (Abb. 19). Eine Zunahme der Zellzahl war nicht mehr nachzuweisen. Vermutlich wurde nachdem Durchlaufen der ersten Replikation der Zellzyklus bereits angehalten, um die TMZ-induzierten DNA-Läsionen zu reparieren. Die ART-Nachbehandlung zeigte keine signifikanten Unterschiede. Die ART-Einzelbehandlung beeinflusste das Wachstum der A172- und U87MG-Zellen in den ersten 24 h nach Applikation nur geringfügig. Im Gegensatz dazu konnte 24 h nach der ART-Gabe in LN229-Zellen eine Reduktion der Gesamtzellzahl nachgewiesen werden (Abb. 19 A). Vergleichbares war in U87MG-Zellen erst nach 48 h zu beobachten (Abb. 19 C), die A172-Zellen zeigten über den Untersuchungszeitraum keine Reduktion der Gesamtzellzahl nach ART-Behandlung (Abb. 19 B). Im Vergleich zur Kontrolle konnte zwar ein verlangsamtes Wachstum beobachtet werden, jedoch war ART in dem hier applizierten Dosisbereich keinesfalls für einen Proliferationsstopp verantwortlich. Vielmehr ist der Rückgang der Gesamtzellzahl, die lediglich durch die Anzahl der vitalen Zellen bestimmt wurde, vermutlich auf diverse Zelltodereignisse zurückzuführen. Dass sich LN229-Zellen nach der ART-Behandlung z. B. wieder „erholen“ und sich die Zellzahl nach der Reduktion 24 h später annähernd wieder auf dem Niveau zum Behandlungszeitpunkt befindet, unterstützt diese Interpretation.

Die Zellzyklusanalysen zeigten keinen generalisierten Effekt. Zwar führte die TMZ-Behandlung in den untersuchten Zelllinien erwartungsgemäß zu einem G2-Arrest, ein durch die ART-Nachbehandlung-vermittelter Einfluss konnte lediglich in den LN229-Zellen beobachtet werden (Abb. 20-22). ART reduziert hierbei die Anteile der S-Phase-Population zugunsten der G2-Phase. Die ART-Einzelbehandlung führte bereits 24 h nach der Applikation

zur Verringerung der S-Phase, was sich 24 h später in einer Zunahme der G1-Population manifestierte (Abb. 20). Von einem wie in der Literatur beschriebenen G1-Arrest kann aufgrund der nachgewiesenen G2-Population nicht gesprochen werden. Diese könnte jedoch bereits vor der Behandlung mit ART generiert worden sein. Die ART-Einzelbehandlung erfolgte zum Zeitpunkt der ART-Gabe im kombinierten Regime, sprich 72 h nach der TMZ-Applikation und somit 96 h nach der Aussaat. Die bis dato unbehandelten Zellen konnten somit unbeeinflusst mehrere Zellzyklen durchlaufen. In U87MG-Zellen reduzierte die ART-Einzelbehandlung ebenfalls die S-Phase, hält die Zellen jedoch nicht signifikant in der G1-Phase (Abb. 22). Um die Frage der ART-vermittelten anti-proliferativen Wirkung abschließend zu klären, könnten Untersuchungen in zellzyklussynchronisierten Zellsystemen, BrdU- bzw. EdU-Inkorporationen oder auch die Analyse von Zellzyklusproteinen beitragen. Insgesamt wäre ein Proliferationsstopp der Krebszellen zwar ein Zugewinn für die Krebstherapie, jedoch muss in Kombination mit anderen Chemotherapeutika, die die Replikation zur Entfaltung der Zytotoxizität benötigen, darauf geachtet werden, dass sie dies nicht unterbinden.

4.1.2. Artesunat moduliert die DNA-Schadensantwort

Wie bereits erwähnt, führen die Einzelbehandlungen von TMZ und ART zur Induktion von DSBs in Glioblastomzellen [66, 94]. Zwar sind die Mechanismen für beide Agenzien, die die Bildung der DSBs bedingen, verschieden, dennoch – auch aufgrund der potenzierten Zelltodrate (bereits in Kap. 4.1.1 diskutiert) – war ein Anstieg der DSBs nach der Kombinationsbehandlung zu erwarten. Überraschenderweise konnte dies durch Immunfluoreszenzuntersuchungen des DSB-Markers γ H2AX nicht bestätigt werden (Abb. 23 A, B). Die Anzahl der γ H2AX-Foci zeigten in den Zelllinien LN229 und U87MG keinen signifikanten Unterschied zwischen der TMZ-Einzel- und Kombinationsbehandlung. Für die A172-Zellen war sogar eine signifikante Reduktion der Foci nach der TMZ/ART-Applikation zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigte die Analyse des DSB-Markers auf Proteinebene zelllinienspezifisch einen Anstieg der γ H2AX-Expression (TMZ *versus* TMZ/ART; Abb. 23 C). Sowohl in LN229- als auch A172-Zellen war eine starke Hochregulation detektierbar. G112SP-Zellen zeigten ebenfalls einen leichten Anstieg im Vergleich zur Einzelbehandlung, U87MG-Zellen exprimierten γ H2AX auf einem vergleichbaren Niveau zur TMZ-Probe. Prinzipiell würden diese Daten die Ausgangs-

hypothese einer synergistischen DBS-Induktion durch die Kombinationsbehandlung stützen, zumal diese ebenfalls im Einklang mit den Zelltodanalysen stehen. Auch hier reagierten die LN229- und A172-Zellen am empfindlichsten auf die Kombinationstherapie (Abb. 16 A, B). Die Differenz der γ H2AX-Ergebnisse lässt sich durch die verschiedenen Untersuchungsmethoden erklären. Hervorzuheben ist, dass die Analyse der γ H2AX-Foci lediglich intakte, nicht apoptotische Zellkerne einschloss. Zur Herstellung des Gesamtzellextrakts wurden alle, wahrscheinlich auch bereits tote Zellen lysiert. Erstaunlich ist jedoch, dass die ART-Einzelbehandlung, trotz der nachgewiesenen ROS-Produktion, nur geringfügig γ H2AX induziert. Um abschließend zu klären, ob die zusätzlichen DNA-Schädigungen auf ART-induzierte ROS zurückzuführen sind, könnten analoge Experimente mit einem Radikalfänger wie *N*-Acetylcystein durchgeführt werden. Ferner könnten auch die direkten DNA-Oxidationsprodukte wie z. B. 8-OxoG und Etheno-Adenin untersucht werden. Anzumerken ist hier, dass diese Untersuchungen zu einem früheren Zeitpunkt erfolgen sollten. Etheno-Adenin induziert als replikationsblockierende DNA-Läsion [94] während der Replikation die zytotoxischen DSBs, die hier resultierend untersucht wurden.

Neben der Induktion der initialen DNA-Schädigung könnten auch Modulationen der TMZ-vermittelten DDR durch die ART-Nachbehandlung für den gesteigerten Zelltod ursächlich sein. Primär wird die zelluläre DNA-Schadensantwort durch zwei verschiedene Kinasekaskaden, dem ATM-CHK2- und dem ATR-CHK1-Signalweg, koordiniert. TMZ induziert bereits in niedrigen Dosen die Aktivierung von ATR und die Phosphorylierung von CHK1 sowie CHK2. Die Aktivierung von ATM erfolgt zu einem späteren Zeitpunkt, was ebenfalls die Phosphorylierung der Checkpointkinasen und ferner die Stabilisierung von p53, die den G2/M-Arrest und die Initiation der Apoptose verantwortet, verursacht [285]. Durch die pharmakologische Hemmung der einzelnen Kinasen wurde deren Einfluss auf den TMZ-vermittelten Zelltod und der Effekt der ART-Nachbehandlung untersucht. Lediglich die Inhibition von ATR, nicht von ATM, zeigte in U87MG-Zellen eine signifikante Sensitivierung gegenüber TMZ und TMZ/ART (Abb. 24 C), wobei die ART-Nachbehandlung hierbei eine eher untergeordnete Rolle zu spielen scheint. ATR wird bereits beim Durchlaufen der ersten S-Phase durch *N*-Basenmethylierungen und aufgrund der durch die MMR entstandene ssDNA aktiviert. War die erste Aktivierung unzureichend, um die Zellen für eine Reparatur des Schadens zu arretieren, durchlaufen diese erneut den Zellzyklus bis die einzelsträngigen Regionen in der nächsten S-Phase zu DSBs umgewandelt werden [66, 68]. Möglicherweise verfügen U87MG-

Zellen über ein effizienteres ATR-Signaling und damit über die Möglichkeit, die Prozessierung der O^6 -MeG-Läsion früher zu erkennen und zu beheben. Dies könnte ferner auch die im Vergleich geringere Induktion von DSBs und die TMZ-Resistenz erklären.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit auch die Checkpointkinasen untersucht. In LN229-Zellen zeigte die Hemmung von CHK1 einen protektiven Effekt gegenüber der Kombinationsbehandlung (Abb. 25 A). Im Gegensatz dazu sensitivierte die CHK2-Depletion A172- und U87MG vor allem gegenüber der ART-Behandlung (Abb. 25 B, C). Insgesamt lieferte die Untersuchung der initialen DNA-Schäden und der DDR keine befriedigende, generalisierte Erklärung. Offensichtlich hat die ART-Applikation, die den TMZ-induzierten Zelltod verbessert, keinen eindeutigen Einfluss auf die Formierung der zytotoxischen DSBs und deren DDR. Dies führt zur Annahme, dass weitere Prozesse an der Vermittlung der Toxizität der Kombinationsbehandlung beteiligt sind.

4.1.3. Artesunat inhibiert die homologe Rekombinations-Reparatur und die TMZ-induzierte Seneszenz

Wie eingangs beschrieben ist O^6 -MeG die toxischste TMZ-induzierte DNA-Läsion. Durch die wiederkehrende Fehlpaarung mit Thymin entstehen durch die andauernde MMR sekundäre DNA-Schäden, die im zweiten Zellzyklus nach der Behandlung in der Entstehung replikationsabhängiger DSBs resultieren [66, 286]. Diese sekundären Schädigungen können durch die HRR prozessiert werden und somit einen überlebensfördernden Einfluss auf die Zelle ausüben [67, 287]. Ein Schlüsselenzym dieses Reparaturwegs ist RAD51, dessen Herunterregulation Glioblastomzellen nachweislich gegen TMZ sensitiviert [259]. Unter Beachtung, dass nicht nur die Steigerung zelltodvermittelnder Prozesse, sondern auch die Hemmung von Überlebensmechanismen für die Zytotoxizität der Kombinationsbehandlung verantwortlich sein könnte, wurde der Einfluss der ART-Nachbehandlung auf die HRR überprüft. Westernblotanalysen bestätigten in den untersuchten Glioblastomzelllinien sowie den GSC die Herunterregulation von RAD51 nach ART-Einzel- sowie der Kombinationsbehandlung (Abb. 26). Zur Verifizierung wurde die HRR-Kapazität nach ART-Applikation auch funktionell untersucht. Bereits sehr geringe Dosen (5-7,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) beeinträchtigen LN229-Zellen in der Fähigkeit, DSBs mittels der HRR zu reparieren (Abb. 27). Ferner führte nicht nur das kombinierte Behand-

lungsregime, sondern auch dessen Einzelbehandlungen im RAD51-defizienten Zellsystem zu einer erhöhten Sensitivität (Abb. 28). Dies bestätigt, dass ART die HRR entscheidend beeinflusst. Vergleichbares wurde kürzlich für Ovarialkarzinomzellen beschrieben. Auch hier bedingte ART eine Reduktion des RAD51-Niveaus und dadurch die Sensitivierung gegenüber Cisplatin [288].

Neben der HRR können DSBs über die NHEJ prozessiert werden. Durch Hemmung des Schlüsselenzyms DNA-PK_{cs} wurde auch dieser Aspekt untersucht. Die Inhibition der Kinase steigerte lediglich den ART-induzierten Zelltod (Abb. 29), was einerseits bestätigt, dass die NHEJ für den TMZ-vermittelten Zelltod in Gliomzellen marginal relevant ist [274]. Andererseits verifiziert dies die Beteiligung beider DSBR-Wege (HRR und NHEJ) an der Prozessierung der ART-induzierten DNA-Läsionen [93, 94].

Ein Überlebensprozess, der der O^6 -MeG-vermittelten Apoptose vorangestellt ist, ist die Autophagie. Frühere Studien zeigten, dass die Inhibition dieses Vorgangs den TMZ-induzierten Zelltod verstärkt [205]. Möglicherweise könnte auch die ART-Nachbehandlung diesen Mechanismus beeinflussen und so zur Steigerung des Zelltods beitragen. Durchflusszytometrische Analysen (Cytoid[®]-Färbung) bestätigten die TMZ-induzierte Autophagie in den untersuchten Glioblastomzelllinien. Auch die ART-Einzelbehandlung bedingte zu einem späteren Zeitpunkt einen Anstieg des Autophagie-Niveaus (Abb. 30). Die Kombinationsbehandlung bewirkte im Vergleich zur TMZ-Einzelbehandlung lediglich in U87MG-Zellen einen signifikant gesteigerten Einfluss auf diesen Überlebensprozess (Abb. 30 B, C). Die Interpretation dieser Ergebnisse ist nicht ganz trivial, zumal die biologische Relevanz der Autophagie kontrovers diskutiert wird. Auch in dem hier generierten Beispiel könnte die Autophagie sowohl überlebens- als auch zelltodfördernd interpretiert werden. Im Kontext zu den Sensitivitätsdaten der U87MG-Zellen könnte die im Vergleich zur TMZ-Einzelbehandlung gesteigerte Autophagierate die erhöhte Zelltodfrequenz erklären. Die Autophagie wäre in diesem Fall proapoptotisch. Werden diese Ergebnisse jedoch im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien, die sich durch eine höhere Sensitivität gegenüber der applizierten Therapie auszeichnen, gewertet, könnte die Inhibition der Autophagie diese Sensitivität bedingen und die Autophagie im Umkehrschluss als Überlebensmechanismus agieren. Dieses von ART ausgehende autophagieinhibierende Potenzial wurde bereits für Brustkrebszellen beschrieben

[207], wobei in Brustkrebszellen die ART-vermittelte Induktion der Autophagie gleichzeitig für eine Sensitivierung gegenüber Equirubicin sorgte [289].

Um die Relevanz der Autophagie zelllinien- und behandlungsspezifisch zu klären, sollte die Untersuchungen der Autophagie auch nach pharmakologischer Hemmung des Mechanismus durch z. B. 3-Methyl-Adenin erfolgen. Eine weitere Verifizierung könnte auch in Autophagie-defizienten Zellsystemen erfolgen. Dies könnte durch transiente bzw. stabile Herunterregulation der Schlüsselenzyme wie BECLIN-1 oder der *ATG*-Gene erreicht werden [290].

Ein weiterer für die O^6 -MeG-Läsion beschriebene Überlebensmechanismus ist die Aktivierung der Seneszenz, einem permanenten Zellzyklusarrest [205]. Frühere Studien zeigten bereits, dass TMZ in Glioblastomzellen Seneszenz induziert und damit die Resistenzentwicklung gegenüber dem Zytostatikum begünstigt [205, 210, 211]. Bemerkenswerterweise reduzierte die ART-Nachbehandlung die TMZ-induzierte Seneszenz in LN299- und A172-Zellen, was darauf hindeutet, dass ART eine Aufhebung des TMZ-vermittelten permanenten Zellzyklusarrestes bewirkt oder die Einleitung des Vorgangs, der zur Seneszenz führt, hemmt (Abb. 31 A-D). Die dadurch weiterhin gewährleistete Proliferation erlaubt die Prozessierung des O^6 -MeG und die damit einhergehende Zytotoxizität. Für U87MG-Zellen war dies nicht zu beobachten (Abb. 31 E, F) und GSC zeigten trotz eines seneszenten Phänotyps der unbehandelten Kontrolle, ebenfalls eine Reduktion der TMZ-induzierten Seneszenz durch die Kombinationsbehandlung (Abb. 32).

Die zugrundeliegenden Mechanismen der TMZ-vermittelten Seneszenz sind noch nicht vollständig geklärt. Es gibt jedoch Hinweise, dass UV-Strahlung durch gleichzeitige Aktivierung von p53 und AKT die Entstehung der zellulären Seneszenz verursacht [291]. Dass p53 generell eine wichtige Rolle in der Induktion der Seneszenz spielt, konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Die Kombinationsbehandlung hatte jedoch keinen Einfluss darauf (Abb. 33). Glioblastomzellen bergen viele, klar definierte genetische Läsionen, die zelluläre Signalwege wie z. B. die Zellproliferation entscheidend stören. Die Inaktivierung des Tumorsuppressors PTEN und damit die Aktivierung von AKT ist in Gliomen weit verbreitet [292]. Eine durch ART-vermittelte Hemmung des AKT-Signalweges konnte bereits nachgewiesen werden [293, 294]. Ferner bedingt der Verlust von PTEN u. a. die Onkogen-induzierte Seneszenz [295-297]. Die hier untersuchten Glioblastomzellen verfügen über einen funktionalen p53-Status, weisen jedoch Unterschiede hinsichtlich ihrer PTEN-Expression auf. Frühere Stu-

dien machten auf das PTEN-vermittelte Umschalten zwischen Seneszenz und Apoptose in Gliomen nach IR aufmerksam: PTEN-defiziente U87MG-Zellen, die demnach über einen aktiven AKT-Signalweg verfügen, induzieren Seneszenz, während PTEN-profiziente LN428- und LN18-Zellen unter denselben Bedingungen die Apoptose bevorzugen [298]. Ein vergleichbares Umschalten oder ein anderer generalisierter Effekt konnte bzgl. des PTEN-Status oder auch in Bezug auf die ART-Nachbehandlung nicht beobachtet werden (Abb. 34). Möglicherweise könnten andere Faktoren, die in den AKT-Signalweg involviert sind, durch ART gehemmt werden und dadurch die TMZ-induzierte Seneszenz reduzieren.

4.1.4. Artesunat beeinflusst Ferroptose und UPR

Untersuchungen in Pankreaskarzinomzellen identifizierten ART als einen spezifischen Aktivator der Ferroptose, einer Form der programmierten Nekrose [299]. Wie die Bezeichnung impliziert, ist diese Art des Zelltods eisenabhängig und zeichnet sich durch Verlust der Homöostase sowie dem Anstieg von Lipidperoxidationen aus [191]. In früheren Glioblastom-Studien wurde bereits eine Steigerung des ART-induzierten Zelltods in Anwesenheit von Eisen beobachtet [94], weshalb die Untersuchung der Ferroptose auch im Kontext der hier verwendeten Kombinationstherapie interessant wurde. Die spezifische Hemmung dieses Zelltodmechanismus durch Ferrostatin-1 zeigte lediglich für die ART-Einzelbehandlung in LN229-Zellen eine signifikante Reduktion des Zelltods (Abb. 36 A). Die ART-vermittelte Ferroptose verantwortete somit nicht generell die Sensitivierung der Glioblastomzellen im kombinierten Behandlungsansatz.

Eine weitere, stark konservierte Form der zellulären Stressantwort wird über das Endoplasmatische Retikulum (ER) vermittelt und aktiviert die UPR [300, 301]. In der Literatur gibt es viele Hinweise darauf, dass Krebszellen über ungewöhnlich erhöhte UPR-Niveaus verfügen [302]. Im Kontext von Glioblastomen konnte sogar eine gesteigerte Expression von BIP, einem der Schlüsselenzyme der UPR, identifiziert werden. Ferner korreliert die erhöhte BIP-Expression mit einem verkürzten Überleben [303-305]. Störungen der in Krebszellen meist protektive interpretierten UPR können auch, wahrscheinlich nach Überschreiten eines Schwellenwertes, Zelltodmechanismen induzieren [302, 306]. Ob die Kombinationsbehandlung diesen Mechanismus beeinflusst und dadurch die Sensitivierung gegenüber TMZ bedingt, wurde durch die spezifische Hemmung der UPR überprüft. Überraschenderweise reduzierte die Inhibition des ER-Stress den TMZ/ART-induzierten Zelltod (Abb. 36 A) in LN229-

Zellen. Noch erstaunlicher war die beobachtete Sensitivierung gegenüber der ART- bzw. TMZ/ART-Behandlung in A172- und U87MG-Zellen (Abb. 36 B, C). Bei genauerer Betrachtung der Daten fällt jedoch auf, dass die beiden Agenzien die UPR konträr beeinflussen, was die signifikante Reduktion des TMZ-induzierten Zelltods in U87MG-Zellen bestätigt.

Die TMZ-induzierte Apoptose scheint in Glioblastomzellen nicht nur durch die Prozessierung des O^6 -MeG und der DSBs einherzugehen. Möglicherweise hat auch die Akkumulation mißgefalteter Proteinen im ER einen Einfluss darauf und aktiviert die UPR [306, 307]. Initial wirkt die UPR protektiv: Die drei regulierenden Rezeptoren IRE1, ATF6 und PERK aktivieren eine Signalkaskade, die einen Anstieg molekularer Chaperone wie z. B. BIP/GRP78 verantworten. Ferne blockieren sie die Translation von mRNAs, was dem ER Zeit zur Beseitigung des ER-Stress verschafft [307, 308]. Eine verlängerte UPR bedingt im Gegensatz ein Umschalten von pro-Überleben zu pro-Zelltod. Dies wird durch die Hochregulation von ATF4 und CHOP erreicht [309-313]. CHOP ist pro-apoptotisch und bedingt die Herunterregulation des anti-apoptotischen BCL-2-Proteins [314]. Die Hemmung der UPR sensitiviert A172- und U87MG-Zellen gegenüber ART (Abb. 36 B, C), was in diesem Fall eine protektive Funktion der UPR unterstreicht. Des Weiteren fördert die Hochregulation von ATF4 auch die Autophagie [315], was u. a. die Überlappung der molekularen Mechanismen der UPR und Autophagie verdeutlicht.

In Gliomzellen wurde bereits eine Verstärkung der TMZ-induzierten Apoptose durch die Hemmung der Mitochondrien- und ER-Stress-induzierten Autophagie beschrieben [316]. Leider behandelten die Autoren die untersuchten U87MG-Zellen mit sehr hohen TMZ-Dosen (400 μ M), was die Induktion von *N*-Alkylierungen begünstigt. Ein Vergleich der beschriebenen Prozesse ist aufgrund der unterschiedlichen Prozessierung der DNA-Schäden irrelevant. Kürzlich konnte jedoch ein vielversprechender Zusammenhang zwischen der Induktion des ER-Stress und der Degradation von DNA-Reparaturproteinen hergestellt werden. In Gliomzellen soll die Induktion von ER-Stress für den Abbau von RAD51 sehr wahrscheinlich durch die Hochregulation von ATF4 verantwortlich sein [317]. Ein solcher ER-assoziiertes Abbau (engl. *ER-associated degradation*, ERAD) anormaler Proteine erfolgt im Zytosol [318]. Diese Proteine translozieren über die ER-Membran ins Zytosol, wo Ubiquitin-konjugierte Enzyme diese für die proteosomalen Abbau markieren [319]. In Lungenkarzinomzellen konnte dieser ERAD ebenfalls für RAD51 bestätigt werden [320]. Die dadurch unterdrückte DNA-Reparatur sensitivierte die Zellen gegenüber IR. Ein ART-induzierter ERAD von RAD51 könnte auch in

LN229-Zellen für die reduzierten RAD51-Level verantwortlich sein. Aufgrund der Sensitivierung gegenüber ART und TMZ/ART nach der Hemmung des ER-Stresses ist dies für A172- und U87MG-Zellen fragwürdig. Im Vergleich zu den LN229-Zellen ist die RAD51-Expression nach ART in diesen beiden Zelllinien und den GSC weniger reduziert, was die HRR weniger effizient beeinflussen könnte. Rein spekulativ könnten in diesen Zellsystemen die geringen ART-Dosen den zuvor beschriebenen Schwellenwert gerade unterschreiten, was die protektive Wirkweise der UPR begünstigt. Ferner könnte diese im Vergleich zu den LN229-Zellen auch später induziert werden. Somit würde das Umschalten des protektiven in einen apoptotischen Effekt zu einem späteren als dem hier untersuchten Zeitpunkt erfolgen.

4.1.5. Artesunat erhöht die therapeutische Effektivität der TMZ-Behandlung *in vivo*

Nachdem gezeigt wurde, dass die ART-Nachbehandlung die TMZ-induzierte Zytotoxizität *in vitro* signifikant erhöht, wurde dieser Einfluss auch im Mausmodell untersucht. In subkutanen Xenograft-Experimenten wurde das Tumorwachstum beobachtet und zeigte eine signifikante Regression im kombinierten Behandlungsregime (Abb. 37). Dieser chemosensitivierende Effekt wurde bereits für einige resistente Krebslinien beschrieben, wobei dem aktiven Metaboliten DHA im Vergleich zu ART eine weitaus stärkere synergistische Wirkung zukommt [321, 322]. DHA verbessert z. B. den therapeutischen Effekt von Gemcitabin, einem Zytostatikum, welches zur Behandlung von Pankreaskarzinomen eingesetzt wird und häufig zu behandlungsinduzierten Resistenzen führt. In *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten wirkt DHA antiproliferativ und vervierfacht (*in vitro*) bzw. verdoppelt (*in vivo*) die Gemcitabin-induzierte Apoptose [323]. Ähnliche Effekte wurden auch für hepatozelluläre Karzinome gezeigt [324], ferner verbessert ART sowie dessen Metabolit die Zytotoxizität von Carboplatin in Ovarialkarzinomen [325], Doxorubicin in lymphozytischen Leukämien [326], Cyclophosphamid in Lungenkrebszellen [327]. Auch in chemoresistenten Neuroblastomzelllinien konnten beeindruckende Antikrebs-Effekte nachgewiesen werden [328]. Die Ko-Behandlung mit ART bzw. dessen Derivaten führte auch im IR-basierten Therapieansatz zu einer gesteigerten Zelltodrate [329-331]. Dass eine Herunterregulation des spezifischen DSB-Reparatur-Proteins RAD51 durch ART die Tumorregression verantworten könnte, wurde erstmals 2015

publiziert [288]. Die Autoren zeigten im Mausmodell eine eindrückliche Sensitivierung von Ovarialkarzinomzellen gegenüber Cisplatin durch die zusätzliche Applikation von ART. Die hier vorliegende Arbeit bestätigt eine vergleichbare Wirkweise in Glioblastomzellen. Hervorzuheben ist allerdings, dass sich sowohl die Dosierung als auch die Applikationsart des Antimalariamedikaments unterscheiden. Im Ovarial-Xenograft-Experiment wurden täglich 50 mg/kg KG intraperitoneal injiziert, während im Glioblastom-Modell lediglich 1 mg/ml kg KG kontinuierlich über das Trinkwasser verabreicht wurden. Zwar ist ersteres eine optimalere Darreichungsform, gleichzeitig allerdings, die für das Tier belastendere Form der ART-Gabe. Unabhängig davon wurden beide Dosen, auch in Kombination mit den jeweiligen Zytostatika, sehr gut toleriert, was auf eine gute Verträglichkeit des Patienten hoffen lässt. Klinische Studien bestätigen dies für ART bereits auch für Kleinkinder [332-334].

Bezüglich der TMZ-Gabe ist zu erwähnen, dass auch diese sehr gering gewählt wurde und den Tieren lediglich einmal injiziert wurde. Die klinische Behandlung des GB-Patienten sieht, aufgrund der Halbwertszeit von etwa zwei Stunden [335], eine tägliche Applikation des Chemotherapeutikums vor. Durch die Verstärkung des therapeutischen Effektes in Kombination mit ART, könnten die Patienten durch eine verringerte TMZ-Dosis und den damit reduzierten Nebenwirkungen profitieren. Dass die Applikation von ART als Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung durchaus klinisch attraktiv ist, bestätigen aktuelle klinische Studien: in Phase I-Studien werden bereits Dosierung, Sicherheit und Pharmakokinetik in metastasierendem Brustkrebs (NCT00764036), soliden Tumoren (NCT02353026) und hepatozellulären Karzinomen (NCT02304289) getestet. Ferner werden, zur Überprüfung der Effektivität, Patienten für Phase II-Studien rekrutiert (CRC: NCT02633098; NCT03093129).

Neben diesen vielversprechenden *in vitro*- und präklinischen Daten muss jedoch ausgeschlossen werden, dass sich systemische Effekte durch die ART-Gabe nicht auch negativ auf die TMZ-vermittelte Sensitivität des Normalgewebes auswirken. Ferner sollten auch weitere Langzeitstudien die hier vorgestellte Herunterregulation des HRR-Proteins RAD51 systemisch untersucht werden. Die Dysregulation dieses Proteins ist für viele Tumorentitäten bekannt [336-341] und verursacht aufgrund der Hochregulation der HRR ein vermindertes Therapieansprechen DNA-schädigender Agenzien. Allerdings ist RAD51 auch für gesunde Zellen ein unabdingbarer Faktor der genomischen Integrität replizierender Zellen. Durch diese eingeschränkte Fähigkeit der DSBR würden DSBs vermehrt über die fehlanfälligere NHEJ repariert

werden. Dies könnte wiederum die Wahrscheinlichkeit des Verbleibs mutagener Läsionen in der DNA erhöhen.

4.2. Targeting der homologen Rekombinations-Reparatur verbessert die Zelltodrate Alkylanzien-basierter Therapien von Glioblastomzellen

Die zytotoxischen Mechanismen alkylierender Agenzien wie auch die der chlorethylierenden Nitrosoharnstoffe (engl., *chloroethylating nitrosureas*, CNUs), wurden in den vergangenen Jahren hinreichend untersucht [57]. CNUs induzieren ein breites Spektrum an DNA-Addukten, wobei das O^6 -CIETG als die toxischste Läsion beschrieben wurde. Es ist ein sehr instabiles Addukt und unterliegt intramolekularen Umlagerungen, die zur Entstehung des Intermediats $N1-O^6$ -Ethanoguanin und schließlich zum zytotoxischen $N1$ -Guanin- $N3$ -Cytosin Interstrang-*Crosslink* (ICL) führen (Kap. 1.2.2; [78, 170]). ICLs sind Läsionen, die die Replikationsgabel blockieren. Diese können jedoch über einen komplexen Reparaturvorgang beseitigt werden und so zu einem erneuten Start der Replikation beitragen [342]. Während der Reparatur der ICLs werden durch Endonukleasen transiente DSBs generiert [343, 344]. Die DNA-Schadensantwort sowie die nachgeschalteten, apoptotischen Signalwege werden durch diese Blockierung sowie der entstandenen DSB-Intermediate aktiviert [345, 346]. Es ist somit denkbar, dass auch die Reparatur dieser sekundären DNA-Schäden über die Ansprechrate auf CNUs oder umgekehrt, über die behandlungsinduzierte Resistenz der Tumoren, entscheidet. Wie eingangs beschrieben, gibt es zwei Hauptmechanismen, DSBs zu reparieren: die HRR und das NHEJ (Kap. 1.3.1.4). Letztere repräsentiert den vorrangig genutzten Reparaturweg von vor allem IR-induzierten DSBs in der G₀- und G₁-Zellzyklusphase [347]. Zudem ist dieser fehleranfällig und kann zu Chromosomenaberrationen führen [348]. Im Gegensatz dazu operiert die HRR S- bzw. G₂-Phasen-spezifisch und nutzt die vorhandenen Schwesterchromatiden als Matrize zur Reparatur [347]. Dies garantiert eine fehlerfreie Beseitigung der geschädigten DNA-Läsion. Dass der HRR im Vergleich zur NHEJ eine zentrale Rolle bezüglich der Zytotoxizität gegenüber CNUs zukommt, konnte in früheren Untersuchungen gezeigt werden. HRR-defiziente Zellen (BRCA2-, RAD51D- und XRCC3-Mutanten) waren hypersensitiv gegenüber ACNU, während NHEJ-Defiziente (KU80- und DNA-PK-Mutanten) nicht oder nur kaum auf dieses Agenz reagierten [346]. Zusätzlich existieren viele Studien, die in verschiedenen Krebsentitäten eine Überexpressionen des Schlüsselproteins der HRR, RAD51, nachweisen konnten [251, 349-352]. In der Mehrzahl der Studien ist diese RAD51-Überexpression mit einer schlechten Prognose für den Patienten assoziiert. Die pharmakologische Inhibition

der HRR könnte somit eine probate Strategie zur Sensitivierung von Krebszellen gegenüber CNUs darstellen.

4.2.1. CCNU induziert ICLs in Glioblastomzellen in Abwesenheit des DNA-Reparaturproteins MGMT

O^6 -CIETG ist wie O^6 -MeG ein Substrat des Reparaturenzyms MGMT. Die Beseitigung dieses DNA-Schadens wird häufig mit der Resistenz vieler Krebszellen gegenüber chlorethylender Chemotherapeutika assoziiert [77, 353-355]. In Hirntumoren variiert die MGMT-Aktivität sehr: 17 % der vorbehandelten Tumore zeigen kaum Aktivität des Proteins, während 30 % der Tumore MGMT auf geringem Niveau exprimieren [112, 273]. In diesen Tumoren sollten die O^6 -CIETG-Läsionen persistieren und S-Phase-spezifisch die zytotoxischen ICLs ausbilden. Die hier projektspezifisch gewählten Glioblastomzellen besitzen einen methylierten *MGMT*-Promotor, was die Ausbildung der ICLs aufgrund der Abwesenheit des Proteins potenziell ermöglicht. Zur Bestätigung wurde dies mittels einer modifizierten SCGE oder einem sog. *Comet Assay* überprüft (Abb. 39). Bereits 24 h nach der Behandlung mit dem ICL-induzierenden Agens CCNU waren selbige für alle untersuchten Zelllinien nachweisbar, was das Zellsystem als geeignet erwies. Ferner wurde auch die Effizienz der pharmakologischen Hemmstoffe auf die Inhibition der HRR getestet und bestätigt (Abb. 40).

4.2.2. CCNU und die HRR-Inhibitoren beeinflussen die DNA-Replikation

Um zu überprüfen, ob die O^6 -CIETG-vermittelten ICLs tatsächlich in der Lage sind, das Fortschreiten der Replikationsgabel zu verhindern und somit einen Einfluss auf die S-Phase zu erreichen, wurden Zellzyklusanalysen durchgeführt (Abb. 41). Bereits 16 h nach der Behandlung mit CCNU kommt es zu der erwarteten Arretierung der Zellen in der G2-Phase, was auf die Induktion diverser Reparaturmechanismen schließen lässt. In Kombination mit den HRR-Inhibitoren war kein genereller Unterschied zur Einzelbehandlung erkennbar. Dies war überraschend, da bereits für Säugerzellen gezeigt wurde, dass z. B. Mirin zur Aufhebung eines IR-induzierten G2/M-Arrest führt [246]. Unabhängig vom DNA-schädigenden Agens, ist mög-

licherweise auch die Untersuchung des Zellzyklus eine nicht ausreichend sensitive Methode, um etwaige Veränderungen der Replikation zu detektieren.

Im weiteren Verlauf wurde daher auf Einzelzellebene der Einbau des Thymidinanalogons EdU in die DNA nach der Behandlung mit CCNU und/ oder den HRR-Inhibitoren untersucht. Signifikante Unterschiede konnten 16 h nach der Behandlung beobachtet werden (Abb. 42). Die CCNU-Einzelbehandlung zeigte einen verminderten Einbau des Analogons und damit eine reduzierte Synthesegeschwindigkeit. Dieser anti-proliferative Effekt wurde sogar durch die Applikation der HRR-Hemmstoffe B02 und Mirin, nicht aber RI-1, signifikant gesteigert, was darauf hindeutet, dass die Replikation anhaltend blockiert wurde.

Um zu untersuchen, welcher Mechanismus die Hemmung der Replikation genau verantwortet, wurde die Struktur neu synthetisierter DNA mittels des sog. *Fiber*-Tests analysiert. Hierbei werden verschiedene Analoga in die DNA inkooperiert und die Verteilung dieser Strukturen anschließend visualisiert. Im Vergleich zur Kontrolle waren bereits schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach der Behandlung (6 h) blockierte Strukturen erkennbar (Abb. 43). Sehr wahrscheinlich verantworten die CCNU-induzierten ICLs die Blockierung der Replikationsgabel und verhindern dadurch eine fortlaufende DNA-Synthese. Dies konnte bereits auch für andere genotoxische Noxen wie UV-Strahlung und MMS nachgewiesen werden [356, 357]. Hier führen blockierte Replikationsgabeln zu einem Zusammenbrechen der selbigen, was final in der Induktion von DSBs resultiert. Ähnliches könnte somit auch in den hier untersuchten Glioblastomzellen eine CCNU-vermittelte Toxizität verursachen. Bezüglich der applizierten CCNU-Dosen ist hervorzuheben, dass auch diese im Niedrigdosisbereich gewählt wurden. Signifikante Unterschiede in der Verteilung diverser DNA-Strukturen zwischen der CCNU-Einzel- und den Kombinationsbehandlungen mit den HRR-Inhibitoren waren nicht eindeutig. Sie zeigten jedoch Tendenzen, den CCNU-vermittelten replikationsblockierenden Effekt zu steigern. Hervorzuheben ist, dass die Hemmstoffe selbst die Replikation beeinflussen. B02 und Mirin zeigten replikationsinhibierende Effekte, während RI-1 kontroverserweise den CCNU-induzierten Replikationsblock scheinbar aufhebt. Die Klärung dieser Effekte steht noch aus. Möglicherweise könnten hier Experimente in einem Zellzyklus-synchronisierten Untersuchungssystem einen spezifizierten Aufschluss über den Einfluss der Hemmstoffe auf die CCNU-induzierte Replikationsblockade liefern. Ein Einfluss der Lösungsmittel ist auszuschließen.

4.2.3. Inhibition der HRR beeinträchtigt die Reparatur der CCNU-induzierten DSBs und erhöht die Klastogenität

Das Blockieren der Replikationsgabel kann, wie bereits angedeutet, schwerwiegende zelluläre Schädigungen generieren. Neben dem Zusammenbruch der Replikationsmaschinerie und der daraus resultierenden DSBs, kann auch die genomische Stabilität gefährdet sein. Chromosomenaberrationen sind die Folge. Eines der Schlüsselfaktoren in der Schadensantwort ist RPA. Während der DNA-Replikation verhindert RPA durch die Bindung an ssDNA ein Zurückwinden bereits entwundener DNA. Als Marker für replikativen Stress [358], kommt dem RPA-Protein auch in der HRR eine zentrale Rolle zu. Ebenfalls durch Bindung der ssDNA schützt es initial die geschädigten DNA-Enden vor der Degradation durch diverse Nukleasen [359]. Übereinstimmend zu den Replikationsdaten, induziert CCNU nachweislich Replikationsstress in allen untersuchten Glioblastomzelllinien. Immunfluoreszente Analysen des RPA-Proteins bestätigten dies nicht nur für die CCNU-Einzelbehandlung, sondern auch für alle Kombinationsbehandlungen mit den HRR-Hemmstoffen (Abb. 44). Im Gegensatz zu den *Fiber*-Experimenten zeigte die Einzelbehandlung mit den Hemmstoffen keinen Effekt auf die Replikation. Dies könnte möglicherweise mit dem Zeitpunkt der Untersuchung zusammenhängen. Die DNA-Strukturen und damit der Einfluss auf die Replikation wurde bereits sehr früh nach der Behandlung analysiert (6 h), während die RPA-Foci initial 24 h nach der CCNU-Applikation und späteren Zeitpunkten untersucht wurden. Dabei fiel auf, dass die Anzahl der RPA-Foci in den Kombinationsbehandlungen mindestens vergleichbar zu der Menge der CCNU-induzierten RPA-Foci war. Diese persistierten in den HRR-inhibierten Zellen, während sich die Anzahl der CCNU-vermittelten Läsion über die Zeit signifikant annähernd auf Kontrollniveau reduzierte. Dies lässt darauf schließen, dass RPA-induzierbare Läsionen zwar auch in HRR-inhibierten Glioblastomzellen gebildet, aber nicht zeitnah repariert werden.

Durch alkylierende Agenzien induzierte DSBs sind Gegenstand der HRR. Dies wurde sowohl für O^6 -MeG-induzierende Stoffe [67, 259] als auch chlorethylierende Medikamente beschrieben [259, 346, 360]. Es ist damit nur plausibel, dass die Hemmung dieses Reparaturweges die Bildung bzw. den Verbleib der DSBs fördert. Im Kontext mit den persistierenden RPA-Daten, bestätigten auch die Untersuchungen des DSB-Markers γ -H2AX erwartungsgemäß den Verbleib der CCNU-induzierten DNA-Schädigungen. Während die DSBs ohne die Hemmung der HRR 72 h nach der Bildung nahezu vollständig repariert wurden, persistierten

diese ausnahmslos im vergleichbaren Ausmaß zur initialen Schädigung in Anwesenheit der HRR-Inhibitoren (Abb. 46). Die signifikante Formierung der DSBs zu sehr frühen Zeitpunkten (6 h und 16 h, Abb. 45) und deren weitere Akkumulation über die Zeit, stützen somit auch die Hypothese, dass ein zu UV und MMS vergleichbarer Mechanismus der DSBs-Induktion zugrunde liegt. Die ICLs blockieren die Replikationsgabel, diese kollabiert und induziert dadurch DSBs. Ferner werden diese aufgrund der Hemmung der HRR nicht bzw. wahrscheinlich verzögert repariert.

Alternativ zum bereits beschriebenen NHEJ verfügt eine Zelle über weitere *Backup*-Reparaturmechanismen. Ein Beispiel hierfür wäre die alternative End-Verknüpfung (engl. *alternative end-joining*, A-EJ). Ähnlich zur NHEJ benötigt auch dieser Reparaturweg keine Sequenzhomologie zur Reparatur der Läsion, wird jedoch vergleichbar zur HRR durch die Resektion ssDNA initiiert [247, 361, 362]. Das A-EJ ist jedoch hoch mutagen [363]. Bestätigende Hinweise, dass die Hemmung der HRR die CCNU-vermittelte Klastogenität erhöht, lieferten Untersuchungen der Metaphase-Chromosomen (Abb. 47). Alle untersuchten Zelllinien zeigten in Kombination mit den RAD51-Hemmstoffen einen beeindruckenden, signifikanten Anstieg in der Häufigkeit von Chromosomenaberrationen. Ein vergleichbarer Effekt in Kombination mit dem MRE11-Inhibitor Mirin war lediglich in einer der untersuchten Glioblastomzelllinien zu beobachten. Neben der Hemmung von MRE11 wurde für Mirin bereits auch eine Reduktion der NHEJ-Reparatur-Effizienz nachgewiesen [247]. Möglicherweise gelingt das Umschalten auf einen weniger mutagenen *Backup*-Reparaturmechanismus in den LN229- und U87MG-Zellen besser, als den A172-Zellen. In weiteren funktionalen Reparatur-*Assays* könnte dieses Umschalten untersucht werden. Inhibitionsexperimente oder Analysen in Reparatur-defizienten Systemen würden diese Ergebnisse bestärken.

4.2.4. Die Hemmung von RAD51 und MRE11 verstärken die CCNU-vermittelte Zytotoxizität

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Hemmung der HRR die CCNU-vermittelte Genotoxizität signifikant beeinflusst, wurde abschließend dieser Effekt auf die Zytotoxizität untersucht. In Koloniebildungstest zeigten die untersuchten Glioblastomzelllinien nach Inhibition der HRR eine ausgeprägte Reduktion des Zellüberlebens (Abb. 48). Das reproduktive Zellüberleben wurde sowohl durch CCNU (Abb. 48) als auch TMZ (Abb. 57) zunächst nur moderat beeinträchtigt, die Applikation der Hemmstoffe steigerte das Zellsterben. Zelltodanalysen bestätigten dies nicht nur für die Glioblastomzelllinien (Abb. 49), sondern auch für eine weitere Patientenlinie (Abb. 59). Die applizierte CCNU-Einzeldosis war zunächst subtoxisch. Folgte auf die CCNU-Behandlung die Hemmung der HRR, war eine eindruckliche Steigerung des Zelltods, vornehmlich der Apoptose erkennbar (Abb. 49). Die Untersuchungen der Caspase-Aktivierung untermauern dieses Ergebnis (Abb. 50).

RI-1 bindet direkt an Cystein-319 das humanen RAD51 [257]. Für B02 konnte ebenfalls eine spezifische Bindung an das HRR-Protein gezeigt werden, wobei die exakte Bindestelle noch nicht identifiziert wurde [246]. In beiden Fällen wird jedoch, wie eingangs beschrieben, die Bindung von Rad51 an die ssDNA erschwert, was die HRR nachhaltig einschränkt. Im Vergleich der RAD51-Inhibitoren fiel auf, dass RI-1 auf Glioblastomzellen weniger toxisch wirkt als B02. Insgesamt scheint RI-1 auch geringfügig effizienter im Verstärken der CCNU-vermittelten Geno- und Zytotoxizität.

Ein weiteres Ziel dieser Studie war es, die direkte pharmakologische Hemmung der RAD-51-Hemmstoffe mit dem des DNA-Schadens-*Signaling*-Hemmstoffs Mirin zu vergleichen. Der MRN-Komplex spielt eine zentrale Rolle in der Erkennung des DSBs. MRE11 ist eines der Schlüsselproteine des trimeren MRN-Komplex, welcher aus NBS1, RAD50 und MRE11 besteht. MRE11 besitzt Endo- und Exonukleaseaktivität [364]. Es wurde gezeigt, dass Mirin an MRE11 bindet und dessen Nukleaseaktivität inhibiert ohne die Bindung von MRE11 an die DNA oder die der MRN-assoziierte DNA-Aktivität zu beeinflussen [246]. Zusätzlich inhibiert Mirin die ATM-abhängige Phosphorylierung von NBS1 und CHK2 [246]. Dadurch ist ferner die Aktivierung der DDR über den ATM/ATR-CHK1-CHK2-Signalwegs nicht mehr korrekt ausführbar. Da MRN und ATM unabhängig in der Erkennung des DNA-Schadens und dem Prozessieren der DSBs mittels HRR agieren [365], war es dennoch denkbar, dass die Hemmung des

MRN-Komplexes einen vergleichbar sensitivierenden Effekt zu dem der RAD51-Hemmstoffe bedingt. Dies war in der Tat zu beobachten. Mirin erhöht die Anzahl der DSBs und die Zelltodrate in CCNU-behandelten Glioblastomzellen in einem ähnlichen Ausmaß wie RI-1 und B02. Anzumerken ist, dass die Kombination aus Mirin und einem RAD51-Hemmstoff sehr toxisch auf LN229-Zellen wirkte (Abb. 60).

4.2.5. Die Hemmung von RAD51 durch RI-1 verbessert den durch CCNU-induzierten therapeutischen Effekt *in vivo*

In früheren Studien wurde gezeigt, dass die Herunterregulation von RAD51 oder BRCA2, einem weiteren Schlüsselprotein der HRR, durch siRNAs die Zelltodraten in CCNU- oder TMZ-behandelten Glioblastomzellen verstärkt [259, 360]. Prinzipiell repräsentieren Virusvermittelte transduzierende Systeme eine vertretbare Herangehensweise, die HRR in der Glioblastomtherapie gezielt anzugreifen. Jedoch sind diese Strategien vergleichbar schwer klinisch realisierbar. Die pharmakologische Inhibition bietet daher eine einfache und elegante Möglichkeit des *Targetings*. Die in der vorliegenden Arbeit verglichenen Hemmstoffe stellen RI-1 als einen geeigneten Kandidaten heraus. Der RAD51-Hemmstoff B02 überzeugt ebenfalls durch die Induktion geno- und zytotoxischer Effekte auf Glioblastomzellen, zeigt allerdings auch im Vergleich toxische Wirkung *per se*. Mirin scheidet aufgrund der pleiotropen Wirkweise für eine gezielte Behandlungsstrategie aus.

Für die Untersuchungen des Tumorwachstums im Mausmodell wurde daher RI-1 als HRR-Inhibitor gewählt. Sowohl im U87MG- als auch im LN229-Xenograft verringerte die Kombination von CCNU und RI-1 nicht nur das Tumorwachstum, in einigen Tieren war sogar eine komplette Regression des Tumors zu beobachten. Hervorzuheben ist weiter, dass die Tiere die Kombinationstherapie ohne offensichtliche Nebenwirkungen ausgesprochen gut tolerierten. Dies lässt auf eine gute Verträglichkeit im Patienten hoffen. Selbstverständlich sind klinische Studien, die die systemische Toxizität des RAD51-Hemmstoffs untersuchen, unerlässlich. Nichtsdestotrotz unterstützen diese präklinischen Daten die Initiation klinischer Studien, die die Applikation von HRR-Inhibitoren in Kombination mit alkylierenden Agenzien in der Glioblastomtherapie und möglicherweise auch anderen Tumorentitäten vorsieht.

5. REFERENZEN

1. Wen, P.Y. and S. Kesari, Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*, 2008. **359**(5): p. 492-507.
2. Ohgaki, H. and P. Kleihues, The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(4): p. 764-72.
3. Crespo, I., et al., Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. *Am J Pathol*, 2015. **185**(7): p. 1820-33.
4. Brennan, C.W., et al., The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*, 2013. **155**(2): p. 462-77.
5. Dunn, J., et al., Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy. *Br J Cancer*, 2009. **101**(1): p. 124-31.
6. Hegi, M.E., et al., MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*, 2005. **352**(10): p. 997-1003.
7. Wick, W., et al., Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 2012. **13**(7): p. 707-15.
8. Ohgaki, H. and P. Kleihues, Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2005. **64**(6): p. 479-89.
9. Ostrom, Q.T., et al., CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro Oncol*, 2014. **16 Suppl 4**: p. iv1-63.
10. Stupp, R., et al., Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*, 2009. **10**(5): p. 459-66.
11. Stupp, R., et al., Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 2005. **352**(10): p. 987-96.
12. Wrensch, M., et al., Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol*, 2002. **4**(4): p. 278-99.
13. Young, R.M., et al., Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. *Ann Transl Med*, 2015. **3**(9): p. 121.
14. De Bont, R. and N. van Larebeke, Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*, 2004. **19**(3): p. 169-85.
15. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
16. Bartkova, J., et al., DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, 2005. **434**(7035): p. 864-70.
17. Gorgoulis, V.G., et al., Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature*, 2005. **434**(7035): p. 907-13.
18. Curtin, N.J., DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(12): p. 801-17.
19. Jaeckle, K.A., et al., Correlation of tumor O6 methylguanine-DNA methyltransferase levels with survival of malignant astrocytoma patients treated with bis-chloroethylnitrosourea: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol*, 1998. **16**(10): p. 3310-5.
20. Liu, L. and S.L. Gerson, Targeted modulation of MGMT: clinical implications. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(2): p. 328-31.
21. Larsen, E., et al., Organ and cell specificity of base excision repair mutants in mice. *Mutat Res*, 2007. **614**(1-2): p. 56-68.

22. Sweasy, J.B., T. Lang, and D. DiMaio, *Is base excision repair a tumor suppressor mechanism?* *Cell Cycle*, 2006. **5**(3): p. 250-9.
23. Abbotts, R. and S. Madhusudan, *Human AP endonuclease 1 (APE1): from mechanistic insights to druggable target in cancer.* *Cancer Treat Rev*, 2010. **36**(5): p. 425-35.
24. Zhang, X., et al., *Polymorphisms in DNA base excision repair genes ADPRT and XRCC1 and risk of lung cancer.* *Cancer Res*, 2005. **65**(3): p. 722-6.
25. Zaremba, T., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) pharmacogenetics, activity and expression analysis in cancer patients and healthy volunteers.* *Biochemical Journal*, 2011. **436**: p. 671-679.
26. Andressoo, J.O., J.H. Hoeijmakers, and H. de Waard, *Nucleotide excision repair and its connection with cancer and ageing.* *Adv Exp Med Biol*, 2005. **570**: p. 45-83.
27. Jalal, S., J.N. Earley, and J.J. Turchi, *DNA repair: from genome maintenance to biomarker and therapeutic target.* *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(22): p. 6973-84.
28. Lange, S.S., K. Takata, and R.D. Wood, *DNA polymerases and cancer.* *Nat Rev Cancer*, 2011. **11**(2): p. 96-110.
29. Karran, P. and M. Bignami, *DNA damage tolerance, mismatch repair and genome instability.* *Bioessays*, 1994. **16**(11): p. 833-9.
30. Umar, A., et al., *Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability.* *J Natl Cancer Inst*, 2004. **96**(4): p. 261-8.
31. di Masi, A. and A. Antocchia, *NBS1 Heterozygosity and Cancer Risk.* *Curr Genomics*, 2008. **9**(4): p. 275-81.
32. Digweed, M. and K. Sperling, *Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks.* *DNA Repair (Amst)*, 2004. **3**(8-9): p. 1207-17.
33. Giannini, G., et al., *Human MRE11 is inactivated in mismatch repair-deficient cancers.* *EMBO Rep*, 2002. **3**(3): p. 248-54.
34. Ham, M.F., et al., *Impairment of double-strand breaks repair and aberrant splicing of ATM and MRE11 in leukemia-lymphoma cell lines with microsatellite instability.* *Cancer Sci*, 2006. **97**(3): p. 226-34.
35. Heikkinen, K., et al., *Mutation screening of Mre11 complex genes: indication of RAD50 involvement in breast and ovarian cancer susceptibility.* *J Med Genet*, 2003. **40**(12): p. e131.
36. Takemura, H., et al., *Defective Mre11-dependent activation of Chk2 by ataxia telangiectasia mutated in colorectal carcinoma cells in response to replication-dependent DNA double strand breaks.* *J Biol Chem*, 2006. **281**(41): p. 30814-23.
37. Willems, P., et al., *Polymorphisms in nonhomologous end-joining genes associated with breast cancer risk and chromosomal radiosensitivity.* *Genes Chromosomes Cancer*, 2008. **47**(2): p. 137-48.
38. Lee, M.N., et al., *Epigenetic inactivation of the chromosomal stability control genes BRCA1, BRCA2, and XRCC5 in non-small cell lung cancer.* *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(3): p. 832-8.
39. Liu, Y., et al., *Polymorphisms of LIG4 and XRCC4 involved in the NHEJ pathway interact to modify risk of glioma.* *Hum Mutat*, 2008. **29**(3): p. 381-9.
40. Yan, D., et al., *Targeting DNA-PKcs and ATM with miR-101 sensitizes tumors to radiation.* *PLoS One*, 2010. **5**(7): p. e11397.
41. Berman, D.B., et al., *A common mutation in BRCA2 that predisposes to a variety of cancers is found in both Jewish Ashkenazi and non-Jewish individuals.* *Cancer Res*, 1996. **56**(15): p. 3409-14.
42. Brose, M.S., et al., *Cancer risk estimates for BRCA1 mutation carriers identified in a risk evaluation program.* *J Natl Cancer Inst*, 2002. **94**(18): p. 1365-72.
43. Esteller, M., et al., *Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors.* *J Natl Cancer Inst*, 2000. **92**(7): p. 564-9.
44. Mohindra, A., et al., *Defects in homologous recombination repair in mismatch-repair-deficient tumour cell lines.* *Hum Mol Genet*, 2002. **11**(18): p. 2189-200.

45. Kim, N.G., et al., Frameshift mutations at coding mononucleotide repeats of the hRAD50 gene in gastrointestinal carcinomas with microsatellite instability. *Cancer Res*, 2001. **61**(1): p. 36-8.
46. Evers, B., T. Helleday, and J. Jonkers, Targeting homologous recombination repair defects in cancer. *Trends Pharmacol Sci*, 2010. **31**(8): p. 372-80.
47. Marsit, C.J., et al., Inactivation of the Fanconi anemia/BRCA pathway in lung and oral cancers: implications for treatment and survival. *Oncogene*, 2004. **23**(4): p. 1000-4.
48. Rosenberg, P.S., M.H. Greene, and B.P. Alter, Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. *Blood*, 2003. **101**(3): p. 822-6.
49. Ai, L., et al., Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) gene in head and neck squamous cell carcinoma: promoter hypermethylation with clinical correlation in 100 cases. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004. **13**(1): p. 150-6.
50. Antoni, L., et al., CHK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy - two sides of the same coin? *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(12): p. 925-36.
51. Thompson, D., et al., Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*, 2005. **97**(11): p. 813-22.
52. Lewis, K.A., et al., Heterozygous ATR mutations in mismatch repair-deficient cancer cells have functional significance. *Cancer Res*, 2005. **65**(16): p. 7091-5.
53. Gorla-Gatti, L., et al., In vitro and in vivo evidence for the formation of methyl radical from procarbazine: a spin-trapping study. *Carcinogenesis*, 1992. **13**(5): p. 799-805.
54. Reid, J.M., et al., Metabolic activation of dacarbazine by human cytochromes P450: the role of CYP1A1, CYP1A2, and CYP2E1. *Clin Cancer Res*, 1999. **5**(8): p. 2192-7.
55. Ostermann, S., et al., Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(11): p. 3728-36.
56. Kaina, B., et al., MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)*, 2007. **6**(8): p. 1079-99.
57. Fu, D., J.A. Calvo, and L.D. Samson, Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(2): p. 104-20.
58. Foster, P.L. and E.F. Davis, Loss of an apurinic/apyrimidinic site endonuclease increases the mutagenicity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine to *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(9): p. 2891-5.
59. Loeb, L.A., Apurinic Sites as Mutagenic Intermediates. *Cell*, 1985. **40**(3): p. 483-484.
60. Drablos, F., et al., Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)*, 2004. **3**(11): p. 1389-407.
61. 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*, 1998. **273**(9): p. 5412-8.
62. Shrivastav, N., D. Li, and J.M. Essigmann, Chemical biology of mutagenesis and DNA repair: cellular responses to DNA alkylation. *Carcinogenesis*, 2010. **31**(1): p. 59-70.
63. Toorchen, D. and M.D. Topal, Mechanisms of chemical mutagenesis and carcinogenesis: effects on DNA replication of methylation at the O6-guanine position of dGTP. *Carcinogenesis*, 1983. **4**(12): p. 1591-7.
64. Branch, P., et al., Defective mismatch binding and a mutator phenotype in cells tolerant to DNA damage. *Nature*, 1993. **362**(6421): p. 652-4.
65. Ochs, K. and B. Kaina, Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent. *Cancer Res*, 2000. **60**(20): p. 5815-24.
66. Quiros, S., W.P. Roos, and B. Kaina, 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*, 2010. **9**(1): p. 168-78.
67. Roos, W.P., et al., Brca2/Xrcc2 dependent HR, but not NHEJ, is required for protection against O(6)-methylguanine triggered apoptosis, DSBs and chromosomal aberrations by a process leading to SCEs. *DNA Repair (Amst)*, 2009. **8**(1): p. 72-86.

68. Kaina, B., et al., 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*, 1997. **381**(2): p. 227-41.
69. Tominaga, Y., et al., Alkylation-induced apoptosis of embryonic stem cells in which the gene for DNA-repair, methyltransferase, had been disrupted by gene targeting. *Carcinogenesis*, 1997. **18**(5): p. 889-96.
70. Quereux, G. and B. Dreno, Fotemustine for the treatment of melanoma. *Expert Opin Pharmacother*, 2011. **12**(18): p. 2891-904.
71. Rutkauskiene, G. and L. Labanauskas, Treatment of patients of high-risk group of medulloblastoma with the adjuvant lomustine, cisplatin, and vincristine chemotherapy. *Medicina (Kaunas)*, 2005. **41**(12): p. 1026-34.
72. Lemoine, A., C. Lucas, and R.M. Ings, Metabolism of the chloroethylnitrosoureas. *Xenobiotica*, 1991. **21**(6): p. 775-91.
73. Bodell, W.J., DNA alkylation products formed by 1-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea as molecular dosimeters of therapeutic response. *J Neurooncol*, 2009. **91**(3): p. 257-64.
74. Ludlum, D.B., The chloroethylnitrosoureas: sensitivity and resistance to cancer chemotherapy at the molecular level. *Cancer Invest*, 1997. **15**(6): p. 588-98.
75. 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*, 1999. **59**(3): p. 689-95.
76. Matijasevic, Z., et al., Repair of sulfur mustard-induced DNA damage in mammalian cells measured by a host cell reactivation assay. *Carcinogenesis*, 2001. **22**(4): p. 661-4.
77. Preuss, I., R. Thust, and B. Kaina, Protective effect of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) on the cytotoxic and recombinogenic activity of different antineoplastic drugs. *Int J Cancer*, 1996. **65**(4): p. 506-12.
78. Ludlum, D.B., DNA alkylation by the haloethylnitrosoureas: nature of modifications produced and their enzymatic repair or removal. *Mutat Res*, 1990. **233**(1-2): p. 117-26.
79. Tong, W.P., M.C. Kirk, and D.B. Ludlum, 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*, 1982. **42**(8): p. 3102-5.
80. Lawley, P.D. and D.H. Phillips, DNA adducts from chemotherapeutic agents. *Mutat Res*, 1996. **355**(1-2): p. 13-40.
81. Li, Z., et al., Artemisinin and Its Derivatives as a Repurposing Anticancer Agent: What Else Do We Need to Do? *Molecules*, 2016. **21**(10).
82. Klayman, D.L., Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*, 1985. **228**(4703): p. 1049-55.
83. Woerdenbag, H.J., et al., Cytotoxicity of artemisinin-related endoperoxides to Ehrlich ascites tumor cells. *J Nat Prod*, 1993. **56**(6): p. 849-56.
84. Efferth, T., et al., Molecular modes of action of artesunate in tumor cell lines. *Mol Pharmacol*, 2003. **64**(2): p. 382-94.
85. Efferth, T., et al., Phytochemistry and pharmacogenomics of natural products derived from traditional Chinese medicine and Chinese materia medica with activity against tumor cells. *Mol Cancer Ther*, 2008. **7**(1): p. 152-61.
86. Berman, P.A. and P.A. Adams, Artemisinin enhances heme-catalysed oxidation of lipid membranes. *Free Radic Biol Med*, 1997. **22**(7): p. 1283-8.
87. Meshnick, S.R., et al., Iron-dependent free radical generation from the antimalarial agent artemisinin (qinghaosu). *Antimicrob Agents Chemother*, 1993. **37**(5): p. 1108-14.
88. Asawamahsakda, W., et al., Reaction of antimalarial endoperoxides with specific parasite proteins. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994. **38**(8): p. 1854-8.
89. Eckstein-Ludwig, U., et al., Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 2003. **424**(6951): p. 957-61.
90. Frohlich, T., et al., Artemisinin-Derived Dimers: Potent Antimalarial and Anticancer Agents. *J Med Chem*, 2016. **59**(16): p. 7360-88.

91. Efferth, T., et al., Enhancement of cytotoxicity of artemisinin toward cancer cells by ferrous iron. *Free Radic Biol Med*, 2004. **37**(7): p. 998-1009.
92. Kelter, G., et al., Role of transferrin receptor and the ABC transporters ABCB6 and ABCB7 for resistance and differentiation of tumor cells towards artesunate. *PLoS One*, 2007. **2**(8): p. e798.
93. Li, P.C., et al., Artesunate derived from traditional Chinese medicine induces DNA damage and repair. *Cancer Res*, 2008. **68**(11): p. 4347-51.
94. Berdelle, N., et al., Artesunate induces oxidative DNA damage, sustained DNA double-strand breaks, and the ATM/ATR damage response in cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 2011. **10**(12): p. 2224-33.
95. Halliwell, B. and O.I. Aruoma, DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*, 1991. **281**(1-2): p. 9-19.
96. Epe, B., DNA damage profiles induced by oxidizing agents. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 1996. **127**: p. 223-49.
97. Marnett, L.J., Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 2000. **21**(3): p. 361-70.
98. Huttermann, J., Solid-state radiation chemistry of DNA and its constituents. *Ultramicroscopy*, 1982. **10**(1-2): p. 25-40.
99. Tchou, J. and A.P. Grollman, Repair of DNA containing the oxidatively-damaged base, 8-oxoguanine. *Mutat Res*, 1993. **299**(3-4): p. 277-87.
100. Cheng, K.C., et al., 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G---T and A----C substitutions. *J Biol Chem*, 1992. **267**(1): p. 166-72.
101. Friedberg, E.C., Suffering in silence: the tolerance of DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**(12): p. 943-53.
102. Khanna, A., DNA damage in cancer therapeutics: a boon or a curse? *Cancer Res*, 2015. **75**(11): p. 2133-8.
103. Eker, A.P., et al., DNA repair in mammalian cells: Direct DNA damage reversal: elegant solutions for nasty problems. *Cell Mol Life Sci*, 2009. **66**(6): p. 968-80.
104. Plummer, R., Perspective on the pipeline of drugs being developed with modulation of DNA damage as a target. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(18): p. 4527-31.
105. Sedgwick, B., Repairing DNA-methylation damage. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(2): p. 148-57.
106. Sassanfar, M., et al., Relative efficiencies of the bacterial, yeast, and human DNA methyltransferases for the repair of O6-methylguanine and O4-methylthymine. Suggestive evidence for O4-methylthymine repair by eukaryotic methyltransferases. *J Biol Chem*, 1991. **266**(5): p. 2767-71.
107. Pegg, A.E., Mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Res*, 1990. **50**(19): p. 6119-29.
108. Lindahl, T., B. Demple, and P. Robins, Suicide inactivation of the *E. coli* O6-methylguanine-DNA methyltransferase. *EMBO J*, 1982. **1**(11): p. 1359-63.
109. Xu-Welliver, M. and A.E. Pegg, Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis*, 2002. **23**(5): p. 823-30.
110. Grafstrom, R.C., et al., O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in normal human tissues and cells. *Cancer Res*, 1984. **44**(7): p. 2855-7.
111. Gerson, S.L., et al., Comparison of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity based on cellular DNA content in human, rat and mouse tissues. *Carcinogenesis*, 1986. **7**(5): p. 745-9.
112. Christmann, M., et al., O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1816**(2): p. 179-90.
113. Margison, G.P., et al., Variability and regulation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis*, 2003. **24**(4): p. 625-35.
114. Citron, M., et al., O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human normal and malignant lung tissues. *Cancer Invest*, 1993. **11**(3): p. 258-63.

115. Preuss, I., et al., O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in breast and brain tumors. *Int J Cancer*, 1995. **61**(3): p. 321-6.
116. Lees, N.P., et al., Heterogeneity of O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in colorectal cancer: implications for treatment. *Oncology*, 2002. **63**(4): p. 393-7.
117. Luo, M., et al., Redox regulation of DNA repair: implications for human health and cancer therapeutic development. *Antioxid Redox Signal*, 2010. **12**(11): p. 1247-69.
118. Sancar, A., et al., Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*, 2004. **73**: p. 39-85.
119. Robertson, A.B., et al., DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci*, 2009. **66**(6): p. 981-93.
120. Wilson, D.M., 3rd and D. Barsky, The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutat Res*, 2001. **485**(4): p. 283-307.
121. Robson, C.N. and I.D. Hickson, Isolation of cDNA clones encoding a human apurinic/apyrimidinic endonuclease that corrects DNA repair and mutagenesis defects in *E. coli* xth (exonuclease III) mutants. *Nucleic Acids Res*, 1991. **19**(20): p. 5519-23.
122. O'Connor, T.R. and J. Laval, Physical association of the 2,6-diamino-4-hydroxy-5N-formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli* and an activity nicking DNA at apurinic/apyrimidinic sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(14): p. 5222-6.
123. Stucki, M., et al., Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. *Oncogene*, 1998. **17**(7): p. 835-43.
124. Zharkov, D.O., Base excision DNA repair. *Cell Mol Life Sci*, 2008. **65**(10): p. 1544-65.
125. Sivilar, D., et al., Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. *Antioxid Redox Signal*, 2011. **14**(12): p. 2491-507.
126. Vidal, A.E., et al., XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *EMBO J*, 2001. **20**(22): p. 6530-9.
127. Woodhouse, B.C., et al., Poly(ADP-ribose) polymerase-1 modulates DNA repair capacity and prevents formation of DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)*, 2008. **7**(6): p. 932-40.
128. Martin, S.A., C.J. Lord, and A. Ashworth, Therapeutic targeting of the DNA mismatch repair pathway. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(21): p. 5107-13.
129. Reed, A.M., M.L. Fishel, and M.R. Kelley, Small-molecule inhibitors of proteins involved in base excision repair potentiate the anti-tumorigenic effect of existing chemotherapeutics and irradiation. *Future Oncol*, 2009. **5**(5): p. 713-26.
130. Rowe, B.P. and P.M. Glazer, Emergence of rationally designed therapeutic strategies for breast cancer targeting DNA repair mechanisms. *Breast Cancer Res*, 2010. **12**(2): p. 203.
131. Guarne, A. and J.B. Charbonnier, Insights from a decade of biophysical studies on MutL: Roles in strand discrimination and mismatch removal. *Prog Biophys Mol Biol*, 2015. **117**(2-3): p. 149-56.
132. Kinsella, T.J., Coordination of DNA mismatch repair and base excision repair processing of chemotherapy and radiation damage for targeting resistant cancers. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(6): p. 1853-9.
133. Fleck, O. and O. Nielsen, DNA repair. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 4): p. 515-7.
134. Genschel, J., et al., Isolation of MutSbeta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutSbeta and MutSalpha. *J Biol Chem*, 1998. **273**(31): p. 19895-901.
135. Longley, M.J., A.J. Pierce, and P. Modrich, DNA polymerase delta is required for human mismatch repair in vitro. *J Biol Chem*, 1997. **272**(16): p. 10917-21.
136. Li, G.M., Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res*, 2008. **18**(1): p. 85-98.
137. Kunz, C., Y. Saito, and P. Schar, DNA Repair in mammalian cells: Mismatched repair: variations on a theme. *Cell Mol Life Sci*, 2009. **66**(6): p. 1021-38.
138. Jiricny, J., Postreplicative mismatch repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013. **5**(4): p. a012633.
139. Kaelin, W.G., Jr., Synthetic lethality: a framework for the development of wiser cancer therapeutics. *Genome Med*, 2009. **1**(10): p. 99.

140. Kamal, A., T.B. Shaik, and M.S. Malik, *Embracing synthetic lethality of novel anticancer therapies. Expert Opin Drug Discov*, 2015. **10**(10): p. 1119-32.
141. Underhill, C., M. Toulmonde, and H. Bonnefoi, *A review of PARP inhibitors: from bench to bedside. Ann Oncol*, 2011. **22**(2): p. 268-79.
142. Aparicio, T., R. Baer, and J. Gautier, *DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. DNA Repair (Amst)*, 2014. **19**: p. 169-75.
143. Helleday, T., *Homologous recombination in cancer development, treatment and development of drug resistance. Carcinogenesis*, 2010. **31**(6): p. 955-60.
144. Helleday, T., et al., *DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. DNA Repair (Amst)*, 2007. **6**(7): p. 923-35.
145. Lieber, M.R., et al., *Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(9): p. 712-20.
146. Deriano, L. and D.B. Roth, *Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage. Annu Rev Genet*, 2013. **47**: p. 433-55.
147. Lafrance-Vanasse, J., G.J. Williams, and J.A. Tainer, *Envisioning the dynamics and flexibility of Mre11-Rad50-Nbs1 complex to decipher its roles in DNA replication and repair. Prog Biophys Mol Biol*, 2015. **117**(2-3): p. 182-93.
148. Critchlow, S.E. and S.P. Jackson, *DNA end-joining: from yeast to man. Trends Biochem Sci*, 1998. **23**(10): p. 394-8.
149. Jeggo, P.A., et al., *Localization of a DNA repair gene (XRCC5) involved in double-strand-break rejoining to human chromosome 2. Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(14): p. 6423-7.
150. Reeves, W.H. and Z.M. Stoeber, *Molecular cloning of cDNA encoding the p70 (Ku) lupus autoantigen. J Biol Chem*, 1989. **264**(9): p. 5047-52.
151. Walker, J.R., R.A. Corpina, and J. Goldberg, *Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. Nature*, 2001. **412**(6847): p. 607-14.
152. Downs, J.A. and S.P. Jackson, *A means to a DNA end: the many roles of Ku. Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(5): p. 367-78.
153. Davis, A.J., B.P. Chen, and D.J. Chen, *DNA-PK: a dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway. DNA Repair (Amst)*, 2014. **17**: p. 21-9.
154. Roberts, S.A., et al., *Ku is a 5'-dRP/AP lyase that excises nucleotide damage near broken ends. Nature*, 2010. **464**(7292): p. 1214-7.
155. Christmann, M., et al., *Mechanisms of human DNA repair: an update. Toxicology*, 2003. **193**(1-2): p. 3-34.
156. Ma, Y., et al., *Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. Cell*, 2002. **108**(6): p. 781-94.
157. Waters, C.A., et al., *Nonhomologous end joining: a good solution for bad ends. DNA Repair (Amst)*, 2014. **17**: p. 39-51.
158. Zhang, M., et al., *HDAC6 deacetylates and ubiquitinates MSH2 to maintain proper levels of MutSalpha. Mol Cell*, 2014. **55**(1): p. 31-46.
159. Mladenov, E. and G. Iliakis, *Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. Mutat Res*, 2011. **711**(1-2): p. 61-72.
160. Sartori, A.A., et al., *Human CtIP promotes DNA end resection. Nature*, 2007. **450**(7169): p. 509-14.
161. Makharashvili, N., et al., *Catalytic and noncatalytic roles of the CtIP endonuclease in double-strand break end resection. Mol Cell*, 2014. **54**(6): p. 1022-33.
162. Symington, L.S., *DNA repair: Making the cut. Nature*, 2014. **514**(7520): p. 39-40.
163. Liu, J., et al., *Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. Nat Struct Mol Biol*, 2010. **17**(10): p. 1260-2.
164. Thorslund, T., et al., *The breast cancer tumor suppressor BRCA2 promotes the specific targeting of RAD51 to single-stranded DNA. Nat Struct Mol Biol*, 2010. **17**(10): p. 1263-5.
165. Li, X., et al., *PCNA is required for initiation of recombination-associated DNA synthesis by DNA polymerase delta. Mol Cell*, 2009. **36**(4): p. 704-13.

166. Sebesta, M., et al., Reconstitution of DNA repair synthesis in vitro and the role of polymerase and helicase activities. *DNA Repair (Amst)*, 2011. **10**(6): p. 567-76.
167. Heyer, W.D., K.T. Ehmsen, and J. Liu, Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet*, 2010. **44**: p. 113-39.
168. San Filippo, J., P. Sung, and H. Klein, Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem*, 2008. **77**: p. 229-57.
169. Sung, P. and H. Klein, Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(10): p. 739-50.
170. Nikolova, T., et al., Chloroethylating nitrosoureas in cancer therapy: DNA damage, repair and cell death signaling. *Biochim Biophys Acta*, 2017. **1868**(1): p. 29-39.
171. Mosedale, G., et al., The vertebrate Hef ortholog is a component of the Fanconi anemia tumor-suppressor pathway. *Nat Struct Mol Biol*, 2005. **12**(9): p. 763-71.
172. Clauson, C., O.D. Scharer, and L. Niedernhofer, Advances in understanding the complex mechanisms of DNA interstrand cross-link repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013. **5**(10): p. a012732.
173. Deans, A.J. and S.C. West, DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2011. **11**(7): p. 467-80.
174. Walden, H. and A.J. Deans, The Fanconi anemia DNA repair pathway: structural and functional insights into a complex disorder. *Annu Rev Biophys*, 2014. **43**: p. 257-78.
175. Choi, J.Y., et al., Translesion synthesis across O6-alkylguanine DNA adducts by recombinant human DNA polymerases. *J Biol Chem*, 2006. **281**(50): p. 38244-56.
176. Roos, W.P., et al., The translesion polymerase Rev3L in the tolerance of alkylating anticancer drugs. *Mol Pharmacol*, 2009. **76**(4): p. 927-34.
177. Hoeijmakers, J.H., Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 2001. **411**(6835): p. 366-74.
178. Jackson, S.P. and J. Bartek, The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 2009. **461**(7267): p. 1071-8.
179. Zannini, L., D. Delia, and G. Buscemi, CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *J Mol Cell Biol*, 2014. **6**(6): p. 442-57.
180. Sulli, G., R. Di Micco, and F. d'Adda di Fagagna, Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(10): p. 709-20.
181. Bakkenist, C.J. and M.B. Kastan, DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 2003. **421**(6922): p. 499-506.
182. Lee, J.H. and T.T. Paull, ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*, 2005. **308**(5721): p. 551-4.
183. Zou, L. and S.J. Elledge, Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*, 2003. **300**(5625): p. 1542-8.
184. Ball, H.L., J.S. Myers, and D. Cortez, ATRIP binding to replication protein A-single-stranded DNA promotes ATR-ATRIP localization but is dispensable for Chk1 phosphorylation. *Mol Biol Cell*, 2005. **16**(5): p. 2372-81.
185. Ciccio, A. and S.J. Elledge, The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*, 2010. **40**(2): p. 179-204.
186. Fink, S.L. and B.T. Cookson, Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*, 2005. **73**(4): p. 1907-16.
187. Sakahira, H., M. Enari, and S. Nagata, Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 1998. **391**(6662): p. 96-9.
188. Vanden Berghe, T., et al., Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15**(2): p. 135-47.
189. Dixon, S.J., et al., Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 2012. **149**(5): p. 1060-72.
190. Cao, J.Y. and S.J. Dixon, Mechanisms of ferroptosis. *Cell Mol Life Sci*, 2016. **73**(11-12): p. 2195-209.
191. Xie, Y., et al., Ferroptosis: process and function. *Cell Death Differ*, 2016. **23**(3): p. 369-79.

192. *Harding, H.P., Y. Zhang, and D. Ron, Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. Nature, 1999. 397(6716): p. 271-4.*
193. *Boyce, M., et al., A pharmacoproteomic approach implicates eukaryotic elongation factor 2 kinase in ER stress-induced cell death. Cell Death Differ, 2008. 15(3): p. 589-99.*
194. *De Duve, C. and R. Wattiaux, Functions of lysosomes. Annu Rev Physiol, 1966. 28: p. 435-92.*
195. *Martinet, W., et al., In situ detection of starvation-induced autophagy. J Histochem Cytochem, 2006. 54(1): p. 85-96.*
196. *Klionsky, D.J. and S.D. Emr, Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. Science, 2000. 290(5497): p. 1717-21.*
197. *Polager, S., M. Ofir, and D. Ginsberg, E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. Oncogene, 2008. 27(35): p. 4860-4.*
198. *He, C. and D.J. Klionsky, Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. Annu Rev Genet, 2009. 43: p. 67-93.*
199. *Bordin, D.L., et al., DNA alkylation damage and autophagy induction. Mutat Res, 2013. 753(2): p. 91-9.*
200. *Gewirtz, D.A., The four faces of autophagy: implications for cancer therapy. Cancer Res, 2014. 74(3): p. 647-51.*
201. *Boya, P. and G. Kroemer, Lysosomal membrane permeabilization in cell death. Oncogene, 2008. 27(50): p. 6434-51.*
202. *Codogno, P. and A.J. Meijer, Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. Cell Death Differ, 2005. 12 Suppl 2: p. 1509-18.*
203. *Lin, C.J., et al., Resveratrol enhances the therapeutic effect of temozolomide against malignant glioma in vitro and in vivo by inhibiting autophagy. Free Radic Biol Med, 2012. 52(2): p. 377-91.*
204. *Kanzawa, T., et al., Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. Cell Death Differ, 2004. 11(4): p. 448-57.*
205. *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, 2013. 8(1): p. e55665.*
206. *Yang, N.D., et al., Artesunate induces cell death in human cancer cells via enhancing lysosomal function and lysosomal degradation of ferritin. J Biol Chem, 2014. 289(48): p. 33425-41.*
207. *Hamacher-Brady, A., et al., Artesunate activates mitochondrial apoptosis in breast cancer cells via iron-catalyzed lysosomal reactive oxygen species production. J Biol Chem, 2011. 286(8): p. 6587-601.*
208. *d'Adda di Fagagna, F., Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. Nat Rev Cancer, 2008. 8(7): p. 512-22.*
209. *Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna, Cellular senescence: when bad things happen to good cells. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. 8(9): p. 729-40.*
210. *Hirose, Y., M.S. Berger, and R.O. Pieper, p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. Cancer Res, 2001. 61(5): p. 1957-63.*
211. *Hirose, Y., M.S. Berger, and R.O. Pieper, Abrogation of the Chk1-mediated G(2) checkpoint pathway potentiates temozolomide-induced toxicity in a p53-independent manner in human glioblastoma cells. Cancer Res, 2001. 61(15): p. 5843-9.*
212. *Wang, Q., et al., Polyploidy road to therapy-induced cellular senescence and escape. Int J Cancer, 2013. 132(7): p. 1505-15.*
213. *Roberson, R.S., et al., Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. Cancer Res, 2005. 65(7): p. 2795-803.*
214. *Carreras Puigvert, J., et al., Systems biology approach identifies the kinase Csnk1a1 as a regulator of the DNA damage response in embryonic stem cells. Sci Signal, 2013. 6(259): p. ra5.*
215. *Kolas, N.K., et al., Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. Science, 2007. 318(5856): p. 1637-40.*

216. Paulsen, R.D., et al., A genome-wide siRNA screen reveals diverse cellular processes and pathways that mediate genome stability. *Mol Cell*, 2009. **35**(2): p. 228-39.
217. Alekseev, S., et al., A small molecule screen identifies an inhibitor of DNA repair inducing the degradation of TFIIH and the chemosensitization of tumor cells to platinum. *Chem Biol*, 2014. **21**(3): p. 398-407.
218. Bin, Z., et al., High-content fluorescent-based assay for screening activators of DNA damage checkpoint pathways. *J Biomol Screen*, 2008. **13**(6): p. 538-43.
219. Chirnomas, D., et al., Chemosensitization to cisplatin by inhibitors of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol Cancer Ther*, 2006. **5**(4): p. 952-61.
220. Davies, K.D., et al., Chk1 inhibition and Wee1 inhibition combine synergistically to impede cellular proliferation. *Cancer Biol Ther*, 2011. **12**(9): p. 788-96.
221. FitzGerald, J., et al., A high through-put screen for small molecules modulating MCM2 phosphorylation identifies Ryuvudine as an inducer of the DNA damage response. *PLoS One*, 2014. **9**(6): p. e98891.
222. Goglia, A.G., et al., Identification of novel radiosensitizers in a high-throughput, cell-based screen for DSB repair inhibitors. *Mol Cancer Ther*, 2015. **14**(2): p. 326-42.
223. Puigvert, J.C., K. Sanjiv, and T. Helleday, Targeting DNA repair, DNA metabolism and replication stress as anti-cancer strategies. *FEBS J*, 2016. **283**(2): p. 232-45.
224. Farmer, H., et al., Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, 2005. **434**(7035): p. 917-21.
225. Hashimoto, Y., F. Puddu, and V. Costanzo, RAD51- and MRE11-dependent reassembly of uncoupled CMG helicase complex at collapsed replication forks. *Nat Struct Mol Biol*, 2011. **19**(1): p. 17-24.
226. Ajimura, M., S.H. Leem, and H. Ogawa, Identification of new genes required for meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 1993. **133**(1): p. 51-66.
227. Parry, J.M., P.J. Davies, and W.E. Evans, The effects of "cell age" upon the lethal effects of physical and chemical mutagens in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, 1976. **146**(1): p. 27-35.
228. Lavin, M.F., et al., ATM-Dependent Phosphorylation of All Three Members of the MRN Complex: From Sensor to Adaptor. *Biomolecules*, 2015. **5**(4): p. 2877-902.
229. Carney, J.P., et al., The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell*, 1998. **93**(3): p. 477-86.
230. Stewart, G.S., et al., The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell*, 1999. **99**(6): p. 577-87.
231. Waltes, R., et al., Human RAD50 deficiency in a Nijmegen breakage syndrome-like disorder. *Am J Hum Genet*, 2009. **84**(5): p. 605-16.
232. Luo, G., et al., Disruption of mRad50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sensitivity to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(13): p. 7376-81.
233. Xiao, Y. and D.T. Weaver, Conditional gene targeted deletion by Cre recombinase demonstrates the requirement for the double-strand break repair Mre11 protein in murine embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*, 1997. **25**(15): p. 2985-91.
234. Zhu, J., et al., Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol*, 2001. **11**(2): p. 105-9.
235. Williams, R.S., et al., Mre11 dimers coordinate DNA end bridging and nuclease processing in double-strand-break repair. *Cell*, 2008. **135**(1): p. 97-109.
236. de Jager, M., et al., DNA-binding and strand-annealing activities of human Mre11: implications for its roles in DNA double-strand break repair pathways. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(6): p. 1317-25.
237. Dery, U., et al., A glycine-arginine domain in control of the human MRE11 DNA repair protein. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(9): p. 3058-69.

238. Paull, T.T. and M. Gellert, The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell*, 1998. **1**(7): p. 969-79.
239. Paull, T.T. and M. Gellert, Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev*, 1999. **13**(10): p. 1276-88.
240. de Jager, M., et al., Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol Cell*, 2001. **8**(5): p. 1129-35.
241. Chapman, J.R. and S.P. Jackson, Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the MRN complex at sites of DNA damage. *EMBO Rep*, 2008. **9**(8): p. 795-801.
242. Kobayashi, J., et al., NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr Biol*, 2002. **12**(21): p. 1846-51.
243. Wang, H., et al., The interaction of CtIP and Nbs1 connects CDK and ATM to regulate HR-mediated double-strand break repair. *PLoS Genet*, 2013. **9**(2): p. e1003277.
244. Williams, R.S., et al., Nbs1 flexibly tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to coordinate DNA double-strand break processing and repair. *Cell*, 2009. **139**(1): p. 87-99.
245. Paull, T.T., Making the best of the loose ends: Mre11/Rad50 complexes and Sae2 promote DNA double-strand break resection. *DNA Repair (Amst)*, 2010. **9**(12): p. 1283-91.
246. Dupre, A., et al., A forward chemical genetic screen reveals an inhibitor of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nat Chem Biol*, 2008. **4**(2): p. 119-25.
247. Rass, E., et al., Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol*, 2009. **16**(8): p. 819-24.
248. Lim, D.S. and P. Hasty, A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(12): p. 7133-43.
249. Klein, H.L., The consequences of Rad51 overexpression for normal and tumor cells. *DNA Repair (Amst)*, 2008. **7**(5): p. 686-93.
250. Martin, R.W., et al., RAD51 up-regulation bypasses BRCA1 function and is a common feature of BRCA1-deficient breast tumors. *Cancer Res*, 2007. **67**(20): p. 9658-65.
251. Tennstedt, P., et al., RAD51 overexpression is a negative prognostic marker for colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer*, 2013. **132**(9): p. 2118-26.
252. Kiyohara, E., et al., The combination of chemotherapy with HVJ-E containing Rad51 siRNA elicited diverse anti-tumor effects and synergistically suppressed melanoma. *Gene Ther*, 2012. **19**(7): p. 734-41.
253. Huang, F., et al., Identification of specific inhibitors of human RAD51 recombinase using high-throughput screening. *ACS Chem Biol*, 2011. **6**(6): p. 628-35.
254. Huang, F., et al., Inhibition of homologous recombination in human cells by targeting RAD51 recombinase. *J Med Chem*, 2012. **55**(7): p. 3011-20.
255. Huang, F. and A.V. Mazin, A small molecule inhibitor of human RAD51 potentiates breast cancer cell killing by therapeutic agents in mouse xenografts. *PLoS One*, 2014. **9**(6): p. e100993.
256. Alagpulinsa, D.A., S. Ayyadevara, and R.J. Shmookler Reis, A Small-Molecule Inhibitor of RAD51 Reduces Homologous Recombination and Sensitizes Multiple Myeloma Cells to Doxorubicin. *Front Oncol*, 2014. **4**: p. 289.
257. Budke, B., et al., RI-1: a chemical inhibitor of RAD51 that disrupts homologous recombination in human cells. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(15): p. 7347-57.
258. Bee, L., et al., The efficiency of homologous recombination and non-homologous end joining systems in repairing double-strand breaks during cell cycle progression. *PLoS One*, 2013. **8**(7): p. e69061.
259. Quiros, S., W.P. Roos, and B. Kaina, Rad51 and BRCA2--New molecular targets for sensitizing glioma cells to alkylating anticancer drugs. *PLoS One*, 2011. **6**(11): p. e27183.
260. Westphal, M., et al., Karyotype analyses of 20 human glioma cell lines. *Acta Neurochir (Wien)*, 1994. **126**(1): p. 17-26.

261. Barrantes-Freer, A., et al., *CD133 Expression Is Not Synonymous to Immunoreactivity for AC133 and Fluctuates throughout the Cell Cycle in Glioma Stem-Like Cells. PLoS One*, 2015. **10**(6): p. e0130519.
262. Pierce, A.J., et al., *XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. Genes Dev*, 1999. **13**(20): p. 2633-8.
263. Richardson, C., M.E. Moynahan, and M. Jasin, *Double-strand break repair by interchromosomal recombination: suppression of chromosomal translocations. Genes Dev*, 1998. **12**(24): p. 3831-42.
264. Nicoletti, I., et al., *A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J Immunol Methods*, 1991. **139**(2): p. 271-9.
265. Krishan, A., *Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. J Cell Biol*, 1975. **66**(1): p. 188-93.
266. Parplys, A.C., et al., *DNA damage by X-rays and their impact on replication processes. Radiother Oncol*, 2012. **102**(3): p. 466-71.
267. Nikolova, T., et al., *DNA Fiber Spreading Assay to Test HDACi Effects on DNA and Its Replication. Methods Mol Biol*, 2017. **1510**: p. 103-113.
268. Andree, H.A., et al., *Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. J Biol Chem*, 1990. **265**(9): p. 4923-8.
269. Martin, S.J., et al., *Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. J Exp Med*, 1995. **182**(5): p. 1545-56.
270. Vermes, I., et al., *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J Immunol Methods*, 1995. **184**(1): p. 39-51.
271. Ostling, O. and K.J. Johanson, *Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun*, 1984. **123**(1): p. 291-8.
272. Switzeny, O.J., et al., *MGMT promoter methylation determined by HRM in comparison to MSP and pyrosequencing for predicting high-grade glioma response. Clin Epigenetics*, 2016. **8**: p. 49.
273. Christmann, M., et al., *MGMT activity, promoter methylation and immunohistochemistry of pretreatment and recurrent malignant gliomas: a comparative study on astrocytoma and glioblastoma. Int J Cancer*, 2010. **127**(9): p. 2106-18.
274. Roos, W.P., et al., *Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. Oncogene*, 2007. **26**(2): p. 186-97.
275. Ashton, M., et al., *Artemisinin kinetics and dynamics during oral and rectal treatment of uncomplicated malaria. Clin Pharmacol Ther*, 1998. **63**(4): p. 482-93.
276. Das, A.K., *Anticancer Effect of AntiMalarial Artemisinin Compounds. Ann Med Health Sci Res*, 2015. **5**(2): p. 93-102.
277. Crespo-Ortiz, M.P. and M.Q. Wei, *Antitumor activity of artemisinin and its derivatives: from a well-known antimalarial agent to a potential anticancer drug. J Biomed Biotechnol*, 2012. **2012**: p. 247597.
278. Lu, Y.Y., et al., *Dihydroartemisinin (DHA) induces caspase-3-dependent apoptosis in human lung adenocarcinoma ASTC-a-1 cells. J Biomed Sci*, 2009. **16**: p. 16.
279. Shiraishi, S., et al., *Influence of p53 mutations on prognosis of patients with glioblastoma. Cancer*, 2002. **95**(2): p. 249-57.
280. Weller, M., et al., *Predicting chemoresistance in human malignant glioma cells: the role of molecular genetic analyses. Int J Cancer*, 1998. **79**(6): p. 640-4.
281. Roos, W.P. and B. Kaina, *DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. Cancer Lett*, 2013. **332**(2): p. 237-48.
282. Friedman, H.S., T. Kerby, and H. Calvert, *Temozolomide and treatment of malignant glioma. Clin Cancer Res*, 2000. **6**(7): p. 2585-97.

283. Saunders, D., et al., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral artesunate monotherapy in patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in western Cambodia. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012. **56**(11): p. 5484-93.
284. Efferth, T., et al., The antiviral activities of artemisinin and artesunate. *Clin Infect Dis*, 2008. **47**(6): p. 804-11.
285. Caporali, S., et al., DNA damage induced by temozolomide signals to both ATM and ATR: role of the mismatch repair system. *Mol Pharmacol*, 2004. **66**(3): p. 478-91.
286. Mojas, N., M. Lopes, and J. Jiricny, Mismatch repair-dependent processing of methylation damage gives rise to persistent single-stranded gaps in newly replicated DNA. *Genes Dev*, 2007. **21**(24): p. 3342-55.
287. Zhang, H., et al., Mismatch repair is required for O(6)-methylguanine-induced homologous recombination in human fibroblasts. *Carcinogenesis*, 2000. **21**(9): p. 1639-46.
288. Wang, B., et al., Artesunate sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin by downregulating RAD51. *Cancer Biol Ther*, 2015. **16**(10): p. 1548-56.
289. Chen, K., et al., Artesunate induces G2/M cell cycle arrest through autophagy induction in breast cancer cells. *Anticancer Drugs*, 2014. **25**(6): p. 652-62.
290. Mizushima, N., T. Yoshimori, and B. Levine, Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, 2010. **140**(3): p. 313-26.
291. Strozzyk, E. and D. Kulms, The role of AKT/mTOR pathway in stress response to UV-irradiation: implication in skin carcinogenesis by regulation of apoptosis, autophagy and senescence. *Int J Mol Sci*, 2013. **14**(8): p. 15260-85.
292. Solomon, D.A., et al., Identification of p18 INK4c as a tumor suppressor gene in glioblastoma multiforme. *Cancer Res*, 2008. **68**(8): p. 2564-9.
293. Cheng, C., et al., Anti-malarial drug artesunate attenuates experimental allergic asthma via inhibition of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *PLoS One*, 2011. **6**(6): p. e20932.
294. Thanaketpaisarn, O., et al., Artesunate enhances TRAIL-induced apoptosis in human cervical carcinoma cells through inhibition of the NF-kappaB and PI3K/Akt signaling pathways. *Int J Oncol*, 2011. **39**(1): p. 279-85.
295. Di Micco, R., M. Fumagalli, and F. d'Adda di Fagagna, Breaking news: high-speed race ends in arrest--how oncogenes induce senescence. *Trends Cell Biol*, 2007. **17**(11): p. 529-36.
296. Chen, Z., et al., Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*, 2005. **436**(7051): p. 725-30.
297. Banasavadi-Siddegowda, Y.K., et al., PRMT5-PTEN molecular pathway regulates senescence and self-renewal of primary glioblastoma neurosphere cells. *Oncogene*, 2017. **36**(2): p. 263-274.
298. Lee, J.J., et al., PTEN status switches cell fate between premature senescence and apoptosis in glioma exposed to ionizing radiation. *Cell Death Differ*, 2011. **18**(4): p. 666-77.
299. Eling, N., et al., Identification of artesunate as a specific activator of ferroptosis in pancreatic cancer cells. *Oncoscience*, 2015. **2**(5): p. 517-32.
300. Tsai, Y.C. and A.M. Weissman, The Unfolded Protein Response, Degradation from Endoplasmic Reticulum and Cancer. *Genes Cancer*, 2010. **1**(7): p. 764-778.
301. Rutkowski, D.T. and R.J. Kaufman, That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. *Trends Biochem Sci*, 2007. **32**(10): p. 469-76.
302. Wang, M. and R.J. Kaufman, The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat Rev Cancer*, 2014. **14**(9): p. 581-97.
303. Lee, H.K., et al., GRP78 is overexpressed in glioblastomas and regulates glioma cell growth and apoptosis. *Neuro Oncol*, 2008. **10**(3): p. 236-43.
304. Pyrko, P., et al., The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. *Cancer Res*, 2007. **67**(20): p. 9809-16.
305. Zhang, L.H., et al., Association of elevated GRP78 expression with increased astrocytoma malignancy via Akt and ERK pathways. *Brain Res*, 2011. **1371**: p. 23-31.
306. Walter, P. and D. Ron, The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 2011. **334**(6059): p. 1081-6.

307. Hetz, C., *The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. **13**(2): p. 89-102.
308. Healy, S.J., et al., *Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy*. *Eur J Pharmacol*, 2009. **625**(1-3): p. 234-46.
309. Han, J., et al., *ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death*. *Nat Cell Biol*, 2013. **15**(5): p. 481-90.
310. Oommen, D. and K.M. Prise, *Down-regulation of PERK enhances resistance to ionizing radiation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. **441**(1): p. 31-5.
311. Quick, Q.A. and M.O. Faison, *CHOP and caspase 3 induction underlie glioblastoma cell death in response to endoplasmic reticulum stress*. *Exp Ther Med*, 2012. **3**(3): p. 487-492.
312. Tabas, I. and D. Ron, *Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress*. *Nat Cell Biol*, 2011. **13**(3): p. 184-90.
313. Wang, Q., et al., *ERAD inhibitors integrate ER stress with an epigenetic mechanism to activate BH3-only protein NOXA in cancer cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(7): p. 2200-5.
314. Oyadomari, S. and M. Mori, *Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress*. *Cell Death Differ*, 2004. **11**(4): p. 381-9.
315. Rzymiski, T., et al., *Regulation of autophagy by ATF4 in response to severe hypoxia*. *Oncogene*, 2010. **29**(31): p. 4424-35.
316. Lin, C.J., et al., *Inhibition of mitochondria- and endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy augments temozolomide-induced apoptosis in glioma cells*. *PLoS One*, 2012. **7**(6): p. e38706.
317. Weatherbee, J.L., J.L. Kraus, and A.H. Ross, *ER stress in temozolomide-treated glioblastomas interferes with DNA repair and induces apoptosis*. *Oncotarget*, 2016. **7**(28): p. 43820-43834.
318. Bonifacino, J.S. and A.M. Weissman, *Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1998. **14**: p. 19-57.
319. Travers, K.J., et al., *Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation*. *Cell*, 2000. **101**(3): p. 249-58.
320. Yamamori, T., et al., *ER stress suppresses DNA double-strand break repair and sensitizes tumor cells to ionizing radiation by stimulating proteasomal degradation of Rad51*. *FEBS Lett*, 2013. **587**(20): p. 3348-53.
321. Reungpatthanaphong, P. and S. Mankhetkorn, *Modulation of multidrug resistance by artemisinin, artesunate and dihydroartemisinin in K562/adr and GLC4/adr resistant cell lines*. *Biol Pharm Bull*, 2002. **25**(12): p. 1555-61.
322. Singh, N.P. and H.C. Lai, *Synergistic cytotoxicity of artemisinin and sodium butyrate on human cancer cells*. *Anticancer Res*, 2005. **25**(6B): p. 4325-31.
323. Wang, S.J., et al., *Dihydroartemisinin inactivates NF-kappaB and potentiates the anti-tumor effect of gemcitabine on pancreatic cancer both in vitro and in vivo*. *Cancer Lett*, 2010. **293**(1): p. 99-108.
324. Hou, J., et al., *Experimental therapy of hepatoma with artemisinin and its derivatives: in vitro and in vivo activity, chemosensitization, and mechanisms of action*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(17): p. 5519-30.
325. Chen, T., et al., *Dihydroartemisinin induces apoptosis and sensitizes human ovarian cancer cells to carboplatin therapy*. *J Cell Mol Med*, 2009. **13**(7): p. 1358-70.
326. Efferth, T., et al., *Artesunate induces ROS-mediated apoptosis in doxorubicin-resistant T leukemia cells*. *PLoS One*, 2007. **2**(8): p. e693.
327. Zhou, H.J., et al., *Dihydroartemisinin improves the efficiency of chemotherapeutics in lung carcinomas in vivo and inhibits murine Lewis lung carcinoma cell line growth in vitro*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2010. **66**(1): p. 21-9.
328. Michaelis, M., et al., *Anti-cancer effects of artesunate in a panel of chemoresistant neuroblastoma cell lines*. *Biochem Pharmacol*, 2010. **79**(2): p. 130-6.

329. Handrick, R., et al., Dihydroartemisinin induces apoptosis by a Bak-dependent intrinsic pathway. *Mol Cancer Ther*, 2010. **9**(9): p. 2497-510.
330. Chen, T., M. Chen, and J. Chen, Ionizing radiation potentiates dihydroartemisinin-induced apoptosis of A549 cells via a caspase-8-dependent pathway. *PLoS One*, 2013. **8**(3): p. e59827.
331. Kim, S.J., et al., Dihydroartemisinin enhances radiosensitivity of human glioma cells in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2006. **132**(2): p. 129-35.
332. Karunajeewa, H.A., et al., A trial of combination antimalarial therapies in children from Papua New Guinea. *N Engl J Med*, 2008. **359**(24): p. 2545-57.
333. Kobbe, R., et al., A randomized trial on effectiveness of artemether-lumefantrine versus artesunate plus amodiaquine for unsupervised treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Ghanaian children. *Malar J*, 2008. **7**: p. 261.
334. Koram, K., L. Quaye, and B. Abuaku, Efficacy of amodiaquine/artesunate combination therapy for uncomplicated malaria in children under five years in Ghana. *Ghana Med J*, 2008. **42**(2): p. 55-60.
335. Stupp, R., et al., Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(16): p. 2712-8.
336. Sorensen, C.S., et al., The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat Cell Biol*, 2005. **7**(2): p. 195-201.
337. Schild, D. and C. Wiese, Overexpression of RAD51 suppresses recombination defects: a possible mechanism to reverse genomic instability. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(4): p. 1061-70.
338. Tichy, E.D., et al., The abundance of Rad51 protein in mouse embryonic stem cells is regulated at multiple levels. *Stem Cell Res*, 2012. **9**(2): p. 124-34.
339. Simandlova, J., et al., FBH1 helicase disrupts RAD51 filaments in vitro and modulates homologous recombination in mammalian cells. *J Biol Chem*, 2013. **288**(47): p. 34168-80.
340. Wei, N., et al., Oxidative stress diverts tRNA synthetase to nucleus for protection against DNA damage. *Mol Cell*, 2014. **56**(2): p. 323-32.
341. Huang, J.W., et al., Systematic screen identifies miRNAs that target RAD51 and RAD51D to enhance chemosensitivity. *Mol Cancer Res*, 2013. **11**(12): p. 1564-73.
342. Vare, D., et al., DNA interstrand crosslinks induce a potent replication block followed by formation and repair of double strand breaks in intact mammalian cells. *DNA Repair (Amst)*, 2012. **11**(12): p. 976-85.
343. Muniandy, P.A., et al., DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells: step by step. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2010. **45**(1): p. 23-49.
344. Sengerova, B., A.T. Wang, and P.J. McHugh, Orchestrating the nucleases involved in DNA interstrand cross-link (ICL) repair. *Cell Cycle*, 2011. **10**(23): p. 3999-4008.
345. Brozovic, A., et al., Cisplatin sensitivity is related to late DNA damage processing and checkpoint control rather than to the early DNA damage response. *Mutat Res*, 2009. **670**(1-2): p. 32-41.
346. Nikolova, T., et al., Chloroethylnitrosourea-induced cell death and genotoxicity: cell cycle dependence and the role of DNA double-strand breaks, HR and NHEJ. *Cell Cycle*, 2012. **11**(14): p. 2606-19.
347. Thompson, L.H., Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: the molecular choreography. *Mutat Res*, 2012. **751**(2): p. 158-246.
348. Iliakis, G., et al., Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res*, 2004. **104**(1-4): p. 14-20.
349. Connell, P.P., et al., Pilot study examining tumor expression of RAD51 and clinical outcomes in human head cancers. *Int J Oncol*, 2006. **28**(5): p. 1113-9.
350. Maacke, H., et al., DNA repair and recombination factor Rad51 is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene*, 2000. **19**(23): p. 2791-5.
351. Maacke, H., et al., Over-expression of wild-type Rad51 correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer. *Int J Cancer*, 2000. **88**(6): p. 907-13.

352. Qiao, G.B., et al., High-level expression of Rad51 is an independent prognostic marker of survival in non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer*, 2005. **93**(1): p. 137-43.
353. Bobola, M.S., et al., Role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in resistance of human brain tumor cell lines to the clinically relevant methylating agents temozolomide and streptozotocin. *Clin Cancer Res*, 1996. **2**(4): p. 735-41.
354. Kaina, B., et al., 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*, 1991. **12**(10): p. 1857-67.
355. Preuss, I., et al., Activity of the DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human tumor and corresponding normal tissue. *Cancer Detect Prev*, 1996. **20**(2): p. 130-6.
356. Federico, M.B., et al., Chromosomal Integrity after UV Irradiation Requires FANCD2-Mediated Repair of Double Strand Breaks. *PLoS Genet*, 2016. **12**(1): p. e1005792.
357. Tercero, J.A. and J.F. Diffley, Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature*, 2001. **412**(6846): p. 553-7.
358. Murphy, A.K., et al., Phosphorylated RPA recruits PALB2 to stalled DNA replication forks to facilitate fork recovery. *J Cell Biol*, 2014. **206**(4): p. 493-507.
359. Chen, R. and M.S. Wold, Replication protein A: single-stranded DNA's first responder: dynamic DNA-interactions allow replication protein A to direct single-strand DNA intermediates into different pathways for synthesis or repair. *Bioessays*, 2014. **36**(12): p. 1156-61.
360. Kondo, N., et al., FANCD1/BRCA2 plays predominant role in the repair of DNA damage induced by ACNU or TMZ. *PLoS One*, 2011. **6**(5): p. e19659.
361. Feldmann, E., et al., DNA double-strand break repair in cell-free extracts from Ku80-deficient cells: implications for Ku serving as an alignment factor in non-homologous DNA end joining. *Nucleic Acids Res*, 2000. **28**(13): p. 2585-96.
362. Guirouilh-Barbat, J., et al., Defects in XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(52): p. 20902-7.
363. Grabarz, A., et al., Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining. *Am J Cancer Res*, 2012. **2**(3): p. 249-68.
364. Hopfner, K.P., et al., Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase. *Cell*, 2001. **105**(4): p. 473-85.
365. Czornak, K., S. Chughtai, and K.H. Chrzanowska, Mystery of DNA repair: the role of the MRN complex and ATM kinase in DNA damage repair. *J Appl Genet*, 2008. **49**(4): p. 383-96.

6. ANHANG

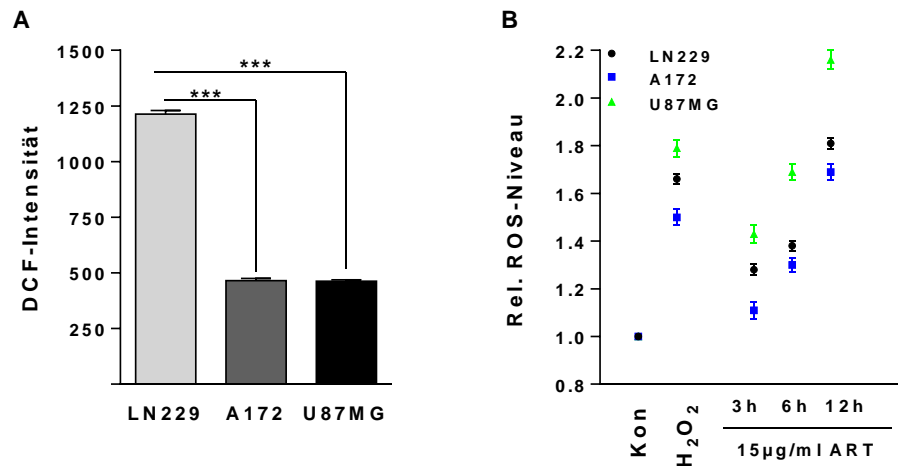


Abb. 54 Bestimmung der ROS-Level in den Glioblastomzelllinien LN229, A172 und U87MG-Zellen. Die ROS-Bildung wurde druchflusszytometrisch mittels 2',7'-Dichloridihydrofluorescein-diacetat (H₂DCFDA)-Färbung analysiert. Als ROS-Indikator wird das nicht-fluoreszierende H₂DCFDA in das stark-fluoreszierende 2',7'-Dichlorfluorescein (DCF) oxidiert. Dargestellt sind jeweils die mittleren Intensitäten +/- SD des DCF aus drei unabhängigen Experimenten. **(A)** Die basalen ROS-Level der unbehandelten LN229-, A172- und U87MG-Zellen. **(B)** Die auf die unbehandelte Kontrolle normalisieren ROS-Level nach Behandlung mit ART zu den angegebenen Zeitpunkten. H₂O₂ diente als Positiv-Kontrolle. Die Signifikanz wurden mittels einfaktorieller ANOVA und dem Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest nach Šidák berechnet: *** $p \leq 0,001$. Die Daten wurden durch [REDACTED] generiert.

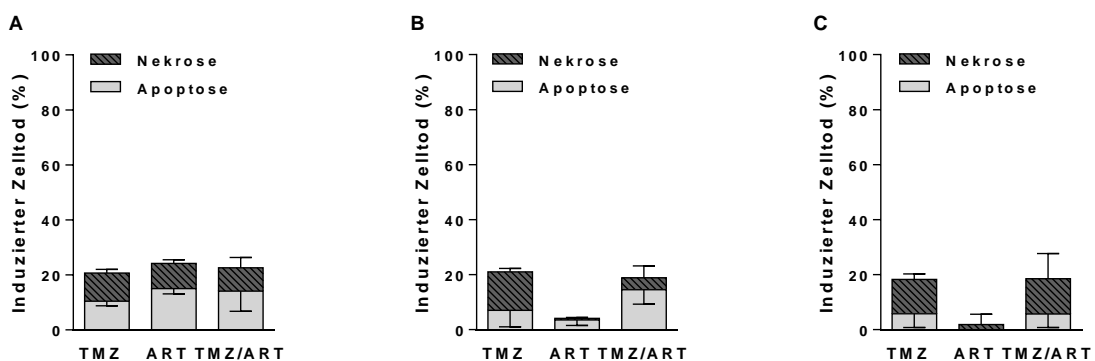


Abb. 55 Zelltodbestimmung nach kombinierter TMZ- und ART-Behandlung der Glioblastomzelllinien LN229, A172 und U87MG mittels Annexin V/ PI-Doppelfärbung. Dargestellt ist der induzierte Zelltod, respektive die Summe aus induzierter Apoptose (grauer Teil der Balken) und induzierter Nekrose (gestreifter Teil der Balken), nach Behandlung mit 50 μ M TMZ, 15 μ g/ml ART oder der Kombination aus beidem. Die Analyse wurde 144 h nach der TMZ-Behandlung durchgeführt. Die ART-Behandlung folgte 24 h nach TMZ-Gabe. Abgebildet sind die entsprechenden Mittelwerte +/- SD aus drei unabhängigen Experimenten mit LN229- **(A)**, A172- **(B)** und U87MG-Zellen **(C)**.

Tab. 5 Statistische Auswertung der Zellzyklusanalysen.

	Zellzyklus-Phase	Behandlung	p-Wert
LN229 (96 h)	G1	Kon vs. ART	ns
		TMZ vs. TMZ/ART	ns
	S	Kon vs. ART	**** $p \leq 0,0001$
		TMZ vs. TMZ/ART	* $p \leq 0,05$
	G2	Kon vs. ART	** $p \leq 0,01$
		TMZ vs. TMZ/ART	* $p \leq 0,05$
LN229 (120 h)	G1	Kon vs. ART	* $p \leq 0,05$
		TMZ vs. TMZ/ART	ns
	S	Kon vs. ART	**** $p \leq 0,0001$
		TMZ vs. TMZ/ART	**** $p \leq 0,0001$
	G2	Kon vs. ART	ns
		TMZ vs. TMZ/ART	**** $p \leq 0,0001$
LN229 (144 h)	G1	Kon vs. ART	ns
		TMZ vs. TMZ/ART	** $p \leq 0,01$
	S	Kon vs. ART	* $p \leq 0,05$
		TMZ vs. TMZ/ART	**** $p \leq 0,0001$
	G2	Kon vs. ART	ns
		TMZ vs. TMZ/ART	**** $p \leq 0,0001$
A172 (96 h)	G1	Kon vs. ART	ns
		TMZ vs. TMZ/ART	* $p \leq 0,05$
	S	Kon vs. ART	ns
		TMZ vs. TMZ/ART	ns
	G2	Kon vs. ART	ns
		TMZ vs. TMZ/ART	ns
A172 (120 h)	G1	Kon vs. ART	ns
		TMZ vs. TMZ/ART	ns
	S	Kon vs. ART	ns
		TMZ vs. TMZ/ART	ns
	G2	Kon vs. ART	ns
		TMZ vs. TMZ/ART	ns
A172 (144 h)	G1	Kon vs. ART	ns
		TMZ vs. TMZ/ART	ns
	S	Kon vs. ART	ns
		TMZ vs. TMZ/ART	ns
	G2	Kon vs. ART	ns
		TMZ vs. TMZ/ART	ns
U87MG (96 h)	G1	Kon vs. ART	ns
		TMZ vs. TMZ/ART	ns
	S	Kon vs. ART	** $p \leq 0,01$
		TMZ vs. TMZ/ART	ns
	G2	Kon vs. ART	ns
		TMZ vs. TMZ/ART	ns
U87MG (120 h)	G1	Kon vs. ART	ns
		TMZ vs. TMZ/ART	ns
	S	Kon vs. ART	** $p \leq 0,01$
		TMZ vs. TMZ/ART	ns
	G2	Kon vs. ART	ns
		TMZ vs. TMZ/ART	ns
U87MG (144 h)	G1	Kon vs. ART	ns
		TMZ vs. TMZ/ART	ns
	S	Kon vs. ART	ns
		TMZ vs. TMZ/ART	ns
	G2	Kon vs. ART	ns
		TMZ vs. TMZ/ART	ns

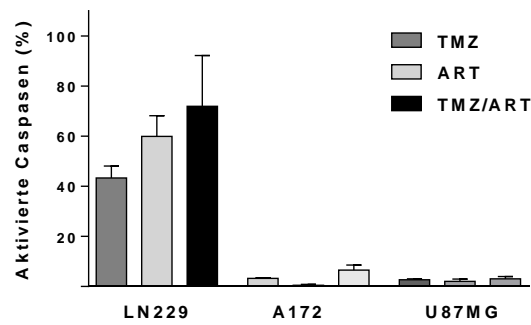


Abb. 56 Einfluss der TMZ/ART-Behandlung auf die Caspase-Aktivierung in Glioblastomzellen. Aktivierte Caspasen wurden mittels eines Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten *in situ* Markers gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Caspase-aktiven Populationen 144 h nach Behandlung mit TMZ (50 μ M) und/oder ART (15 μ g/ml; t=72 h). Angegeben sind die Mittelwerte +/- SD aus drei unabhängigen Experimenten.

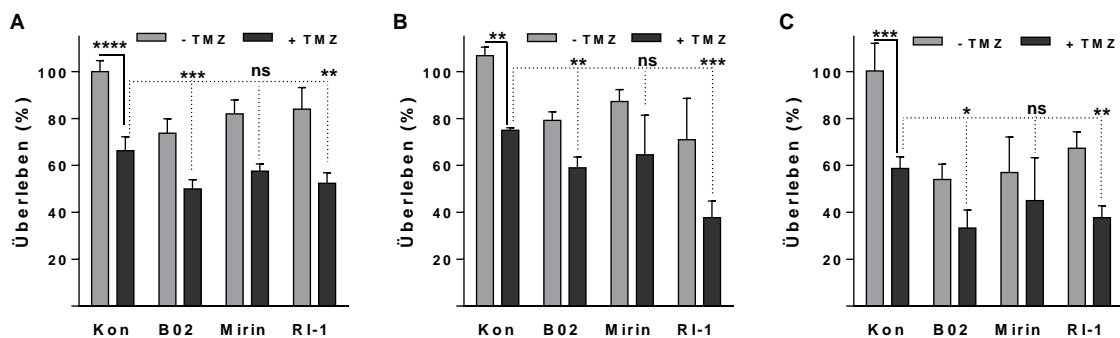


Abb. 57 Einfluss von TMZ und HR-Inhibition auf die Überlebensraten von Glioblastomzellen. Dargestellt sind die mittels Koloniebildungstest ermittelten Überlebensraten nach Behandlung mit TMZ (10 μ M) und/ oder HR-Inhibitoren (B02: 2,5 μ M, Mirin: 12,5 μ M, RI-1: 5 μ M). Das Überleben wurde auf die unbehandelte Kontrolle (Kon) normalisiert und ist in (A) für LN229-, in (B) für LN308- und in (C) für U87MG-Zellen quantifiziert. Angegeben sind die Mittelwerte +/- SD aus drei unabhängigen Experimenten, Signifikanzanalyse mittels einfaktoriel-ler ANOVA und dem Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest nach Šidák: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$, ns=nicht signifikant

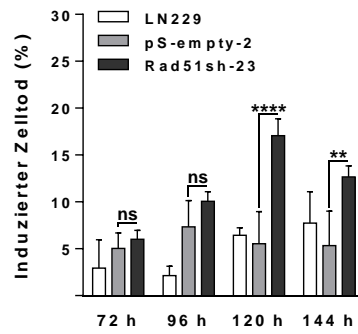


Abb. 58 Kinetik des CCNU-induzierten Zelltods im Rad51-Knockdown-Zellsystem. Mittels Annexin V/PI-Färbung wurde der CCNU-induzierte Zelltod zeitabhängig (72 h, 96 h, 120 h und 144 h) in parentalen LN229-Zellen (weiß), Transfektions-Kontrollzellen (pS-empty-2, grau) und stabilen Rad51-Knockdown-Zellen (Rad51sh-23, schwarz) bestimmt. Alle Zellen wurden mit 15 μ M CCNU (1 h) behandelt, dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte +/- SD aus drei unabhängigen Experimenten, Signifikanzanalyse mittels einfaktorieller ANOVA und dem Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest nach Šidák: ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$, ns=nicht signifikant.

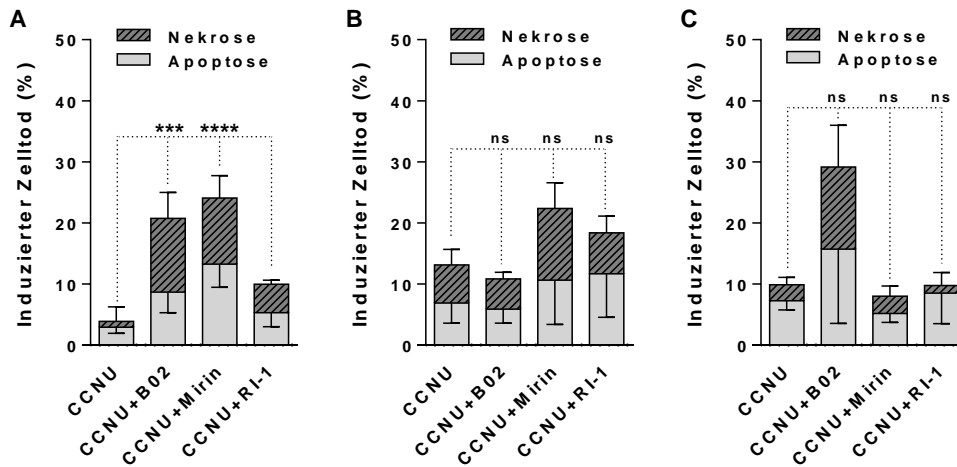


Abb. 59 Einfluss der HR-Inhibition auf den CCNU-induzierten Zelltod in Patienten-Zelllinien. Mittels Annexin V/PI-Färbung wurden Apoptose- (hellgrau) und Nekrosefrequenz (schraffiert) durchflusszytometrisch 120 h nach der Behandlung mit CCNU (15 μ M, 1 h) und/ oder HR-Inhibitoren (MZ 160-Zellen: B02: 5 μ M, Mirin: 25 μ M, RI-1: 20 μ M; MZ 219-Zellen: B02: 2,5 μ M, Mirin: 25 μ M, RI-1: 25 μ M; MZ 227-Zellen: B02: 2,5 μ M, Mirin: 20 μ M, RI-1: 25 μ M;) bestimmt. Dargestellt ist der induzierte Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose) in MZ 160-Zellen (A), MZ 219-Zellen (B) und MZ 227-Zellen (C). Angegeben sind die Mittelwerte +/- SD aus drei unabhängigen Experimenten, Signifikanzanalyse mittels einfaktorieller ANOVA und dem Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest nach Šidák: *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$, ns=nicht signifikant.

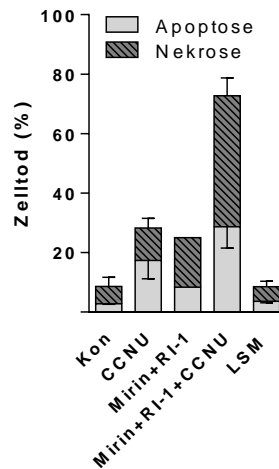


Abb. 60 Einfluss der RAD51- und MRN-Inhibition auf den CCNU-induzierten Zelltod in LN229-Zellen. Mittels Annexin V/ PI-Färbung wurden Apoptose- (hellgrau) und Nekrosefrequenz (schraffiert) durchflusszytometrisch 72 h nach der Behandlung mit CCNU (15 μ M, 1 h) und/ oder HR-Inhibitoren B02: 10 μ M, RI-1: 20 μ M) bestimmt. Dargestellt ist der Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose), angegeben sind die Mittelwerte +/- SD aus zwei unabhängigen Experimenten. LSM=Lösungsmittelkontrolle.

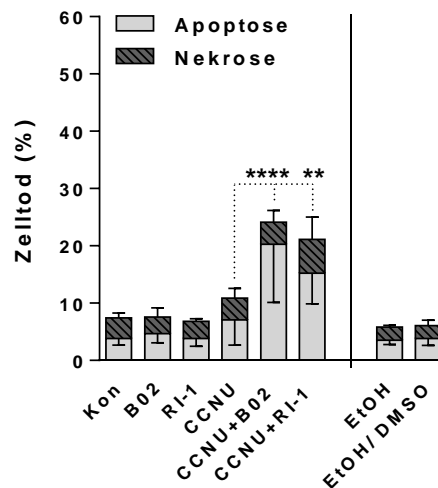


Abb. 61 Einfluss der Rad51-Inhibition auf den CCNU-induzierten Zelltod in Mausfibroblasten. Mittels Annexin V/ PI-Färbung wurden Apoptose- (hellgrau) und Nekrosefrequenz (schraffiert) durchflusszytometrisch 72 h nach der Behandlung mit CCNU (30 μ M, 1 h) und/ oder Rad51-Inhibitoren (B02: 10 μ M, RI-1: 20 μ M) bestimmt. Dargestellt ist der Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose) in NIH/3T3-Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte +/- SD aus drei unabhängigen Experimenten, Signifikanzanalyse mittels einfaktorier ANOVA und dem Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest nach Šidák: ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$. Kon=Kontrolle, EtOH und EtOH/ DMSO=Lösungsmittelkontrollen.

PUBLIKATIONEN

Christmann M., Diesler K., Majhen D., Steigerwald C., Berte N., Freund H., Stojanovic N., Kaina B., Osmak M., Ambriovic-Ristov A. and Tomicic M. T. **(2017)**, Integrin alphaVbeta3 silencing sensitizing malignant glioma cells to temozolomide by suppression of homologous recombination repair. *Oncotarget 8: 27754-27771.*

Berte N., Lokan S., Eich M., Kim E. and Kaina B. **(2016)**, Artesunate enhances the therapeutic response of glioma cells to temozolomide by inhibition of homologous recombination and senescence. *Oncotarget 7: 67235-67250.*

Berte N., Piee-Staffa A., Piecha N., Wang M., Borgmann K., Kaina B. and Nikolova T. **(2016)**, Targeting Homologous Recombination by Pharmacological Inhibitors Enhances the Killing Response of Glioblastoma Cells Treated with Alkylating Drugs. *Mol. Cancer Ther 15: 2665-2678.*

Tomicic M. T., Meise R., Aasland D., Berte N., Kitzinger R., Kraemer O. H., Kaina B. and Christmann M., **(2015)**, Apoptosis induced by temozolomide and nimustin in glioblastoma cells is supported by JNK/ c-Jun-mediated induction of the BH3-only protein BIM. *Oncotarget 6: 33755-33768*

KONFERENZTEILNAHMEN

- 03/2017 8th World Congress and Expo on Cell & Stem Cell Research
Orlando, FL, USA
Young Researchers Award, Vortragspreis
Reisestipendium der GSK
- 11/2016 6th Personalized Medicine Convention
Köln, Deutschland
Posterpräsentation
- 09/2016 14th Biennial Meeting of the DGDR (*Deutsche Gesellschaft der DNA-Reparaturforschung*)
Essen, Deutschland
Posterpräsentation
- 07/2015 3. GUM-Workshop (*Gesellschaft für Umwelt & Mutationsforschung*)
Potsdam, Deutschland
Vortrag
- 06/2015 1st Tomas Lindahl Conference on DNA Repair
Oslo, Norwegen
Posterpräsentation
Reisestipendium der DGDR
- 03/2015 54th Annual Meeting of the SOT
San Diego, CA, USA
Posterpräsentation*¹
- 02/2015 81th Annual Meeting der DGPT
Kiel, Germany
Posterpräsentation*
- 10/2014 9th International Conference of Anticancer Research
Porto Carras, Sithonia, Griechenland
Posterpräsentationen
- 09/2014 15th Annual Meeting of the GBS (*Gesellschaft für Biol. Strahlenforschung e. V.*)
Tübingen, Deutschland
- 30th Ernst Klenk Symposium in Molecular Medicine
Köln, Deutschland
- 13th Biennial Meeting of the DGDR
Mainz, Deutschland
Posterpräsentationen

¹ *Generierung der Daten und des Posters, Präsentation durch Dritte

- 05/2014 12th CIMT Annual Meeting
Mainz, Deutschland
Posterpräsentation
- 09/2012 12th Biennial Meeting of the DGDR/ 13th Annual Meeting of the GBS
München, Deutschland
Posterpräsentation

DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich bei [REDACTED] für sein entgegengebrachtes Vertrauen bedanken, mir die Bearbeitung der hier dargelegten Projekte- und vieler weiterer- zu überlassen. Vielen Dank für die Unabhängigkeit und Freiheit, die ich bei der Planung und Durchführung der Arbeiten genießen durfte. Danke auch für die stete Ansprechbarkeit, Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen Möglichkeiten, auch vor internationalem Publikum meine Arbeiten präsentieren zu dürfen. Du hast großen Anteil an meiner wissenschaftlichen Entwicklung!

[REDACTED] danke ich für die Bereitschaft als weiterer Gutachter dieser Arbeit zu fungieren.

Großer Dank gilt [REDACTED] und der lieben [REDACTED]. Herzlichen Dank für die schnelle und kompetente Einarbeitung in ein neues Themengebiet, interessante Methoden sowie viele kleine und große Überraschungen im Laboralltag. Ich hatte richtig Spaß mit euch! Vielen lieben Dank!

Herzlichen Dank auch an meine liebste wissenschaftliche Familie. Danke für einfach alles, [REDACTED]!

Für viele konstruktive, wichtige und auch unwichtige Diskussionen sowie das Versüßen des Laboralltags danke ich [REDACTED] (*Lank lewe die WWW-dag*), [REDACTED] (*mein Freund Gorbi!*), [REDACTED] (*alles!*) und [REDACTED] (*lange Sortnächte, Helene und deine „Pufferaktivität“!*). Ich danke euch von Herzen!

Dem lieben [REDACTED] gebührt mein Dank für unzählige in der Vergangenheit liegende und künftige Momente aller Art. Ohne dich, wäre einiges nur halb so leicht, halb so lustig und prägend gewesen!

Unvergessen und getragen von großer Emotionalität bleibt die Zeit mit meinen unfassbar tollen und unbeschreibbaren Freunden des *Rattenlochs 400*. Ihr alle macht sie legendär -in jeglicher Hinsicht! Unermesslichen Dank an – in geloster Reihenfolge – [REDACTED]
[REDACTED]. Danke für alles – mir fehlen tatsächlich die Worte – und die Adventskalender! Ihr seid großartig und einfach die Allerallerallerallerallerallerallerbesche!

ERKLÄRUNG

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von April 2012 bis September 2016 am Institut für Toxikologie an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter der Betreuung von [REDACTED] durchgeführt.

Teilaspekte dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht und sind dem Kapitel PUBLIKATIONEN zu entnehmen.

Ich versichere, die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Referenzen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Mainz, im August 2017

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name Nancy Berte

Adresse

Mobil

E-Mail

Geburtsdatum/ -ort 15. März 1985, Frankenthal/Pfalz

Familienstand

Berufliche Erfahrung & Studium

