



**Wirkungsweise von Artesunat
in Kombination mit Temozolomid und
Bestrahlung in Glioblastomzellen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
“Doktor der Naturwissenschaften”
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Stefanie Lokan
geboren in Duisburg

Mainz, 2016

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2016

Für Rémy

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	x
Abbildungsverzeichnis	xvi
1 Einleitung	1
1.1 Glioblastom	2
1.2 Temozolomid	4
1.3 Artesunat	9
1.4 Bestrahlung	17
1.5 Zellzyklus und Zellschicksale	18
1.5.1 Zelltod	22
1.5.2 Autophagie	28
1.5.3 Seneszenz	33
1.6 Zielsetzung	36
2 Material	38
2.1 Zelllinien	38
2.2 Medien und Zellkulturkomponenten	38

2.3	Versuchstiere	39
2.4	Versuchstier-Material	39
2.5	DNA-Oligonukleotide	39
2.6	Primärantikörper	41
2.7	Sekundärantikörper	41
2.8	Chemikalien	42
2.9	Inhibitoren und Aktivatoren	43
2.10	Biologische und chemische Substanzen	44
2.11	Kits und Assays	45
2.12	Puffer und Lösungen	46
2.13	Software	49
2.14	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	50
2.15	Geräte	50
3	Methoden	53
3.1	Zellkultur	53
3.1.1	Kultivierung der Zellen	53
3.1.2	Behandlung der Zellen	54
3.1.3	Verdopplungszeit und Aussaatzahlen	55
3.1.4	Koloniebildungsassay	56
3.2	Durchflusszytometrische Analysen	56
3.2.1	PI-Färbung und Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie	56
3.2.2	Annexin V/PI-Doppelfärbung und Analyse mittels Durchflusszytometrie	57

3.2.3	ROS-Messung	59
3.2.4	MDC-Messung	59
3.2.5	CytoID-Messung	59
3.2.6	MagicRed-Messungen	60
3.2.7	C ₁₂ -FDG-Messung	60
3.3	Proteinexpression	61
3.3.1	Herstellung von Proteinextrakten	61
3.3.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten	63
3.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	64
3.3.4	Proteintransfer	64
3.3.5	Antikörperbindung	65
3.3.6	Antikörperdetektion	65
3.4	Immunfluoreszenz-Färbungen zur mikroskopischen Auswertung	66
3.4.1	Fixierte Zellen	66
3.4.2	Lebende Zellen	68
3.5	Genexpression	69
3.5.1	RNA-Isolierung	69
3.5.2	cDNA-Synthese	69
3.5.3	Semiquantitative PCR	69
3.6	In vivo-Analysen	70
3.6.1	Subkutanes Tumormausmodell	70
3.6.2	Intrakranielles Tumormausmodell	71
3.6.3	Histologie	76

4	Ergebnisse	78
4.1	In vitro-Modelle	79
4.2	In vitro Experimente	80
4.2.1	Temozolomid und Artesunat	80
4.2.2	Bestrahlung und Artesunat	145
4.3	In vivo-Experimente	155
4.3.1	Subkutaner Tumormodell der Maus	155
4.3.2	Intrakranieller Tumormodell der Maus	162
5	Diskussion	176
5.1	Überblick über den Stand der Forschung	176
5.2	Einflussnahme von Artesunat auf die klassische Chemotherapie mit Temozolomid und Bestrahlung	177
5.3	Wirkungsmechanismen von Artesunat alleine und in den Kombinations-therapien mit Temozolomid und Bestrahlung	179
5.3.1	Beteiligung des Nekrosoms auf den Wirkungsmechanismus von ART	181
5.3.2	Auswirkungen der induzierten DNA-Schäden durch die Behandlung von ART und TMZ auf die Toxizität der Kombinationsbehandlung	182
5.3.3	Einfluss von ART und TMZ auf die Induktion und Eflux der Autophagie der Glioblastomzelllinien	182
5.3.4	Einfluss von ART und TMZ auf den Zellzyklus der Glioblastomzelllinien	186

5.3.5	Einfluss von ART und TMZ auf die Induktion der Seneszenz der Glioblastomzelllinien	188
5.4	Resümee der Resultate	190
6	Zusammenfassung	193
7	Anhang	196
7.1	Untersuchung der Proteinexpression zur Zellzyklusanalyse der Zelllinie LN-229 nach Behandlung mit ART	196
7.2	Untersuchung zur Induktion von ER-Stress innerhalb des neuen Behandlungsschemas	197
	Abkürzungsverzeichnis	201
	Literaturverzeichnis	206
	Publikationen und Konferenzen	I

Tabellenverzeichnis

2.1	Primersequenzen von Invitrogen Life Science.	40
4.1	Charakteristika der Glioblastomzelllinien.	79
4.2	Überlebenszeit.	166

Abbildungsverzeichnis

1.1	Strukturformeln von TMZ und MTIC	5
1.2	Schema der MMR	7
1.3	Schema der TMZ-Toxizität	8
1.4	Strukturformel von Artesunat	10
1.5	Bindungsöffnung des Trioxan Pharmakophor von Artesunat	12
1.6	Darstellung der Fenton-Reaktion	13
1.7	Schematische Darstellung der Toxizität von Artesunat	14
1.8	Schematische Darstellung der BER	15
1.9	Schematische Darstellung des Zellzyklus	19
1.10	Übersicht über die verschiedenen Zellschicksale	21
1.11	Schema der extrinsischen Apoptose	24
1.12	Schema der intrinsischen Apoptose	26
1.13	Schematische Darstellung der Nekrose	29
1.14	Schematische Darstellung der Autophagie	31
1.15	Schematische Darstellung der Seneszenz	34
3.1	Sterile Barriere-Box	72

3.2	Stereotaktisches Gerät	75
4.1	Zytotoxische Wirkung der TMZ-Behandlung auf Glioblastomzellen . . .	82
4.2	Zytotoxische Wirkung der ART-Behandlung auf Glioblastomzellen . . .	83
4.3	Zelltodanalysen der Zelllinien nach ART-Behandlung	84
4.4	Morphologie der Zelllinie LN-229 nach verschiedenen Behandlungen . .	86
4.5	Morphologie der Zelllinie A172 nach verschiedenen Behandlungen . . .	87
4.6	Morphologie der Zelllinie U87 MG nach verschiedenen Behandlungen . .	88
4.7	ART-Behandlung in Abhängigkeit von ROS-Bildung und Nekrosomaktivität	90
4.8	Expression ausgewählter Gene nach TMZ- und ART-Behandlung . . .	92
4.9	Morphologie der Zelllinie LN-229 nach ART- und TMZ-Behandlung . .	93
4.10	Apoptose- und Zellzyklusanalysen der Zelllinie LN-229 nach ART- und TMZ-Behandlung	95
4.11	Behandlungsschema zur zeitversetzten Behandlung von ART und TMZ	97
4.12	DNA-Schäden (gemessen als γ H2AX-Foci) der Zelllinie LN-229 nach ART- und TMZ-Behandlung	98
4.13	Anpassung der Kombinationsbehandlung von ART und TMZ	99
4.14	Zytotoxische Wirkung der Kombinationsbehandlung von TMZ und ART auf Glioblastomzellen	101
4.15	Analyse der Zellzahlabhängigkeit der Einzelbehandlungen von TMZ und ART	102
4.16	Anpassung des Behandlungsschemas und der Zellzahl bei der Zelllinie LN-229	103

4.17 Neues Behandlungsschema entsprechend ART-Zugabe 72 Stunden nach TMZ-Behandlung	104
4.18 DNA-Schäden der Zelllinien nach neuem Behandlungsschema	106
4.19 Quantitative Auswertung der DNA-Schäden nach neuem Behandlungsschema	107
4.20 Zelltodanalyse der Zelllinien nach neuem Behandlungsschema	108
4.21 Westernblots der Zelllinien für Kaspase 1 und PARP	109
4.22 Zelltodanalyse der Zelllinien in Abhängigkeit des Apoptose- und Nekrose-Signalwegs	111
4.23 Morphologie der Zelllinie LN-229 nach ART- und TMZ-Behandlung . .	113
4.24 Zytotoxische Untersuchung zur Kombination von ART und Autophagie-Inhibitoren	114
4.25 Untersuchung zur Autophagie-Induktion durch ART-Zugabe	115
4.26 Untersuchung zum Autophagie-Prozess (LC3BII) innerhalb des neuen Behandlungsschemas	117
4.27 Untersuchung zum Autophagie-Prozess (p62) innerhalb des neuen Behandlungsschemas	118
4.28 Untersuchung zum Autophagie-Prozess und zur Proteasom-Aktivität innerhalb des neuen Behandlungsschemas	120
4.29 Untersuchung zum Autophagie-Prozess (MDC und CytoID) innerhalb des neuen Behandlungsschemas	122
4.30 Untersuchung zum Autophagie-Prozess und Zelltod mittels früher Inhibition innerhalb des neuen Behandlungsschemas	125

4.31	Untersuchung zum Autophagie-Prozess und Zelltod mittels Inhibition des Apoptose- und Nekrose-Signalwegs innerhalb des neuen Behandlungsschemas	126
4.32	Apoptose- und Zellzyklusanalysen der Zelllinie LN-229 nach dem neuen Behandlungsschema	128
4.33	Apoptose- und Zellzyklusanalysen der Zelllinie A172 nach dem neuen Behandlungsschema	130
4.34	Apoptose- und Zellzyklusanalysen der Zelllinie U87 MG nach dem neuen Behandlungsschema	131
4.35	Apoptose- und Zellzyklusanalysen der Zelllinie U87 MG nach dem neuen Behandlungsschema	132
4.36	Untersuchung zum Autophagie-Verlauf bei der Zelllinie LN-229 innerhalb des neuen Behandlungsschemas	134
4.37	Untersuchung zum Autophagie-Verlauf bei der Zelllinie A172 innerhalb des neuen Behandlungsschemas	135
4.38	Untersuchung zum Autophagie-Verlauf bei der Zelllinie U87 MG innerhalb des neuen Behandlungsschemas	136
4.39	Untersuchung der Lysosomen und Autophagosomen der Zelllinie LN-229 innerhalb des neuen Behandlungsschemas	139
4.40	Lebenduntersuchung der Lysosomen und Mitochondrien der Zelllinie LN-229 innerhalb des neuen Behandlungsschemas	140
4.41	Analyse von Zelltod und Autophagie der Zelllinien in Abhängigkeit der Autophagie-Induktion	142
4.42	Untersuchung zum Seneszenz-Verlauf (C_{12} FDG) innerhalb des neuen Behandlungsschemas	144

4.43 Zytotoxische Wirkung der Kombinationsbehandlung von IR und ART auf Glioblastomzellen	147
4.44 Gegenüberstellung des Gesamtzelltods verschiedener Behandlungsschemata bei der Zelllinie LN-229	148
4.45 Morphologie der Zelllinie LN-229 nach ART-Behandlung und Bestrahlung	149
4.46 Apoptose- und Zellzyklusanalysen der Zelllinie LN-229 nach simultanem Behandlungsschema	151
4.47 Apoptose- und Zellzyklusanalysen der Zelllinie LN-229 nach dem neuen Behandlungsschema	152
4.48 Untersuchung zum Autophagie-Prozess (LC3BII) innerhalb des neuen Behandlungsschemas von ART und IR	154
4.49 Behandlungsschema der <i>subkutanen in vivo</i> -Mausmodelle	157
4.50 Auswertung des <i>subkutanen in vivo</i> -Versuch mit der Zelllinie U87 MG .	158
4.51 Gewichtskontrolle für den <i>subkutanen in vivo</i> -Versuch mit der Zelllinie U87 MG	159
4.52 Histologische Auswertung des <i>subkutanen in vivo</i> -Versuchs mit der Zelllinie U87 MG	160
4.53 Histologische Beobachtung in dem <i>subkutanen in vivo</i> -Versuch mit der Zelllinie U87 MG	161
4.54 Behandlungsschema des <i>intrakraniellen in vivo</i> -Mausmodells	164
4.55 Auswertung des <i>interkraniellen in vivo</i> -Versuchs mit der Zelllinie LN-229	165
4.56 Histologische Auswertung des <i>intrakraniellen in vivo</i> -Versuchs mit der Zelllinie LN-229	168
4.57 Gegenüberstellung der histologischen Schnitte und der MRT-Bilder einer Kontrolle	170

4.58	Gegenüberstellung der histologischen Schnitte und der MRT-Bilder einer mit ART behandelten Maus	171
4.59	Gegenüberstellung der histologischen Schnitte und der MRT-Bilder einer mit TMZ behandelten Maus	172
4.60	Gegenüberstellung der histologischen Schnitte und der MRT-Bilder einer Maus aus der Kombinationsgruppe	173
5.1	Hypothesen zu den Wirkungsmechanismen in der Kombinationsbehandlung	180
5.2	Hypothesen und Ergebnisse zu den Analysen der Wirkungsmechanismen in der Kombinationsbehandlung	189
7.1	Zellzyklusanalysen der Zelllinie LN-229 nach ART-Behandlung	197
7.2	Untersuchung zum ER-Stress innerhalb des neuen Behandlungsschemas mittels Proteinexpression	199
7.3	Untersuchung zum ER-Stress mittels Genexpression von CHOP bei der Zelllinie LN-229	200

Kapitel 1

Einleitung

Die experimentelle Krebsforschung begann mit dem 20. Jahrhundert und ist noch heute eine der größten Herausforderungen für Biologen und Mediziner. In Deutschland ist Krebs die zweithäufigste Todesursache bei Männern und Frauen [Becker (2012)]. Unter dem Begriff Krebs verbergen sich maligne (bösartige) Tumore, Raumforderungen durch Gewebeneubildung (Neoplasie), die im gesamten menschlichen Körper vorkommen können. Heute sind über 100 verschiedene Krebserkrankungen bekannt, die sich in Behandlungsmöglichkeiten und Überlebensrate teilweise stark unterscheiden. Eine von diesen Erkrankungen stellen die Hirntumore dar, die sich wiederum in über 100 verschiedene Arten von Tumoren unterteilen lassen. Die Behandlung von Glioblastomen, die am häufigsten auftretende hirneigene Tumorart, stellt das Hauptthema dieser Arbeit dar.

In diesem Kapitel werden die relevanten Inhalte dieser Arbeit beschrieben. Zu Beginn des Kapitels wird eine Übersicht über Glioblastome gegeben und die klassischen Behandlungsmethoden diskutiert. Daran anschließend wird eine innovative Medikation mit Artesunat diskutiert. Abschließend wird die Strahlenbehandlung zusammengefasst und eine Übersicht über die Folgen der Behandlungen für die Tumorzellen gegeben.

1.1 Glioblastom

Hirntumore werden nach ihrem Ursprung eingeteilt und benannt. Die meisten Tumore bilden sich aus dem Stützgewebe des Gehirns, bestehend aus verschiedenen Stützzellen, den sogenannten Gliazellen. Aus diesen entwickeln sich Astrozytome, Oligodendrogliome und Ependymome. Bösartigkeit und Wachstumsverhalten von Hirntumoren lassen sich durch die sogenannten Malignitätsgrade beschreiben. Die Einteilung der Hirntumore erfolgt anhand der WHO-Klassifikation (Weltgesundheitsorganisation) in die Grade I bis IV mit ansteigender Bösartigkeit. Glioblastome gehören in die WHO-Klassifikation Grad IV (WHO-IV). Sie sind die aggressivste Form der Astrozytome und die häufigste Form von Hirntumoren bei Erwachsenen [Furnari u. a. (2007)] mit einer Inzidenz von 3-5 von 100000 Menschen pro Jahr [Preusser u. a. (2011)].

Diese Menschen zeigen abhängig von der Lage des Tumors meist sehr unspezifische Symptome¹, sodass die Diagnose Hirntumor oft erst sehr spät gestellt werden kann. Zu diesen Symptomen gehören Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Bewusstseinsstörungen, die durch den erhöhten Druck ausgelöst werden, den der Tumor mit seinem Volumen auf das Gehirn ausübt. Zudem kann es zu epileptischen Anfällen und neurologischen Ausfallerscheinungen wie halbseitiger Lähmung, Sehstörung, Gleichgewichtsproblemen, Gefühlsstörungen und psychischen Veränderungen kommen.

Zu den diagnostischen Verfahren gehört die Magnetresonanztomografie (MRT). Sie ist eine der bildgebenden Untersuchungsverfahren in der Tumorthherapie [Adamson u. a. (2009)]. Hiermit können Hirntumore lokalisiert und ihr Ausmaß bestimmt werden. Mit Hilfe eines starken Magnetfelds erzeugt der Kernspintomograf Schnittbilder in jeder Ebene des Kopfes. Unterstützend werden Kontrastmittel eingesetzt, die den Tumor deutlich vom umliegenden Gewebe abheben. Mittels des Computers werden 3D-Bilder des Schädels rekonstruiert. Und im Gegensatz zum konventionellen Röntgen oder der Computertomografie setzt die Untersuchung den Patienten dabei keiner Strahlenbel-

¹http://www.cumc.columbia.edu/research/animal/Brain_Cancer.html

stung aus. Dieses ist ein wichtiges Kriterium, da die Bestrahlung, neben zunehmendem Lebensalter und genetischen Anlagen, als Ursache bzw. Risikofaktor für die Entstehung eines Hirntumors diskutiert wird. Besonders beim Glioblastom scheint das hohe Lebensalter ein entscheidender Risikofaktor zu sein. Das Durchschnittsalter eines Patienten mit einem primären Glioblastom beträgt 62 Jahre [Ohgaki u. a. (2004)].

Mit der Lokalisation und dem Volumen des Tumors kann die Art des Therapieansatzes festgelegt werden. Auch das Alter und die körperliche Verfassung wird bei der Therapie berücksichtigt. Da das Verhalten der Glioblastome durch hohe Invasivität gekennzeichnet ist, reicht eine Operation als Behandlung allein nicht [Cheng u. a. (2011)]. Die einzige lebensverlängernde Behandlung, die sich bisher als wirksam erwies, besteht aus der Kombination von Bestrahlung mit Chemotherapie. Dennoch bleibt die Prognose schlecht mit einer mittleren Überlebenszeit von 14,6 Monaten und einer 2-Jahres-Überlebensrate von 26,5% [Stupp u. a. (2005, 2009)].

Die klassische Behandlung eines Glioblastoms beinhaltet die Operation, die Bestrahlung des Tumors (Strahlentherapie) und die Chemotherapie. Die Bestrahlung erfolgt in den meisten Fällen von außen mit einer Dosierung von 60 Gy in 30 Etappen [Omuro u. a. (2013)]. Strahlungsquellen, sogenannte Radionuklide, die direkt in den Tumorbereich im Gehirn eingebracht werden, sind in einigen Fällen auch möglich. Als Nebenwirkung kann es dabei zu neurologischen Ausfallerscheinungen beim Patienten kommen.

Der Begriff Chemotherapie bezieht sich auf jede Art von medikamentöser Behandlung, bei der die Zellteilung verhindert oder der Zelltod induziert wird. Auch hierbei können neurologische Probleme auftreten, da spezielle Medikamente, sogenannte Zytostatika, zum Einsatz kommen. Diese können nur selten lokal angewendet werden und wirken sich besonders auf schnell teilende Zellen im gesamten Körper aus. Die Chemotherapie wird auch bei weniger aggressiven Hirntumoren häufig in Kombination mit einer Operation oder der Strahlentherapie eingesetzt, um ein Rezidiv zu verhindern (adjuvant). Darüber hinaus wird die Chemotherapie eingesetzt, um nach erfolgten Operationen verbliebenes Tumorgewebe einzuschränken (additiv) oder einen Tumor zu verkleinern,

um so eine Operation überhaupt erst möglich zu machen (neo-adjuvant).

Bei Hirntumoren der Klassifizierung WHO-IV hat die Therapie im Normalfall nicht die Heilung der Krebserkrankung zum Ziel (kurative Therapie). Da eine Heilung meist nicht möglich ist, dient die Behandlung dazu, den Krankheitsverlauf zu bremsen und/oder die Beschwerden des Patienten zu lindern. In diesem Fall spricht man von palliativer Therapie. Zudem zeigen Hirntumore der Klassifizierung WHO-IV oft Resistenzen gegenüber der Strahlen- und Chemotherapie [Altieri u. a. (2014)], was die Behandlung zusätzlich erschwert.

1.2 Temozolomid

Temozolomid (Temodal®, TMZ), das Medikament erster Wahl in der Chemotherapie maligner Gliome [Villano u. a. (2009)], wurde erstmals 1984 synthetisiert [Newlands u. a. (1997)] und Anfang 1999 für die Behandlung von Patienten mit Hirntumor lizenziert. Die besondere Eignung zur Behandlung maligner Gliome beruht auf der geringen Molekülgröße und dem lipophilen Charakter von TMZ, wodurch 20-30% des Blutplasmaspiegels die intakte Blut-Hirn-Schranke passieren [Stupp und Newlands (2001); Ostermann u. a. (2004)].

Dieses Imidazotetrazin-Derivat des Agenz Dacarbazin ist säurestabil und oral zu applizieren. Nach Applikation wird das Prodrug bei einem physiologischen pH-Wert spontan hydrolysiert. Durch die hydrolytische Ringöffnung entsteht das aktive Monomethyl-Triazeno-Imidazol-Carboxamid (MTIC) [Moody und Wheelhouse (2014)]. Bei einem pH-Wert von 7,4 hat TMZ eine Halbwertszeit von 1,24 Stunden [Ramirez u. a. (2013)]. Die Strukturformel von TMZ und die hydrolytische Ringöffnung zur Entstehung des aktiven MTIC sind in Abb. 1.1 gezeigt.

Methylierende Agenzien wie TMZ induzieren verschiedene Methylierungs-Schäden an der DNA [Beranek (1990)]. Eines der toxischsten Methylierungs-Produkte ist das O6-Methylguanin (O6MeG) [Kaina u. a. (1991); Preuss u. a. (1996)]. Unrepariertes O6-

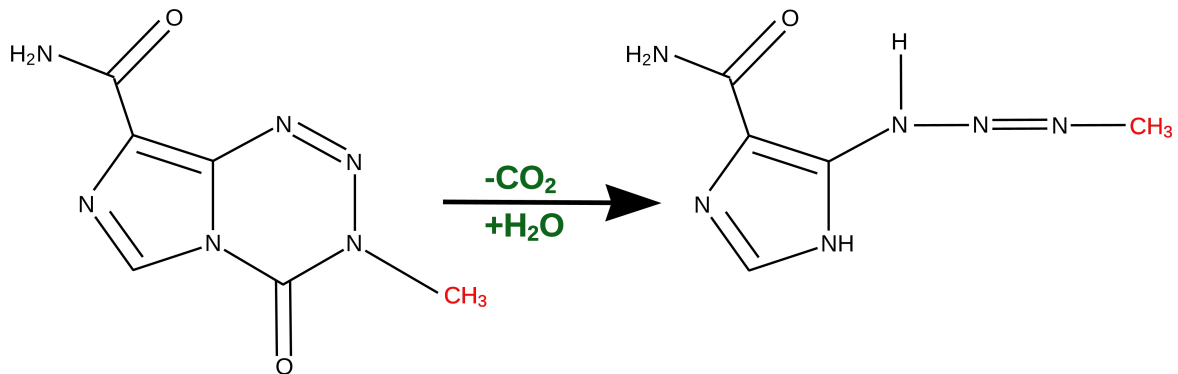


Abbildung 1.1: Strukturformel von TMZ und MTIC. Dargestellt ist die hydrolytische Ringöffnung von Temozolomid. Somit entsteht das aktive Monomethyl-Triazeno-Imidazol-Carboxamid.

Methylguanin ist mutagen, da die Fehlpaarung mit Thymidin zu G:C A:T-Transitionmutationen infolge der Replikation führt [Toorchen und Topal (1983); Eadie u. a. (1984); Saffhill u. a. (1985)]. Die O6MeG:T Fehlpaarungen werden von der Basenfehlpaarungs-Reparatur (Mismatch-Repair, MMR) erkannt. Somit stellt die MMR einen sehr wichtigen Schutzmechanismus der Zelle dar, indem sie die Mutationsfrequenz reduziert und somit die genomische Stabilität erhält [Umar u. a. (1994)]. Dieses Reparatursystem ist aber für die Toxizität von TMZ essenziell und führt schließlich zur Induktion von Doppelstrangbrüchen (DSBs) und zum Zelltod [Karran und Bignami (1994); Kaina u. a. (1997); Ochs und Kaina (2000); Roos u. a. (2007); Quiros u. a. (2010)]. Die Reparatur von N-alkylierten Purinen (N7MeG, N3MeA und N3MeG durch die TMZ-Applikation) kann durch die Basen-Exzisions-Reparatur (Base-Excision-Repair, BER) behoben werden [Curtin (2012)]. Dieser Reparaturweg wird im folgenden Abschnitt 1.3 in Zusammenhang mit Artesunat beschrieben.

Geht die O6MeG-Läsion mit in den nächsten DNA-Replikationszyklus ein, kommt es zur Fehlpaarung mit Thymin [Toorchen und Topal (1983); Eadie u. a. (1984)]. Diese Läsion wird von den Reparaturproteinen der MMR erfasst und prozessiert. Eine schematische Darstellung der Prozesse ist in Abb. 1.2 gezeigt. Beginnend mit dem MutS α -

Komplex, bestehend aus den Proteinen MSH2 (MutS homolog 2) und MSH6 (MutS homolog 6), wird die Läsion erfasst [Duckett u. a. (1996)]. Die Konformation des Komplexes wird ATP-abhängig verändert, sodass dieser an der DNA bindet und auf dieser weitergleiten kann [Gradia u. a. (1999)]. Ebenfalls ATP-abhängig bindet anschließend der MutL α -Komplex, der aus den beiden MutL-homologen Proteinen MLH1 (MutL homolog 1) und PMS2 (Postmeiotic segregation increased 2) aufgebaut ist [Li und Modrich (1995)], an den MutS α -Komplex. Diese beiden Komplexe rekrutieren weitere Polypeptide, Exonukleasen, Polymerase(n) und andere Replikationsfaktoren für die DNA-Strang-Diskriminierung und abschließend die Basen-Exzision und Neusynthese der DNA [Christmann u. a. (2003)]. Durch das Gleiten des Reparaturkomplexes entlang der DNA wird der DNA-Tochterstrang mit falsch eingebauten Basen erkannt. Anschließend werden von der Exonuklease I bis zu 100 Basen des Tochterstrangs einschließlich der falsch eingebauten Base entfernt [Stojic u. a. (2004)]. Zum Schutz des parental Strangs binden an diesen RPA-Proteine und stabilisieren ihn. Die Neusynthese des Tochterstrangs erfolgt durch die Polymerase δ [Longley u. a. (1997)]. Abschließend wird die Lücke durch eine DNA-Ligase wieder geschlossen.

Nach dem Reparaturzyklus ist die Läsion O6MeG noch in der DNA vorhanden und Thymin wird während der Resynthese der Doppelstrang-DNA wieder eingesetzt. Da dies weiterhin ein Substrat für die MMR ist, kommt es wiederholend zum vergeblichen Entfernen und Wiedereinsetzen von Thymin (sogenannten ‘vergeblichen Reparaturzyklen’). Diese ‘vergeblichen Reparaturzyklen’ führen zur Bildung von langen Strecken einzelsträngiger DNA [Mojas u. a. (2007)]. Während der DNA-Synthesen und den vergeblichen MMR-Prozessen kommt es zur Bildung von DSB [Ochs und Kaina (2000); Quiros u. a. (2010)] und schließlich zur Induktion des Zelltods [Roos u. a. (2007)]. Abbildung 1.3 zeigt schematisch die verschiedenen Wege der TMZ-Toxizität.

Neben dem gewünschten Zelltod löst die Applikation von TMZ auch Resistenzen gegenüber der Chemotherapie aus. Der am besten dokumentierte Resistenzmechanismus gegenüber TMZ ist das DNA-Reparaturprotein O6-Methylguanin-DNA-Methyl-

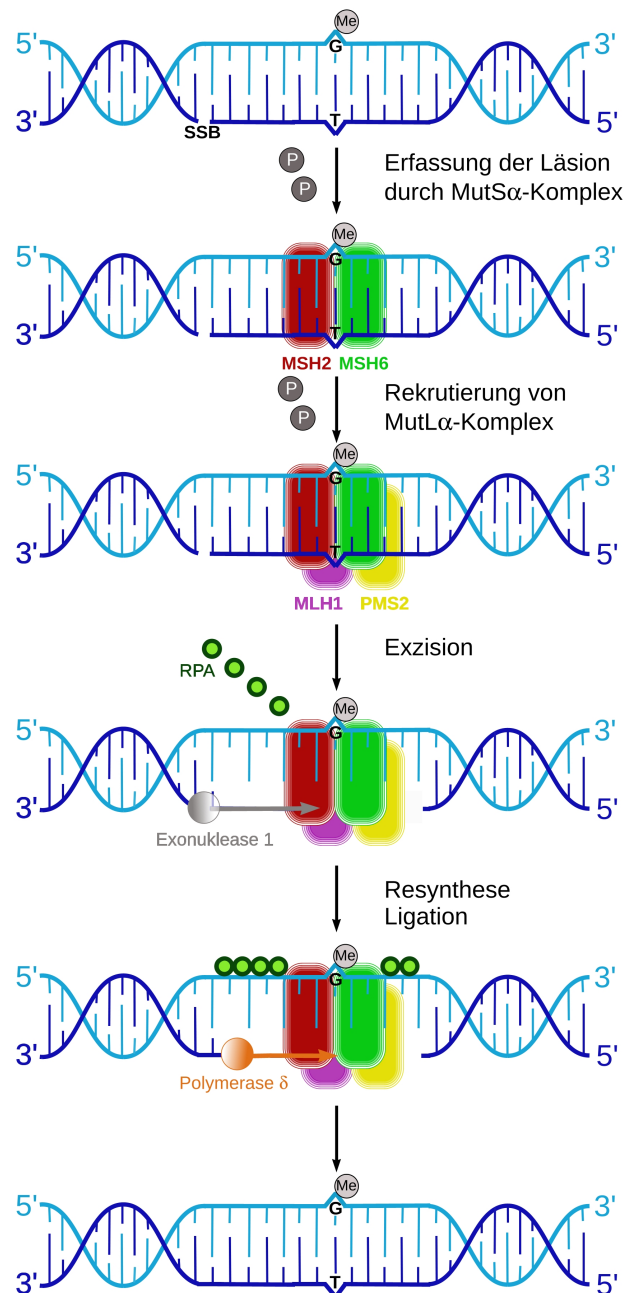


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der MMR nach Behandlung von TMZ. Das TMZ induziert O⁶MeG, das mit der folgenden Replikation zur Fehlpaarung mit Thymin führt. Der MutS α -Komplex erfasst die Läsion und der MutL α -Komplex wird zur Läsion rekrutiert. Es folgt die Basen-Exzision und die Resynthese des Strangs, abschließend wird die Lücke durch die DNA-Ligase geschlossen.

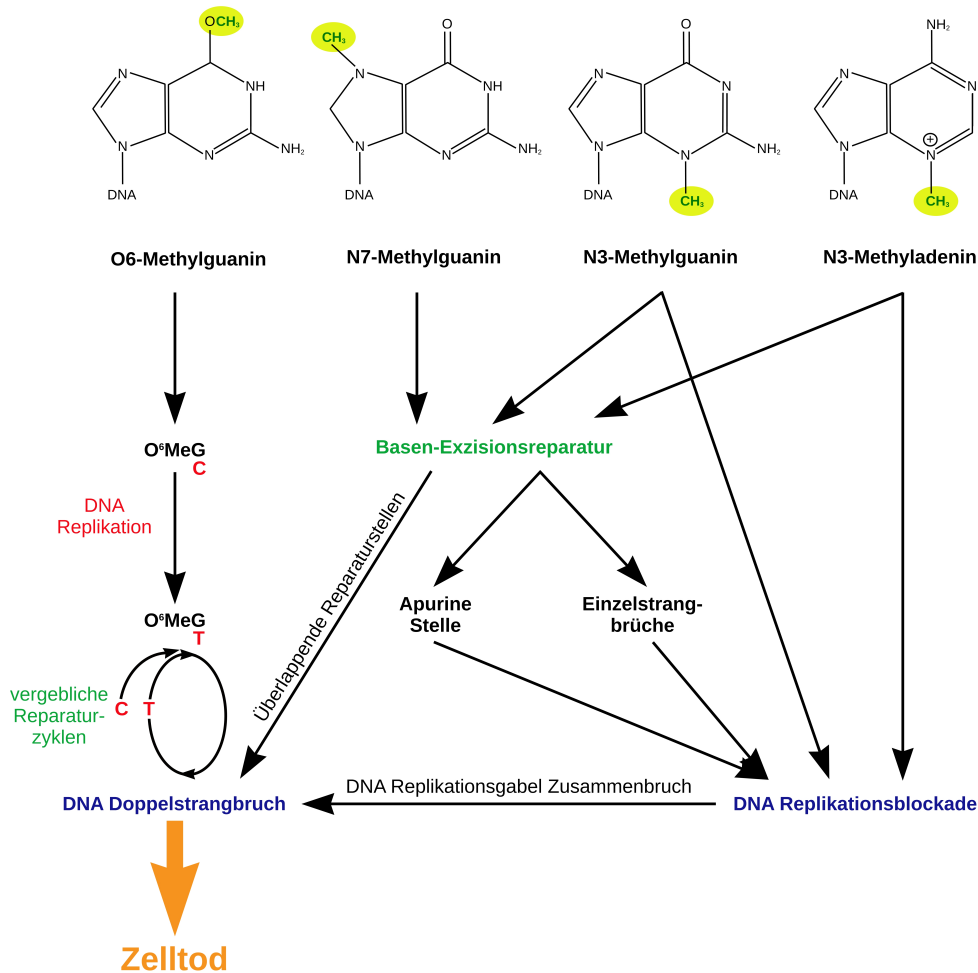


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der TMZ-Toxizität [verändert nach [Roos und Kaina (2013)]]. Das TMZ induziert O6MeG und N-Methylierung. Die N-Methylierungen werden durch die BER repariert, während der es zu SSBs und apurinen Stellen kommt. Diese wiederum führen zu Replikationsblockaden, die zusammenbrechen können und DSBs induzieren. Überlappende Reparaturbereiche können zu DSBs führen. Werden diese nicht repariert, wird der Zelltod induziert. Das O6MeG wird von der MMR erkannt, bei der nächsten Replikation kommt es wiederum zur Fehlpaarung. Es resultieren immer wieder Fehlpaarungen und somit vergebliche Reparaturzyklen, die schließlich zu DSBs führen und ebenfalls den Zelltod induzieren.

transferase (MGMT), das die O6MeG-Läsion direkt reparieren kann. So überträgt die MGMT die Methylgruppe von der O6-Methylguanin-Läsion direkt auf sich und demethyliert die Base. Dieser Transfer führt zur irreversiblen Inaktivierung des MGMT-Proteins und bereitet es für die Ubiquitinierung und den Proteasom-vermittelten Abbau vor [Christmann u. a. (2003)]. Zudem führt die Behandlung mit TMZ in einigen Gliomzellen zu dem Überlebensmechanismus Autophagie [Kanzawa u. a. (2004); Knizhnik u. a. (2013); Carmo u. a. (2011)] und zur Seneszenz [Collado und Serrano (2006); Akbar und Henson (2011); Gorospe und Abdelmohsen (2011); Knizhnik u. a. (2013)]. Diese Mechanismen der Zellen (in den entsprechenden Abschnitten 1.5.2 und 1.5.3 genauer beschrieben) sind ebenfalls Auslöser von Resistenzen [Chen u. a. (2010)], die den Erfolg der Chemotherapie erheblich vermindern können.

1.3 Artesunat

Im Jahr 1971 entdeckten chinesische Wissenschaftler die Antimalaria-Eigenschaften der aus der traditionellen chinesischen Medizin bekannten Pflanze Huang Hua Hao (*Artemisia annua*), oft Qing Hao genannt [Klayman (1985)]. Durch die Ethylether-Extraktion bei niedriger Temperatur gewannen sie die traditionelle Medizin Qinghaosu (Artemisinin). Es dauerte Jahre (1979), bis Artemisinin in der gesamten Welt bekannt wurde. Nach Entschlüsselung der chemischen und physikalischen Eigenschaften konnte das stärker wirksame Dihydroartemisinin synthetisiert werden [White (2008)]. Im Jahr 2015 erhielt die chinesische Forscherin Youyou Tu für die Entdeckung von Artemisinin den Nobelpreis in Medizin.

Durch systematische Untersuchungen von Forschern auf der ganzen Welt kam es zur weiteren Entdeckung von Artemether, Dihydroartemisinin und Artesunat (ART), die als Anti-Malaria-Medikamente für die Behandlung von *Plasmodium falciparum* Infektionen Verwendung fanden. Diese Studien zeigten auch, dass die Trioxan-Brücke (Peroxid-Brücke) für die Antimalaria-Aktivität verantwortlich ist [Kumar u. a. (2011)].

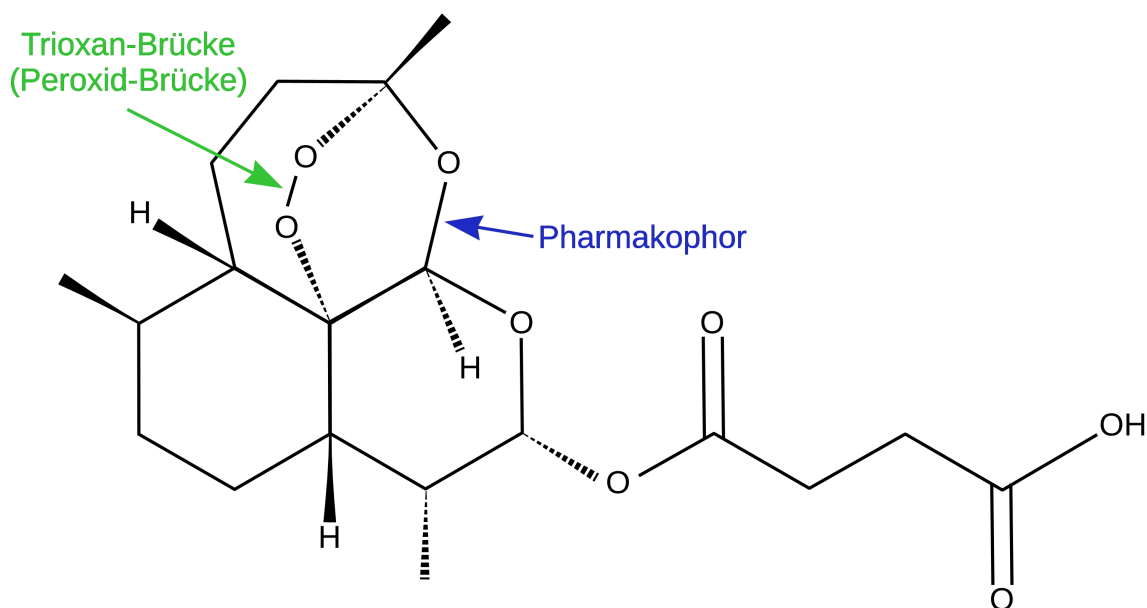


Abbildung 1.4: Strukturformel von Artesunat ((3*R*,5*aS*,6*R*,8*aS*,9*R*,10*S*,12*R*,12*aR*)-Decahydro-3,6,9-Trimethylp-3,12-Epoxy-12*H*-Pyrano[4,3-*j*]-1,2-Benzodioxepin-10-ol-Hydrogensuccinat). Die Summenformel ist $C_{19}H_{28}O_8$. Entscheidend für die zytotoxische Wirkung ist die Peroxid-Brücke im Pharmakophor.

Die Peroxid-Brücke, die spezifisch für diese Gruppe der Medikamente ist, ist in der Strukturformel von Artesunat in Abb. 1.4 dargestellt.

Weitere Studien ergaben, dass die Modulation von oxidativem Stress dem Wirkmechanismus zu Grunde liegt [Kamchonwongpaisan u. a. (1994); Krungkrai und Yuthavong (1987)]. Als Quelle der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) dient das Peroxid im Trioxan-Pharmakophor [Olliaro u. a. (2001)]. Zum einen kann es zur reduktiven Spaltung der Peroxid-Bindung und somit zur Bildung von Kohlenstoff-zentrierten Radikalen kommen. Zum anderen kann die Peroxid-Brücke durch Protonierung einer Ringöffnung unterliegen. Eine schematische Darstellung des Trioxan-Pharmakophor und der Bindungsöffnung der Peroxid-Brücke von Artesunat ist in Abb. 1.5 gezeigt. Desweiteren kann es zur Bildung eines Metallkomplexes führen. Die folgende Spaltung der C-O-

Bindung kann somit ein Peroxid-Metall oder ein offenes Hydroperoxid erzeugen, das zu einem Peroxyradikal führen kann. Diese Reaktion wird u.a. durch Eisensalze (FE(II)) katalysiert und wird als Fentonreaktion bezeichnet. Es können aber auch andere niedervalente Metallkomplexe beteiligt sein. In Abb. 1.6 ist eine schematische Darstellung der Fenton-Reaktion und den potentiell entstehenden Molekülen gegeben.

Der semi-synthetische Wirkstoff Artesunat, mit einer besseren Bioverfügbarkeit als Artemisinin, wurde 2002 wegen seiner Anti-Malaria-Wirksamkeit von der WHO in die Liste der unentbehrlichen Arzneimittel der WHO aufgenommen². Vor rund fünfzehn Jahren entdeckte das Forscherteam um Prof. Efferth, dass Artesunat Krebszellen daran hindern kann, sich weiter zu vermehren [Efferth u. a. (2001)]. Nur sieben Jahre später bestätigte die Arbeitsgruppe um Prof. Kaina, dass der induzierte Zelltod in einer immortalisierten Hamsterzelllinie durch die gentoxische Wirkung von Artesunat hervorgerufen werden konnte [Li u. a. (2008)].

Eine Weise, wie ART den programmierten Zelltod von Tumorzellen auslösen kann, wurde von den Wissenschaftlern um Nathan Brady und Anne Hamacher-Brady an Brustkrebszellen gezeigt. Dabei spielen die Lysosomen und das darin enthaltene lysosomale Eisen eine zentrale Rolle [Hamacher-Brady u. a. (2011)]. Lysosomen sind normalerweise verantwortlich für den Abbau von verschiedenen zellulären Bestandteilen, die beschädigt sind oder die die Zelle nicht mehr benötigt. Somit werden der Zelle neue Bausteine für überlebenswichtige Prozesse geliefert. Das Eisen in den Lysosomen reagiert mit dem Artesunat und es entstehen unter anderem freie Sauerstoffradikale. Diese extrem reaktiven Radikale oxidieren bestimmte Bestandteile der Lysosomen. Durch diese Veränderungen startet eine Signalkaskade zum intrinsischen Apoptoseweg (siehe Kapitel 1.5.1.1) [Hamacher-Brady u. a. (2011)].

Im selben Jahr konnte in der Arbeitsgruppe der Toxikologie in Mainz gezeigt werden, dass Artesunat zudem auch gentoxisch in Glioblastomzelllinien wirkt [Berdelle u. a. (2011)]. Einer der Hauptschäden an der DNA durch oxidativen Stress ist das 8-oxo-

²WHO Model List of Essential Medicines

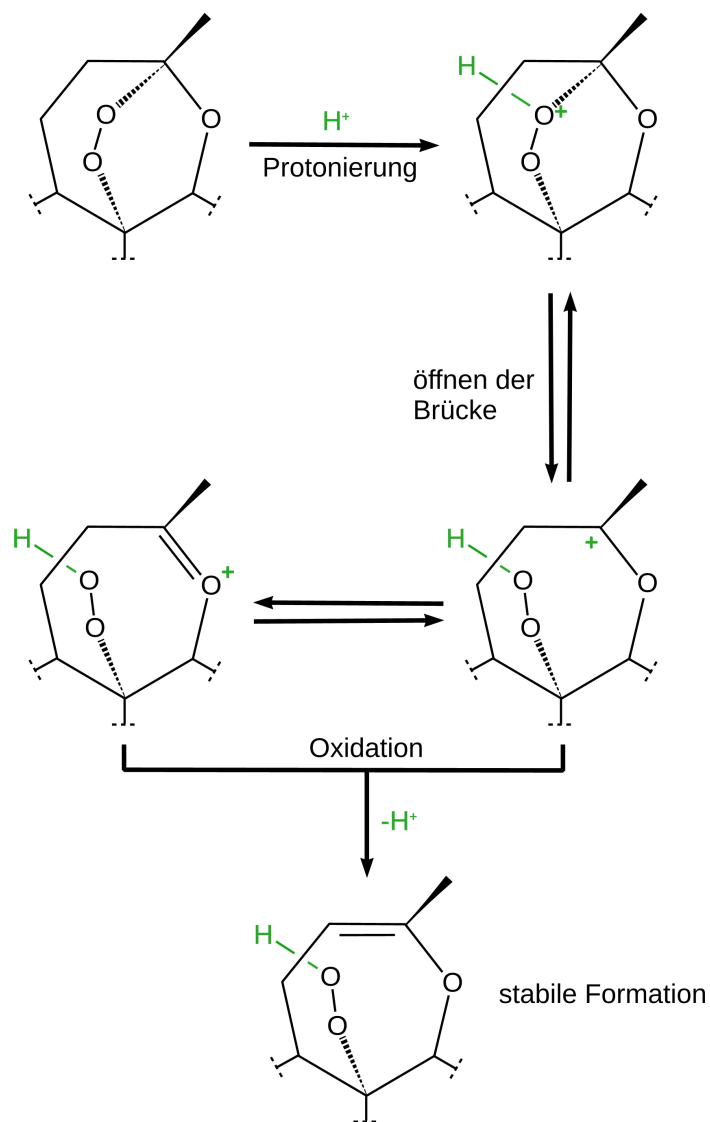


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Bindungsöffnung des Trioxan-Pharmakophor von Artesunat. Die Peroxid-Brücke wird protoniert und somit geöffnet. Die positive Ladung kann an verschiedenen Stellen des Pharmakophors gelagert sein. Mit der folgenden Oxidation wird die Öffnung der Peroxid-Brücke stabilisiert.

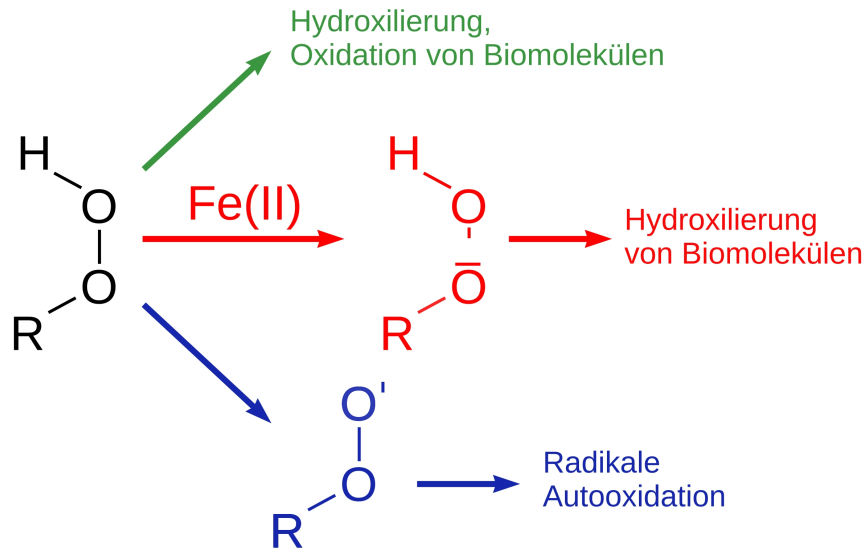


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Fenton-Reaktion an der Peroxid-Brücke, die möglichen resultierenden Moleküle und deren mögliche Reaktion in der Zelle. Die z.B. durch Eisensalze (Fe(II)) katalysierte Spaltung der C-O-Bindung (Fenton-Reaktion) kann ein Peroxid-Metall oder ein offenes Hydroperoxid erzeugen, das zu einem Peroxyradikal führen kann. Dieses führt zur Hydroxilierung von Biomolekülen. Desweiteren kommt es zur Oxidation von Biomolekülen und zur Autooxidation der Radikale.

Guanin (8oxoG). Dieses und auch weitere oxidative Schäden bis hin zu SSBs und DSBs konnten nach Zugabe von ART in dieser Studie nachgewiesen werden. Geschädigten Basen, die unter anderem durch Oxidation der Basen entstehen (z.B. 8oxoG) oder durch die Alkylierung der Basen induziert werden (z.B. durch das Alkylanz TMZ), aber auch durch Desaminierung an den Basen ihren Ursprung haben, können durch die BER repariert werden [Curtin (2012)]. In der Abbildung 1.7 ist schematisch die Toxizität von Artesunat dargestellt.

Die BER und die Einzelstrangbruch-Reparatur (Single-strand break repair, SSBR) werden häufig als Synonyme angesehen, weil sie die gleichen Komponenten beinhalten und nach dem initialen Schritt gleich verlaufen. Eine schematische Darstellung der

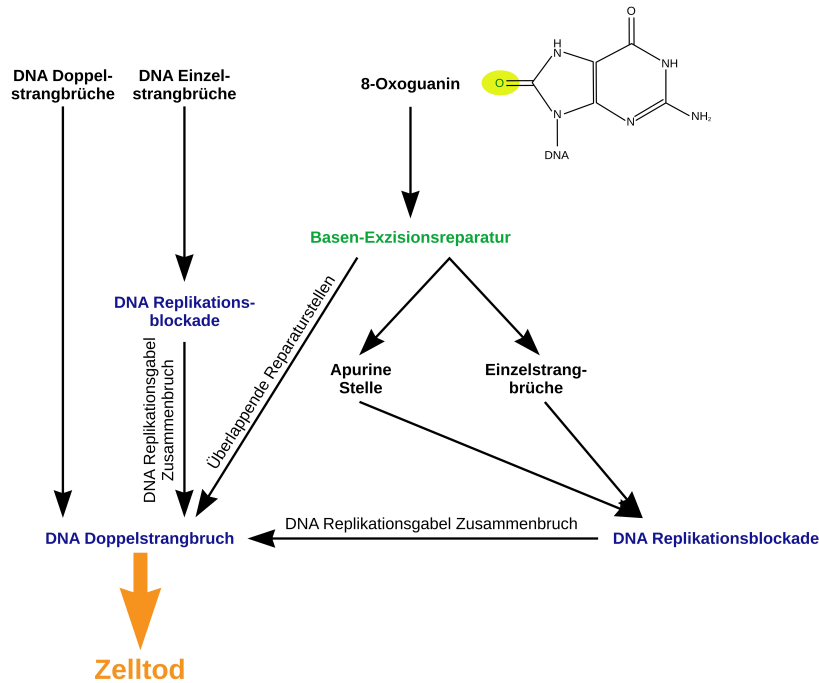


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der Toxizität von Artesunat [verändert nach [Roos und Kaina (2013)]]. Artesunat induziert 8oxoG, SSBs und DSBs. Das 8oxoG wird durch die BER repariert, während dessen kommt es zu SSBs und apurinen Stellen. Diese wiederum führen zur Blockade der Replikationsgabeln, die zusammenbrechen können und DSBs induzieren. Überlappende Reparaturbereiche können ebenfalls zu DSBs führen. Werden diese nicht repariert, wird der Zelltod induziert.

BER ist in Abb. 1.8 gezeigt.

Im ersten Schritt der BER werden die oxidierten, alkylierten oder desaminierten Basen von Glycosylasen erkannt und durch Hydrolisieren der N-glycosidischen Bindung entfernt [Wilson und Barsky (2001)]. Unter den DNA-Glycosylasen wird zwischen zwei Subgruppen unterschieden, dem Typ I und Typ II. Die Typ-I-Glycosylasen katalysieren ausschließlich die Hydrolyse der N-glycosidischen Bindung und die resultierende apurinische/apyrimidinische Stelle wird von einer Endonuklease hydrolysiert. Die Typ-II-Glycosylasen, zu denen die 8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase (OGG1) zählt, die 8-

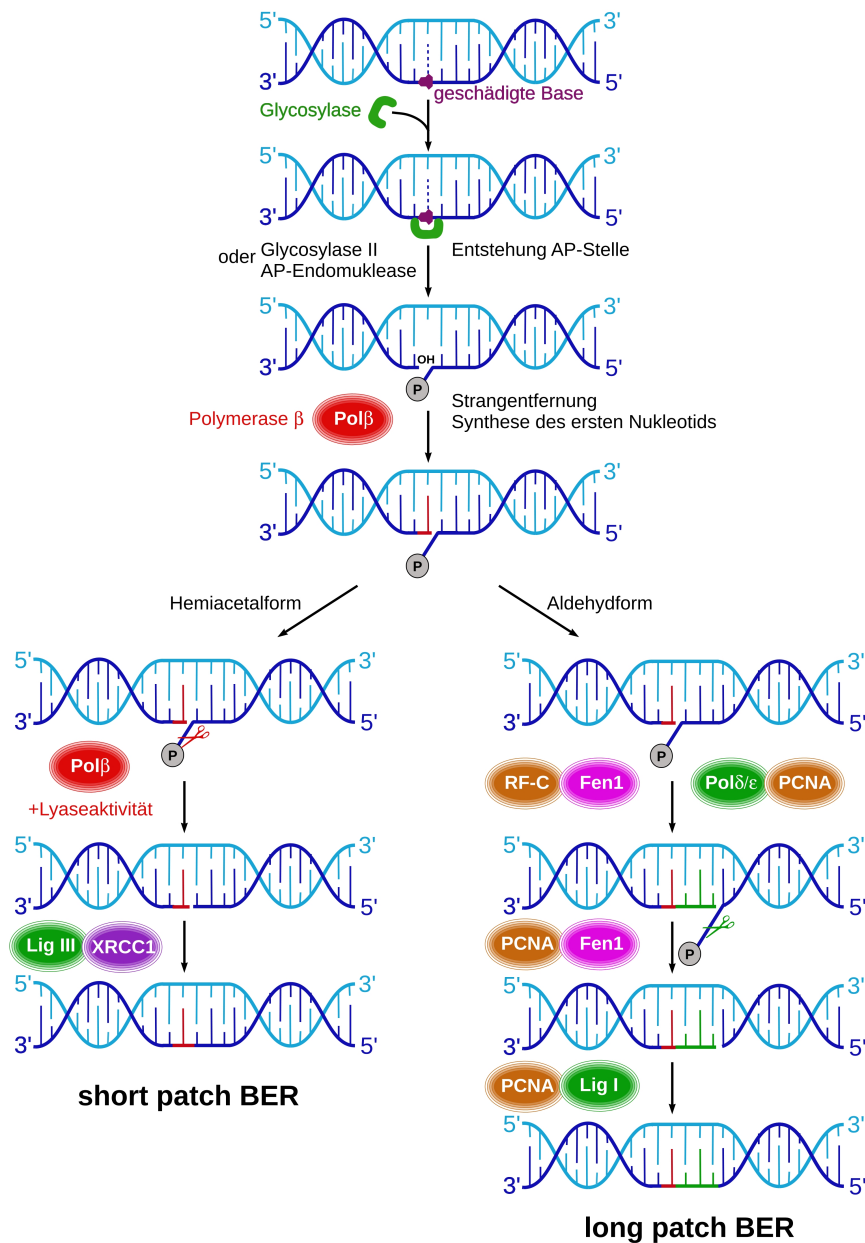


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der BER nach Behandlung von ART. Artesunat induziert 8oxoG. Diese Läsionen werden durch die BER repariert. Die geschädigten Basen werden durch Glycolasen erkannt und entfernt. Je nach resultierender Bruchstelle erfolgt die short oder long patch BER und die entfernten Nucleotide werden ersetzt. Der überstehende Strang wird entfernt und die Lücke durch eine entsprechende Ligase geschlossen.

Oxoguanin erkennt, verfügen zusätzlich über 3'-Endonukleaseaktivität und spalten das DNA-Rückgrat durch Lösen der Phospho-Diester-Bindung [Christmann u. a. (2003)]. Die Lücke in der DNA wird dann durch die short patch BER (ein einzelnes Nukleotid wird ersetzt) oder durch die long patch BER repariert (2 - 20 Nukleotide werden ersetzt). Dies ist abhängig von der Art der 5'- und 3'-Enden an dem entstandenen Einzelstrangbruch [Vos u. a. (2012)]. Die Polymerase β (Pol β) setzt das erste Nukleotid unabhängig von short oder long patch BER ein. Auf Grund der Endungen ist es der Pol β in der short patch BER möglich, ihre Lyaseaktivität zu nutzen. In der long patch BER ist dies nicht möglich und nach dem ersten Nukleotid dissoziiert die Pol β von der DNA und das proliferierende Zellkernantigen (Proliferating cell nuclear antigen, PCNA) bindet an die DNA. Im Gegensatz zur short patch BER, in der das DNA-Rückgrat direkt geschlossen wird, werden bei der long patch BER weitere Proteine benötigt. Rekrutiert von der PCNA wird die Synthese von der Polymerase δ oder ε fortgesetzt [Stucki u. a. (1998)]. Die Endstruktur zur Ligation wird durch die Endonuklease Flap-Endonuklease1 (FEN1) geschaffen. Die Ligation selbst kann durch die Ligase I, die hauptsächlich in der long patch BER aktiv ist, und durch die Ligase III, die nur in der short patch BER aktiv ist, durchgeführt werden [Tomkinson u. a. (2001)]. Die DNA-Ligase III interagiert mit dem Röntgen-Reparatur-Kreuz-Komplementierungsprotein 1 (X-ray repair cross-complementing protein 1, XRCC1), das weitere Enzyme rekrutieren kann, u.a. um die Chromatinstruktur zur Reparatur zu lockern. Die Bindung von Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1 (PARP1) an die DNA ist nötig für die Rekrutierung von XRCC1 [El-Khamisy u. a. (2003)]. Desweiteren schützt diese vor der Degradation, wenn die BER-Kapazität erschöpft ist [Woodhouse u. a. (2008)]. Doch auch dann kommt es zu SSBs und zu Replikationsblockaden. Diese induzieren DSBs, die unrepariert zum Zelltod führen [Roos und Kaina (2013)].

Induzierte DSBs können über die Homologe Rekombination (HR) repariert werden, die eine bedeutende Rolle als Resistenzfaktor für genotoxische Krebsmedikamente wie TMZ [Roos u. a. (2007)] und auch ART [Berdelle u. a. (2011)] spielt, da sie die Re-

paratur von DSBs an blockierten Replikationsgabeln ermöglicht. Die HR ist ein komplexer Prozess, der mit der Schadenserkenkung beginnt, die den intakten homologen DNA-Strang findet. Darauf folgt der Transport des Strangs zu der Läsion, die partielle Denaturierung der DNA, die DNA-Synthese an der intakten Matrix, die Separation der DNA-Stränge und die Wiederherstellung einer unversehrten und intakten DNA [Filippo u. a. (2008)]. Eine Schlüsselfunktion bei der HR spielen die Proteine ATM und ATR, die durch Phosphorylierung weitere Proteine wie BRCA1, BRCA2, FANCD2, WRN und BLM für den Reparaturprozess rekrutieren und aktivieren [Roos und Kaina (2013)].

1.4 Bestrahlung

Die Bestrahlung der Tumore ist neben der Chemotherapie eine entscheidende Medikation in der Glioblastomtherapie. In der Strahlentherapie zeigen die fraktionierten Behandlungsschemata die effektivste Wirkung. Die geringeren Dosen sind für das Normalgewebe leichter zu tolerieren und das empfindlichere Tumorgewebe wird an der Wiederbesiedlung gehindert [Huber u. a. (2013)]. Die Standard-Fraktionierung wird als Einzeldosen von 1,8 bis 2 Gy einmal täglich an fünf Tagen pro Woche festgelegt, die Maximaldosis von insgesamt 60 Gy wird selten überschritten. Bei besonders schnell wachsenden Tumoren kann die tägliche Dosis aber auf zwei Bestrahlungseinheiten erhöht werden. Bei Hirntumoren wird nicht nur die äußere Bestrahlung eingesetzt, sondern es kann auch mittels eines speziellen Skalpels direkt im Hirn bestrahlt werden. Die Bestrahlung mit höheren Einzeldosen ist ohne erhöhte Nebenwirkungen nur möglich, wenn das Strahlungsfeld auf den Tumor eingeschränkt werden kann, z.B. mit einer stereotaktischen Einheit [Grills u. a. (2012); Rodrigues u. a. (2013)].

Unter den DNA-schädigenden Mitteln ist die Bestrahlung einzigartig in Bezug auf die Vielfalt der Schäden und deren Induktion [Roos und Kaina (2013)]. Ionisierende Strahlung induziert ROS innerhalb des Zellkerns, die die DNA schädigen. Achtzig Prozent

der DNA-Läsionen sind Basenmodifikationen [Cadet u. a. (1999)], unter denen 8oxoG die am besten bekannte Läsion ist. Zu den Basenmodifikationen kommen eine hohe Anzahl von SSBs und auch DSBs [Rothkamm und Löbrich (2003)], die die hohe Toxizität der Bestrahlung ausmachen (siehe Schema Abb. 1.7).

Die Reparatur dieser DSBs erfolgt hauptsächlich über die Nicht-homologe-End-Verknüpfung (non-homologous end joining, NHEJ) [Rothkamm u. a. (2003); Mahaney u. a. (2009); Beucher u. a. (2009)]. Sie basiert auf dem Zusammenspiel der Proteine Ku70 (XRCC6), Ku80 (XRCC5) und der katalytischen Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit, DNA-PKcs), so wie XRCC4, XLF (XRCC4-like factor), Ligase IV und Artemis. Ku70 und Ku80 erkennen die DNA-Enden und binden dort, anschließend koppeln die DNA-PKcs an diese Proteine und bilden den DNA-PK-Komplex [Smith und Jackson (1999)]. Dieser Komplex phosphoryliert die Histone H2AX und die Proteine XRCC4, XLF, Ligase IV und Artemis, die dann an der Läsion verbleiben und die DNA-Enden verknüpfen. Dieser Reparaturmechanismus ist nicht fehlerfrei, aber er ist in allen Zellzyklusphasen der Zelle aktiv, überwiegend in der G0- und G1-Phase [Shrivastav u. a. (2008)].

1.5 Zellzyklus und Zellschicksale

Der Zellzyklus beginnt mit der Zellproliferation und endet mit dem Zelltod. Diese Prozesse sind entgegengesetzte Zellschicksale [Kerr u. a. (1972)], deren Abläufe durch molekulare Faktoren gekoppelt sind [Lowe u. a. (2004); Evan und Vousden (2001)]. In normalen Zellen besteht ein fein gesteuertes Gleichgewicht zwischen Proliferation und Zelltod, welches bei Bedarf oder Stress verlagert wird. Die Prozesse der Proliferation und der Differenzierung von Zellen treten in geordneter Weise auf und enden, wenn sie nicht mehr erforderlich sind. In Tumorzellen sind diese Prozesse gestört und es kommt zur unkontrollierten Proliferation [Hahn und Weinberg (2002)]. Diese Faktoren sind oft Zielgruppen onkogener Mutationen, die zu unkontrollierten Zellproliferationen führen.

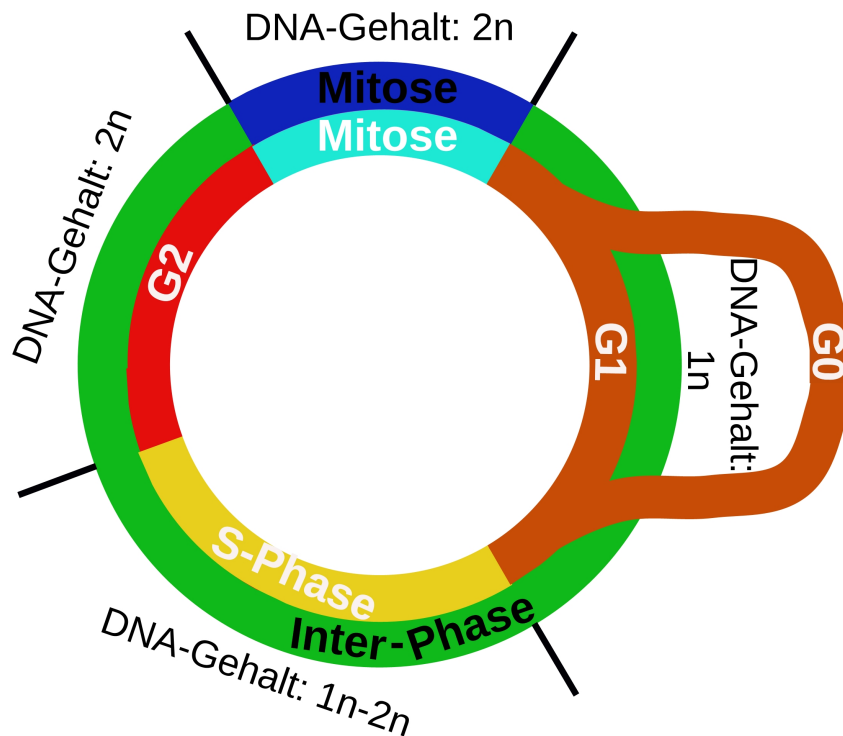


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung des Zellzyklus zusammen mit dem DNA-Gehalt in den einzelnen Phasen des Zyklus. Die Interphase umfasst die temporäre Ruhephase (G0), G1-Phase (G1), Synthese-Phase (S-Phase) und G2-Phase (G2). In der G1 bleibt der DNA-Gehalt konstant einfach ($1n$). In der S-Phase werden die Chromosomen verdoppelt (DNA-Synthese), hier steigt der DNA-Gehalt der Zelle an ($n1-n2$). In der G2 bereitet sich die Zelle auf die Mitose vor, aber der DNA-Gehalt bleibt konstant ($2n$).

Die unkontrolliert proliferierenden Zellen sind dann von dem programmierten Zelltod entkoppelt und sind verantwortlich für die Tumorentstehung [Danial und Korsmeyer (2004)]. Weitere Merkmale von Krebszellen sind die Angiogenese, Metastasen und die Unterdrückung der Apoptose. Allerdings ist die unkontrollierte Proliferation der Zelle das Hauptmerkmal der Tumorgenese [Sherr (1996)].

Der Zellzyklus wird in Mitose (Kernteilung) und Interphase unterteilt. Nur 5% des Zellzyklus fallen zeitlich der Mitose zu, wohingegen die Interphase 95% des Zyklus

einnimmt. Die Interphase wird in G1-Phase (G1), Synthese-Phase (S-Phase) und G2-Phase (G2) unterteilt. Zudem können sich Zellen in einer temporären Ruhephase befinden, die als G0-Phase (G0) bezeichnet wird. In der G1 bereitet sich die Zelle auf die bevorstehende Chromosomenverdopplung vor. In dieser Phase wächst die Zelle und nimmt an Volumen zu, aber der DNA-Gehalt bleibt konstant einfach ($1n$). In der S-Phase werden die Chromosomen verdoppelt (DNA-Synthese), hier steigt der DNA-Gehalt der Zelle an. Am Ende der Phase hat die Zelle ihren DNA-Gehalt verdoppelt ($2n$). In der G2 bereitet sich die Zelle auf die nächste Mitose vor. Die Zelle wächst in dieser Phase weiter, aber der DNA-Gehalt bleibt konstant ($2n$). Bei einem DNA-Gehalt von über $2n$ spricht man von einer polyploiden Zelle (z.B. tetraploide Zelle mit $4n$). In Abb. 1.9 ist eine schematische Darstellung des Zellzyklus gezeigt.

Das Voranschreiten zwischen den Phasen wird durch einen konservierten Regulierungsmechanismus gesteuert. Dabei wird nicht nur die Koordination der verschiedenen Ereignisse des Zellzyklus gesteuert, sondern er verbindet auch den Zellzyklus mit extrazellulären Signalen [Sa und Das (2008)]. Der fehlerfreie Ablauf des Zellzyklus in gesunden Zellen wird durch die koordinierte Aktivität von Cyclin-abhängigen Kinasen, Checkpoint-Kontrollen und DNA-Reparaturwegen erreicht [Hartwell u. a. (1994)].

Die DNA unterliegt auch ohne Tumorthherapie hohen endogenen Schädigungen und die DNA-Schadensantwort (DNA Damage Response, DDR) ist wesentlich für die Aufrechterhaltung der Stabilität des Genoms und des Zellüberlebens verantwortlich. Die DDR koordiniert die Reparatur der DNA und die Aktivierung der Zellzykluskontrollpunkte, um die Zelle im Zyklus zu arretieren, damit ausreichend Zeit für die Reparatur ermöglicht wird [Curtin (2012)]. Genomische Instabilität ist eine der am häufigsten vorkommenden Eigenschaften von Tumorzellen. Sie ist vermutlich auf die kombinierte Wirkung von DNA-Schäden, Dysregulation der DNA-Reparatur und der Signalkaskaden an den Zellzykluskontrollpunkten zurückzuführen [Lord und Ashworth (2012)].

Blockierte Replikationsgabeln und DSBs führen über das mutierte Ataxia telangiectasia (Ataxia telangiectasia mutated, ATM)-Protein und das Ataxia telangiectasia und

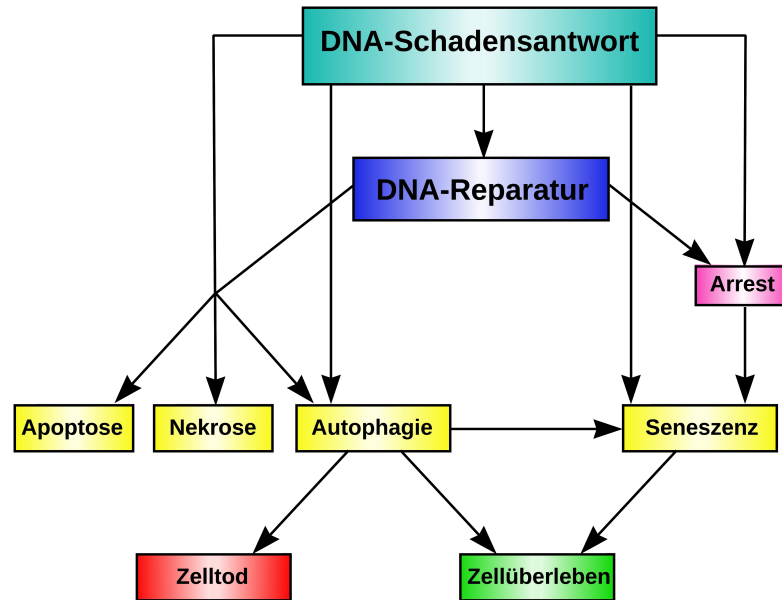


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung der verschiedenen Zellschicksale. Durch die DNA-Schadensantwort werden differenzierte Zellschicksale induziert. Die DNA-Reparatur wird induziert, sowie der Zellzyklus unterbrochen, um die nötige Zeit zur Reparatur zu gewährleisten. Dieser Zellzyklus-Arrest kann dann auch permanent werden und Seneszenz induzieren. Ist die Reparatur-Kapazität erschöpft, wird einer der Zelltodprozesse aktiviert. Die induzierte Autophagie kann sowohl zum Zelltod als auch zum Überleben der Zelle führen. Die Autophagie ist in einigen Zellen auch nötig, um die Seneszenz einzuleiten.

Rad3 bezogene (Ataxia telangiectasia and Rad3-related, ATR)-Protein zur Phosphorylierung benachbarter H2AX-Histone (die phosphorylierte Form: γ H2AX) und weiterer Signalproteine. Insbesondere die Phosphorylierung von Chk1, Chk2 und p53 ist von entscheidender Bedeutung bei der Weiterleitung von ATM/ATR-Signalen, die u.a. zu einem Zellzyklusarrest und erhöhter DNA-Reparatur führen [Christmann u. a. (2003)]. Die DDR führt darüber hinaus zur Weiterleitung von Signalen zum Zelltod [Lee u. a. (2012); Roos und Kaina (2013)], zur Autophagie [Czarny u. a. (2015); Filomeni u. a.

(2015)] und zur Seneszenz [d’Adda di Fagagna (2008); Akbar und Henson (2011); Gorospe und Abdelmohsen (2011)]. Die unterschiedlichen Zellschicksale beeinflussen die Effizienz der Tumorthherapie. Abbildung 1.10 zeigt eine Übersicht der verschiedenen Zellschicksale ausgehend von der DNA-Schadensantwort, die in den nachfolgenden Kapiteln detailliert beschrieben sind.

1.5.1 Zelltod

Der Nomenklaturausschuss für Zelltod stellte im Jahr 2012 zum dritten Mal einen Artikel zur Definition der verschiedenen Zelltode zusammen [Galluzzi u. a. (2012)]. Basierend auf dieser Definition werden die drei für diese Arbeit relevanten Zelltodtypen Apoptose (Typ 1), Autophagie (Typ 2) und Nekrose (Typ 3) in den folgenden Abschnitten dargestellt.

1.5.1.1 Typ 1 – Apoptose

Hippokrates war der Erste, der den Begriff der Apoptose in der medizinischen Literatur verwendete [Esposti (1998)]. Anfang der 70er Jahre führten Kerr et al. basierend auf ihren mikroskopischen Untersuchungen den Begriff des programmierten Zelltods Apoptose erneut ein [Kerr u. a. (1972)]. Morphologisch charakterisiert sich die Apoptose durch Chromatinkondensation, Kernfragmentierung, Schrumpfung des Zytoplasma und Bildung von apoptotischen Körpern. Biochemisch wird die Apoptose in zwei weitere Subtypen, den extrinsischen und den intrinsischen Apoptoseweg, unterschieden. Der extrinsische Apoptoseweg wird durch extrazelluläre Stresssignale an den sogenannten Todesrezeptoren (Transmembranrezeptoren) induziert. Diese werden durch die Bindung von lethalen Liganden, z.B. durch den FAS-Liganden (FASL) oder durch das Absinken der Konzentration von spezifischen Liganden, wie z.B. das NETRIN-1, aktiviert [Wajant (2002); Schütze u. a. (2008); Mehlen und Bredesen (2011)]. Mit Bindung des Liganden findet eine Konformationsänderung und/oder eine Stabilisierung

der Form statt, die die Bindung weiterer Proteine und Proteinkomplexe am zytosolischen Ende des Rezeptors ermöglicht. Zu diesen Proteinen gehören bei Bindung an den FAS-Rezeptor das Rezeptor-interagierende Protein (RIP1), das FAS-assoziierte Protein mit Todes-Domäne (FADD), verschiedene Isoformen von c-FLIP und cIAPs³. Über die Rekrutierung und Bindung dieser Proteine wird ein sogenannter Tod-induzierender Signalkomplex (TiSK) gebildet, der die Kaspasen-Kaskaden aktivieren kann. Bei den NETRIN-Rezeptoren werden etwas andere Proteine rekrutiert und andere Proteinkomplexe gebildet als bei den Todesrezeptoren. Zu diesen Proteinen gehören z.B. das DRAL⁴ und TUCAN⁵, die ebenfalls die Kaspasen-Kaskade aktivieren können. Die Kaskade beginnt mit den Kaspasen 8 oder 9, die folgend die Kaspasen 3, 6 und 7 aktivieren können. Die Kaspase 8 kann zudem über das BID⁶ Protein durch Abspaltung eines Teils dieses Proteins, die mitochondriale Außenmembranpermeabilisierung (mitochondrial outer membrane permeabilisation, MOMP) stimulieren [Kischkel u. a. (1995); Muzio u. a. (1996); Li u. a. (1998); Yin u. a. (1999)]. Bei den konzentrationsabhängigen Rezeptoren gibt es ebenfalls die Möglichkeit, über einen Signalkomplex, bestehend aus der Proteinphosphatase 2A (PP2A) und der DAPK1⁷, die MOMP zu induzieren [Bialik und Kimchi (2006); Guenebeaud u. a. (2010)]. Eine schematische Darstellung der extrinsischen Apoptose ist in Abb. 1.11 gezeigt. Das korrespondierende Schema für die intrinsische Apoptose ist in Abb. 1.12 dargestellt.

Die mitochondriale Außenmembranpermeabilisierung erfolgt aber auch als Reaktion auf vielfältige intrazelluläre Stressbedingungen, wie u.a DNA-Schäden und ROS, die

³zelluläres Inhibitor-Protein der Apoptose (cellular inhibitor of apoptosis proteins, cIAPs)

⁴in Rhabdomyosarcoma runterreguliertes LIM Protein (down-regulated in rhabdomyosarcoma LIM protein, DRAL)

⁵der im Tumor-raufregulierte Kaspase-assoziierte-Rekrutierungsdomäne-enthaltender Kaspase 9 Antagonist (tumor-up-regulated Caspase-associated recruitment domains-containing antagonist of caspase nine, TUCAN)

⁶pro-apoptotische BH3 interagierende Domäne Todesantagonisten (BH3 interacting-domain death agonist, BID)

⁷Todes-assoziierte Proteinkinase 1 (death-associated protein kinase 1, DAPK1)

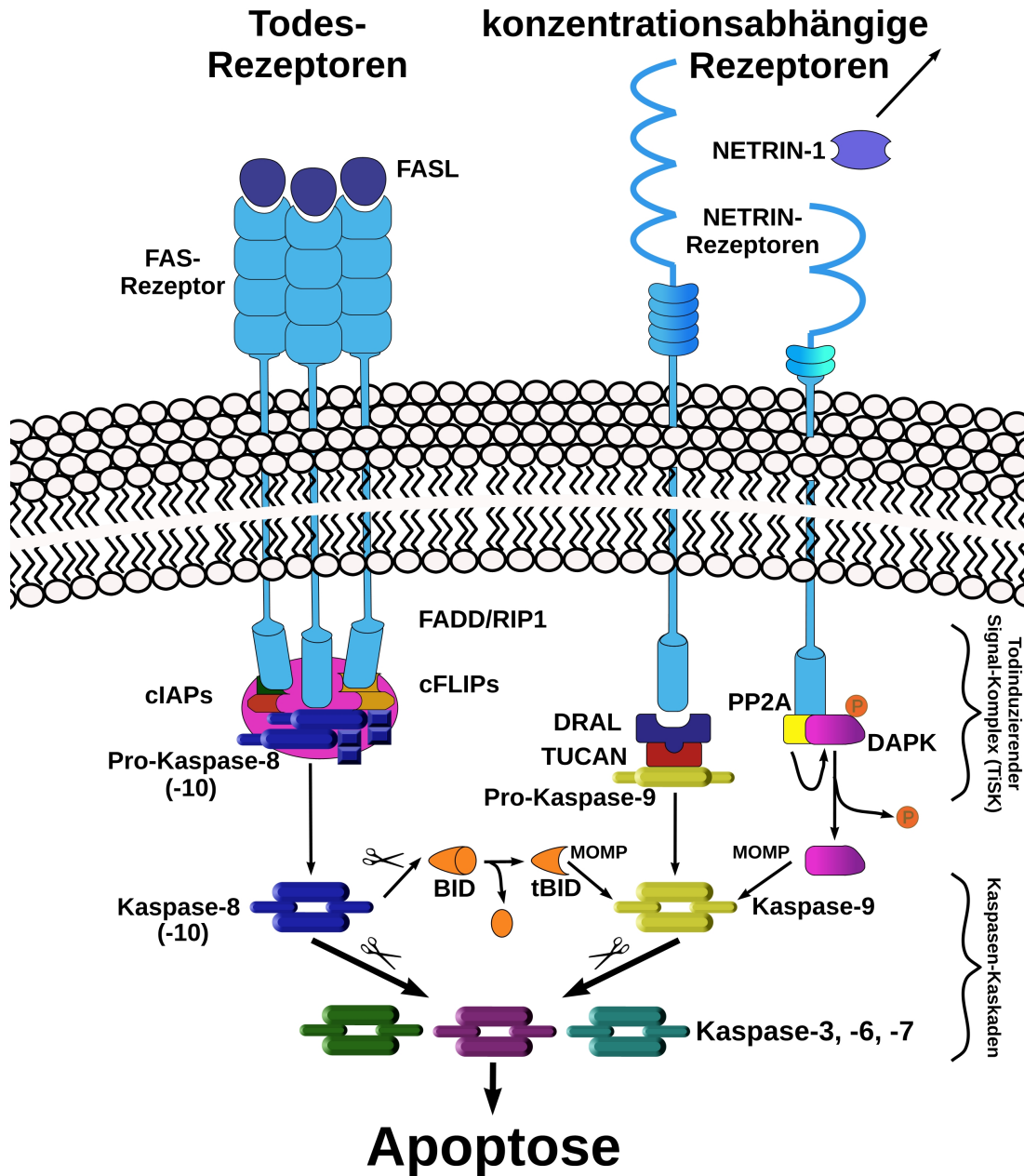


Abbildung 1.11: Schematische Darstellung der extrinsischen Apoptose [verändert nach [Galluzzi u. a. (2012)]]. Auf der linken Seite ist der Signalweg über den Todesrezeptor FAS dargestellt, auf der rechten Seite über die konzentrationsabhängigen NETRIN-Rezeptoren. Über die Aktivierung verschiedener Proteinkomplexe wie TiSK und den Kaspasen-Kaskaden werden die Signale zur Apoptose prozessiert.

den intrinsischen Apoptoseweg induzieren können. Das BAX⁸ und BAK⁹ interagieren mit der Mitochondrienmembran. Sie aktivieren spannungsabhängige Ionenkanäle und können selbst Poren bilden, wodurch die Mitochondrienmembran durchlässig wird. Aber auch andere Poren-Komplexe, wie der PTPC¹⁰, sind an der MOMP beteiligt [Verrier u. a. (2003)]. Es kommt zu einer Übergenerierung von ROS, die zusammen mit spezifischen mitochondrialen Proteinen ins Zytosol freigesetzt werden [Kroemer u. a. (2007)]. Zu den Proteinen gehören der Apoptose-induzierende-Faktor (AIF) und die Endonuklease G (ENDO G), die Kaspase-unabhängig die DNA-Fragmentierung einleiten können [Chai u. a. (2000); Yang u. a. (2003); Srinivasula u. a. (2003)]. Desweiteren zählen dazu das Zytochrom C (CYTC), das zusammen mit dem zyttoplasmatischen Adapterprotein (cytoplasmic adaptor protein, APAF1) und Adenosin-Tri-Phosphat (ATP) über die Bildung des Apoptosoms Kaspase-abhängig die Apoptose induziert [Li u. a. (1997)]. Die ebenfalls freigesetzten Proteine, das für hohe Temperaturen benötigte Protein 2 (high temperature requirement protein A2, HTRA2) und das zweite mitochondrial-abgeleitete Aktivatorprotein der Kaspasen (second mitochondria-derived activator of caspases, SMAC) unterstützen diesen Prozess, indem sie die Kaspase 9 und 3 inhibierenden Proteine (Inhibierende Apoptose Proteine, IAPs) durch Degradierung inaktivieren [Zou u. a. (1997)]. Das HTRA2 degradiert zudem das Zytoskelett der Zelle und unterstützt somit auch den Kaspase-unabhängigen Apoptoseweg [Yang u. a. (2003)].

1.5.1.2 Typ 2 – Autophagie

Als eine weitere Antwort auf intrazellulären Stress und als aktiver Prozess während der Entwicklung der Zelle aktivieren eukaryotische Zellen oft die Autophagie. Während der Autophagie werden ein Teil des Zytoplasmas und intrazelluläre Bestandteile der Zelle, dies können sowohl Proteine als auch ganze Organellen sein, von einer Dop-

⁸Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) assoziiertes X Protein, BAX

⁹Bcl-2 homologe Antagonisten/Killer Protein, BAK

¹⁰Permeabilisierender Transitions-porenkomplex (permeability transition pore complex, PTPC)

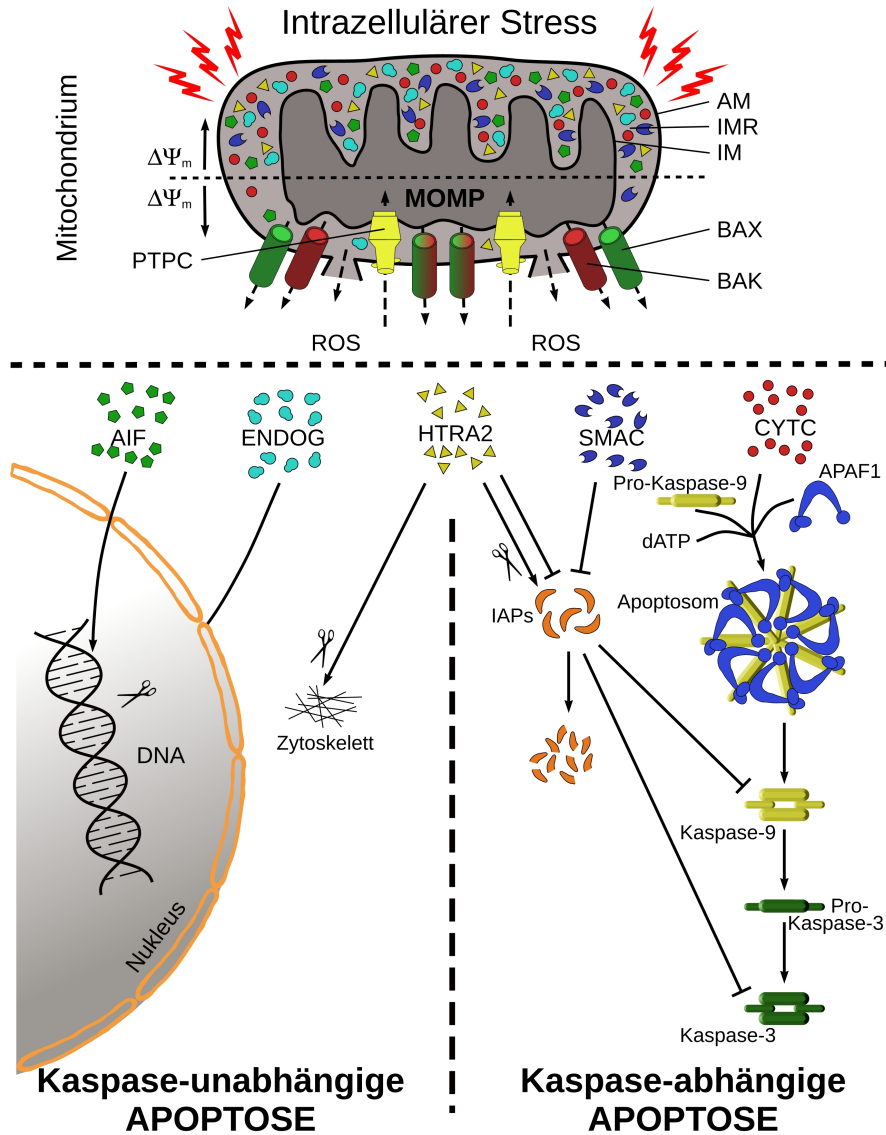


Abbildung 1.12: Schematische Darstellung der intrinsischen Apoptose [verändert nach [Galluzzi u. a. (2012)]]. Oben ist das Mitochondrium mit seiner äußeren (AM) und inneren Membran (IM) sowie dem Intramembranraum (IMR) und dem mitochondrialen Transmembranpotential ($\Delta\psi_m$) dargestellt. Auf der linken Seite ist der Signalweg zur Kaspase-unabhängigen Apoptose dargestellt, auf der rechten Seite zur Kaspase-abhängigen Apoptose. Bei der Kaspase-unabhängigen Apoptose werden durch die Proteine AIF, ENDOG und HTRA2 direkt die DNA bzw. das Zytoskelett geschädigt. Innerhalb der Kaspase-abhängigen Apoptose wird zunächst das Apoptosom gebildet und anschließend die Kaspase-Kaskade aktiviert.

pelmembran umschlossen. Diese Vesikel (Autophagosomen) fusionieren mit den Lysosomen, deren Enzyme die eingeschlossenen Bestandteile degradieren. Die durch Stress induzierte Autophagie übt häufig Zellschutzfunktionen aus und fördert die Wiederherstellung der Homöostase und das Überleben der Zelle. Eine pharmakologische oder genetische Hemmung der Autophagie in einer Stressphase der Zellen beschleunigt den Zelltod [Boya und Kroemer (2008)]. Doch im Kontrast dazu ist die Folge einer solchen Inhibition der Autophagie die Hemmung des Zelltods, was darauf hinweist, dass die Autophagie auch einen tödlichen Mechanismus, den 'autophagischen Zelltod', vermittelt [Berry und Baehrecke (2007); Denton u. a. (2009); Nezis u. a. (2010)]. So kann auch eine zu stark frequentierte Autophagie und somit eine massive Vakuolisierung der Zelle zu einer Art Selbstzerstörung der Zelle führen [Galluzzi u. a. (2007); Boya und Kroemer (2009)]. Durch diese Kontroverse bleibt die Autophagie stets ein Thema mit vielen Diskussionen und Interpretationen. Der Prozess der Autophagie wird im Kapitel 1.5.2 noch genauer dargestellt.

1.5.1.3 Typ 3 – Nekrose

Die Nekrose galt lange Zeit als ein rein zufälliger und unregelter Zelltod-Mechanismus, der keine morphologischen Merkmale der Apoptose und Autophagie aufwies [Kroemer u. a. (2009); Galluzzi u. a. (2007)]. Da fälschlicherweise damals angenommen wurde, dass die Apoptose ohne eine Aktivierung der Immunantwort auskommen würde, wurde diese in der Krebstherapie als Zelltodart bevorzugt und die Nekrose möglichst vermieden. Heute weiß man, dass es unabhängig von der Art des induzierten Zelltods zu Immunantworten kommen kann [Albert u. a. (1998); Banchereau und Steinman (1998); Zitvogel u. a. (2004)]. Mittlerweise ist bekannt, dass die Nekrose ein geregelter Prozess ist, der durch verschiedene Stressfaktoren wie z.B. DNA-Schäden und ROS induziert werden kann [Cho u. a. (2009); He u. a. (2009)]. Die Nekrose kann aber auch durch die Ligandierung der Todesrezeptoren ausgelöst werden. Dies passiert insbesondere, wenn die Zellen nicht über die (Pro-)Kaspase 8 verfügen oder durch Deubiquitinierung von RIP1,

z.B. durch Cyldromatosis (CYLD). In diesem Fall werden die Schlüsselproteine der Nekrose RIP1 und RIP3 nicht abgebaut und aktivieren den Nekrosesignalweg.

Bei lysosomalen Stress, wie er durch ROS induziert werden kann, oder vom aktivierten Todesrezeptor aus kann die generelle Proteolyse der Zelle induziert werden [Maiuri u. a. (2007)]. Vom Rezeptor aus wird über die Jun-Kinase (JNK) die lysosomale Membranpermeabilisierung (LMP) ausgelöst. Dadurch werden die Inhaltsstoffe der Lysosomen ins Zytosol freigesetzt. Die so freigesetzten Kathepsine B und D leiten die generelle Proteolyse der Zelle ein.

Oft wird der Begriff der Nekroptose als Synonym der geregelten Nekrose verwendet, doch ist hier lediglich die Nekrose in Abhängigkeit des Proteins RIP1 und der Induktion über den TNF-Rezeptor1 bezeichnet [Degterev u. a. (2005)].

Zur Zeit sind zwei Wege zur Aktivierung des Nekrosoms (RIP1/RIP3-Komplex) und somit zur Induktion der geregelten Nekrose bekannt [Galluzzi u. a. (2012)]. Der besser beschriebene Weg beginnt mit der Aktivierung des TNF-Rezeptor1 und anschließender Protein-Signalkaskade zur Bildung des Nekrosoms [Han u. a. (2011)]. Hierfür werden das TNF-Rezeptor assoziierte Protein mit Todesdomäne (TNFR-associated death domain, TRADD) [Schütze u. a. (2008)], die TNFR-assozierten Faktoren 2 (TRAF2) und 5 (TRAF5) [Micheau und Tschopp (2003)] und das FADD Protein rekrutiert.

Der andere nicht vollständig aufgeklärte Weg setzt die Aktivierung der Poly-(Adenosin-Di-Phosphat-Ribose) Polymerase (PARP) voraus, z.B. in Folge eines DNA-Schadens, die dann zur Bildung des Nekrosoms führt [Vandenabeele u. a. (2010)]. Abbildung 1.13 gibt eine schematische Übersicht über den Ablauf der Nekrose.

1.5.2 Autophagie

Das Wort Autophagie, vom griechischen Wort für ‘selbst-essen’ abgeleitet, bezieht sich auf die Abbauprozesse, durch die die Zelle Komponenten des Zytoplasmas mit Hilfe der Lysosomen degradiert [Yang und Klionsky (2010)]. Dies führt zu der Freisetzung von

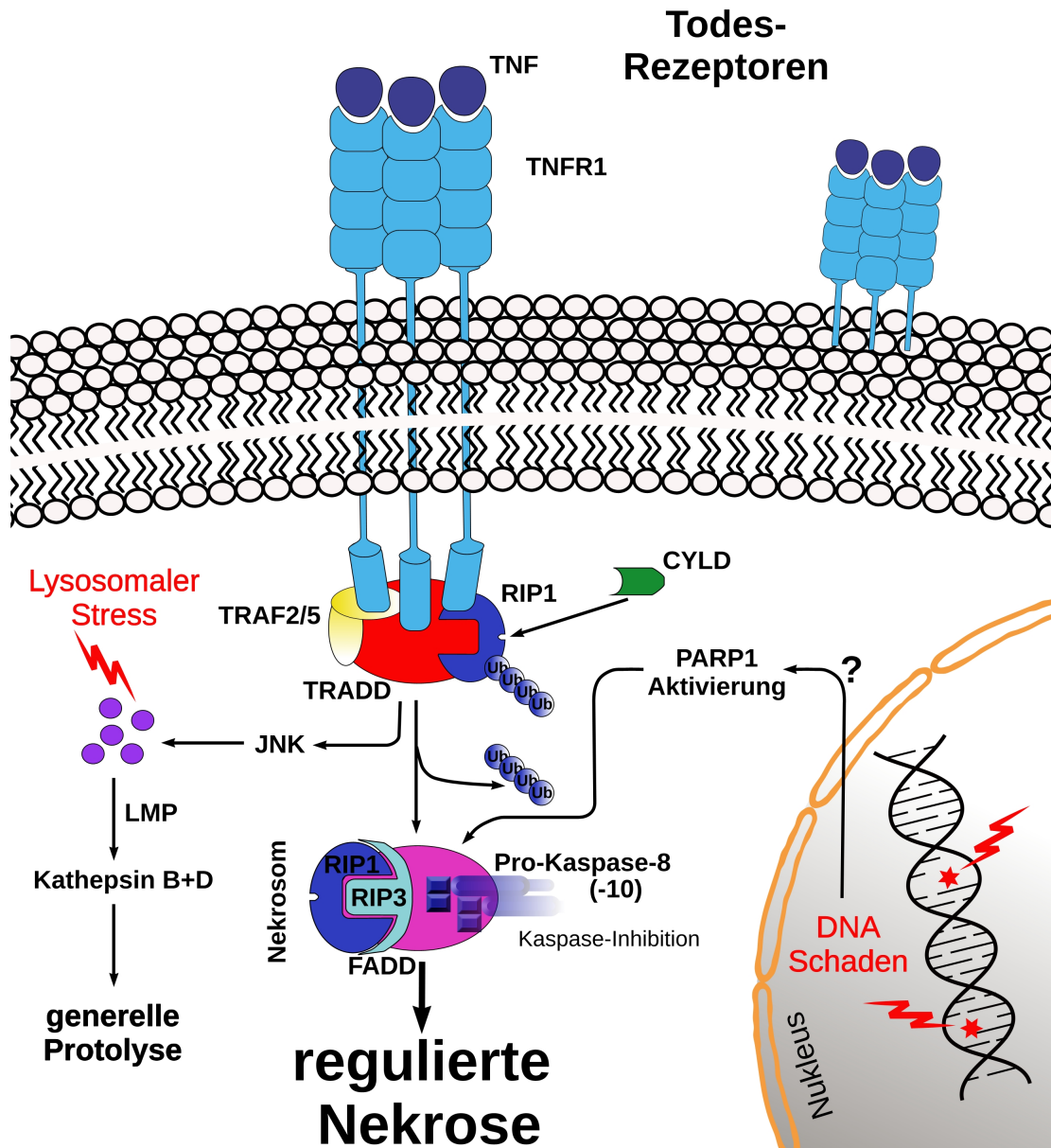


Abbildung 1.13: Schematische Darstellung der Nekrose. Die Bildung des Nekrosoms kann durch die Aktivierung des TNF-Rezeptors (mittig) oder durch die Aktivierung der PARP, z.B. durch DNA-Schäden (rechte Seite), induziert werden. Bei lysosomalen Stress kommt es durch LMP zur Ausschüttung von Kathepsin B und D in das Zytosol zur generellen Protolyse.

Aminosäuren und Fettsäuren, die von der Zelle wiederverwendet werden [Baehrecke (2005)]. Die Autophagie wird in Mikroautophagie, Chaperon-vermittelte Autophagie und Makroautophagie unterschieden [Patel u. a. (2013)].

Die Mikroautophagie beinhaltet die nicht-selektive direkte Umhüllung einzelner Zellkomponenten von den Lysosomen selbst. Bei der Chaperon-vermittelten Autophagie werden die abzubauenen Komponenten selektiv markiert, zu den Lysosomen geleitet und über ihre Membran ins Innere transportiert und degradiert. Der Prozess der Makroautophagie beginnt mit der Bildung einer Doppelmembran, die sich zu einem Autophagosom schließt. In das Autophagosom werden Teile des Zytoplasmas, Proteine und ganze Organellen eingeschlossen und nach dem Verschmelzen mit einem Lysosom degradiert. Dieser Prozess kann in weitere Unterklassen von Makroautophagie unterteilt werden, z.B. in die Mitophagie, bei der selektiv Mitochondrien abgebaut und recycelt werden [Tolkovsky (2009)]. Die Mitochondrien spielen eine entscheidende Rolle in der Energieproduktion, aber ebenso generieren sie ROS, das durchaus schädlich für die Zelle werden kann. Geschädigte Mitochondrien müssen in der Zelle effektiv entfernt werden, bevor sie den Zelltod induzieren. Dies erfolgt durch die Mitophagie [Klionsky u. a. (2014)].

Die Makroautophagie ist in dieser Arbeit die relevante Art der Autophagie und wird nachfolgend als Autophagie bezeichnet. Die Autophagie spielt neben der Apoptose eine wichtige Rolle bei der Bestimmung des Zellschicksals [Rodriguez-Rocha u. a. (2011)]. Der Prozess der Autophagie ist ein hochkonservierter Mechanismus in eukaryontischen Zellen, der durch eine Vielzahl von Faktoren induziert werden kann. Zu diesen Faktoren zählen u.a. der Mangel an Nährstoffen [Martinet u. a. (2006); Mizushima (2007)], oxidativer Stress [Klionsky und Emr (2000); Polager u. a. (2008)] und Schäden an der DNA [Bordin u. a. (2013); Gewirtz (2014)].

Die Autophagie wurde in den letzten zwei Dekaden intensiv erforscht. Bis heute sind mehr als 30 der Autophagie zugehörigen Proteine (Autophagy-related protein, Atg) in

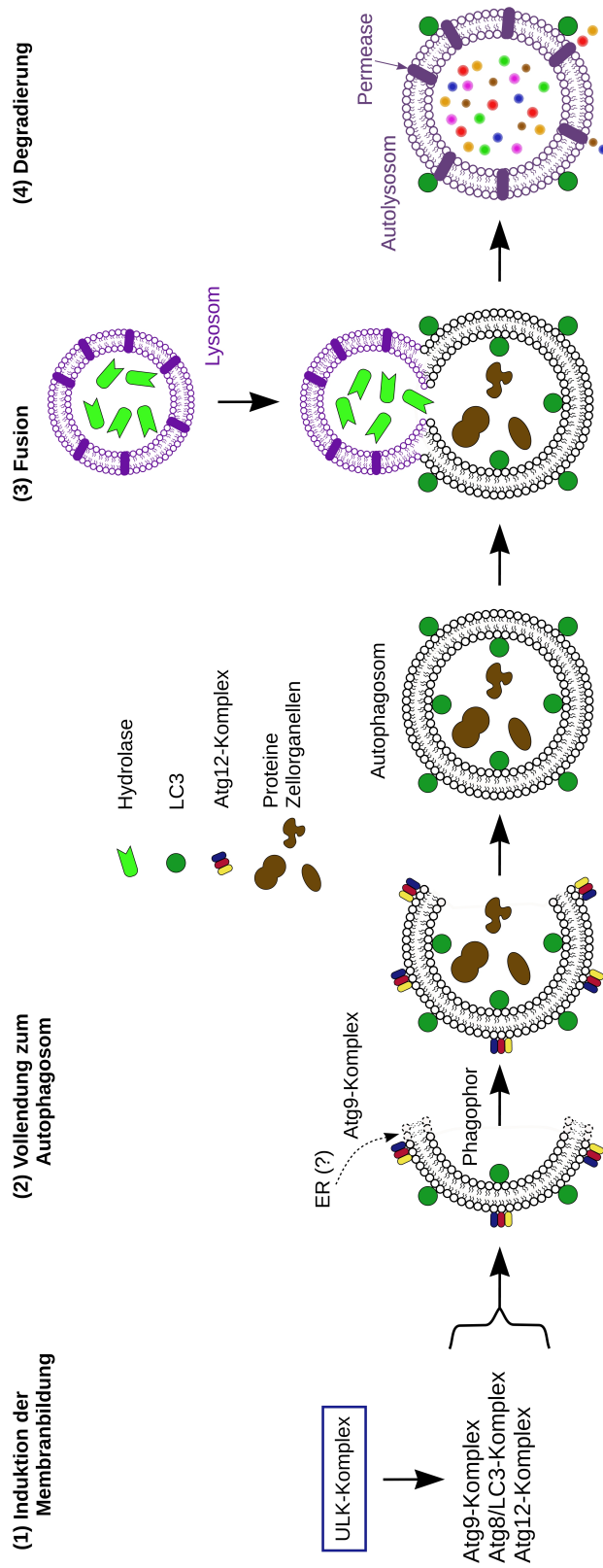


Abbildung 1.14: Schematische Darstellung der vier Hauptphasen der Autophagie. Essentiell für die Induktion der Membranbildung sind die Proteine des ULK-Komplexes und die Proteine der Komplexe Atg8, Atg9 und Atg12. Diese Membran kann de novo oder aus anderen membranartigen Strukturen wie z.B. dem ER entstehen. Nach Vollendung der Phagophore wird diese Autophagosom genannt. Sie umschließt die abzubauenden Zellbestandteile. Durch Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom entsteht das Autolysosom. Die Hydrolasen des Lysosoms degradieren die eingeschlossenen Zellbestandteile. Durch die in der Membran lokalisierten Permeasen werden die Abbauprodukte in das Zytoplasma der Zelle freigesetzt.

Hefen bekannt und die Orthologen der meisten dieser Proteine¹¹ sind auch in höheren Eukaryoten vertreten [Patel u. a. (2013); Jin und Klionsky (2014)]. Der Prozess der Autophagie wird in vier Phasen unterteilt. Er beginnt mit der (1) Induktion der Membranbildung und (2) Vollendung der Phagophore zum Autophagosom mit Einschluss der Zellkomponenten und Zytoplasma, folgend mit der (3) Bildung des Autophagolysosoms durch die Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom und abschließend mit der (4) Degradierung der eingeschlossenen Komponenten und Wiederfreisetzung der rezyklierten Zellbausteine [Maiuri u. a. (2007)]. Die Abbildung 1.14 gibt eine schematische Übersicht über diesen Ablauf der Autophagie mit den vier Phasen.

Zur Induktion und Bildung des Autophagosoms treten verschiedene Atg-Proteine und Atg-Proteinkomplexe in Interaktion. Zu den vier wichtigsten Atg-Proteinkomplexen gehören der Atg1/ULK¹²-Komplex, der Atg8/LC3¹³-Komplex, der Atg9- und der Atg12-Komplex [Feng u. a. (2014)]. Der Atg1/ULK-Komplex erfasst die Signale zur Autophagie-Induktion und reguliert die Autophagosombildung. Einer der bekanntesten und am besten untersuchten Signalwege erfolgt über ‘das Zielmolekül von Rapamycin’ (target of rapamycin, TOR) [MacIsaac u. a. (2006)]. Der Atg9-Komplex spielt eine wichtige Rolle bei der Lieferung der Membran für die wachsende Phagophore. Der Phosphatidylinositol-3- (PtdIns3-) Kinase-Komplex ist im Bildungsprozess der Phagophore beteiligt und rekrutiert weitere PtdIns3-bindende Proteine an die bildende Phagophore. Der Atg12-Komplex und der Atg8/LC3-Komplex spielen eine entscheidende Rolle bei der Erweiterung der Phagophore. Die genaue Quelle der ursprünglichen Autophagosommembran steht weiterhin in der Diskussion. Diese Membran kann *de novo* aus Bausteinen des Zytoplasmas oder anderen membranartigen Strukturen entstehen. Es gibt Hinweise, dass das Endoplasmatische Retikulum (ER) zur Bildung der Phagophore beiträgt [Axe u. a. (2008); Hayashi-Nishino u. a. (2009); Ylä-Anttila u. a. (2009)]. Aber auch Mitochondri-

¹¹Bei der Bezeichnung dieser Proteine in humanen Zellen wird daher meistens zuerst auf den Namen des homologen Proteins in Hefen hingewiesen und anschließend auf die alternative Bezeichnung.

¹²Unc-51 ähnliche Autophagie-aktivierte Kinase 1

¹³Mikrotubuli-assoziiertes Protein leichte Kette 3 (microtubule-associated protein light chain 3, LC3)

en [Hailey u. a. (2010)] und der Golgi-Apparat [Young u. a. (2006)], sowie die Plasmamembran [Ravikumar u. a. (2010)] werden als Quellen diskutiert. Mit Erweiterung der Phagophore werden ein Teil des Zytoplasmas und einige Zellkomponenten umschlossen. Das geschlossene Autophagosom bewegt sich an den Mikrotubuli der Zelle entlang und fusioniert unterstützt durch weitere Proteine mit den Lysosomen [Köchler u. a. (2006); Kimura u. a. (2008)]. Die Hydrolasen in den Lysosomen degradieren den Inhalt des Autolysosoms. Durch die Permease-Kanäle in der Membran werden die Abbauprodukte zur Wiederverwendung zurück ins Zytosol transportiert [Klionsky (2007)].

Das LC3 Protein, das essentiell für die Bildung des Autophagosoms ist [Mizushima u. a. (1998); Ichimura u. a. (2000)], ist ein wichtiger Marker zur Identifizierung autophagischer Vesikel [Mizushima (2007)]. Das Pro-LC3 (LC3-Vorläufer-Protein) wird durch das Atg4-Protein zu zytosolischem LC3-I gespalten. Durch die Proteine Atg3 und Atg7 wird an das LC3-I ein Phosphatidylethanolamin (PE) gebunden. Das modifizierte LC3 wird LC3-II genannt [Tanida u. a. (2004)]. LC3-II ist essentieller Bestandteil der Doppelmembran, sowohl auf der zytoplasmatischen als auch auf luminaler Seite. Auf der äußeren Seite kann das PE von dem LC3-II wieder abgespalten und das LC3 somit rezykliert werden. Das LC3 an der inneren Membran wird nach Fusion mit dem Lysosom abgebaut [Patel u. a. (2013)].

1.5.3 Seneszenz

Der Begriff Seneszenz stammt von dem lateinischen Wort ‘senex’ für hohes Alter oder Altern. In der allgemeinen Biologie beschreibt die Seneszenz Prozesse der Entwicklung und Reifung. Das Konzept der Seneszenz *in vitro* wurde erstmals durch Hayflick als irreversibler Wachstumsstillstand der Zellen nach längerer Zeit der Proliferation unter nicht physiologischen Bedingungen eingeführt [Hayflick (1965)].

Heute wird der Begriff im Allgemeinen für den irreversiblen proliferativen Arrest der Zellen benutzt, der durch verschiedene Faktoren ausgelöst wird. Unterschieden wer-

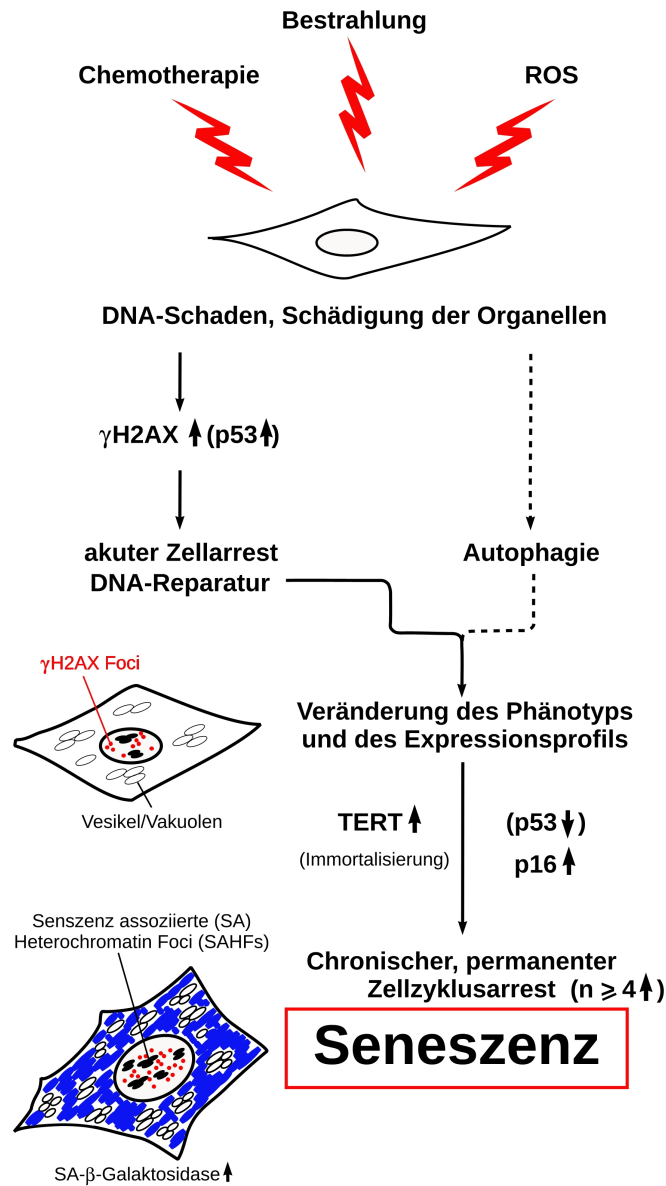


Abbildung 1.15: Schematische Darstellung der Seneszenz. Der Prozess wird durch Schäden der DNA und der Organellen induziert. Anschließend folgt die DDR mit einem temporären Replikationsstopp und es kommt zur Veränderung des Phänotyps der Zelle. Werden die Signale, die den Zellzyklus verhindern, nicht wieder aufgehoben, werden diese fixiert und der seneszente Zustand wird permanent. Die seneszente Zelle zeigt eine gesteigerte SA-β-Galaktosidase-Aktivität und einen permanenten Zellzyklusarrest z.B. mit einem polyploiden Chromosomensatz von mehr als $4n$.

den die Telomer-abhängige replikative Seneszenz (Verkürzung der Telomere bei jeder Replikation) und die Telomer-unabhängige replikative Seneszenz. Letztere kann durch verschiedene Stressfaktoren (Stress-induzierte Seneszenz, hier im weiteren als Seneszenz bezeichnet) [Itahana u. a. (2003); Herbig u. a. (2004)] oder durch Onkogene (onkogen induzierte Seneszenz) [Nardella u. a. (2011)] ausgelöst werden. Beide Auslöser haben die Induktion der DDR gemeinsam. Sie ist sowohl für die Initiation als auch den Fortbestand des Seneszenzprozesses substantiell [d'Adda di Fagagna (2008)]. Zu den bekanntesten Stressfaktoren gehören oxidativer Stress [Serrano u. a. (1997); Finkel und Holbrook (2000)] und DNA-Schädigung [Leonardo u. a. (1994); Robles und Adami (1998)], u.a. durch chemotherapeutische Wirkstoffe [Shay und Roninson (2004)]. Somit ist das DDR-Protein γ H2AX ein wichtiger Marker für die Seneszenz [Gorospe und Abdelmohsen (2011)].

Unabhängig vom Auslöser der Seneszenz zeigen die seneszenten Zellen neben dem Zellzyklusarrest eine gesteigerte β -Galaktosidase-Aktivität. Beides sind häufig verwendete und zusammen aussagekräftige Marker der Seneszenz [Dimri u. a. (1995); Cristofalo u. a. (2004); Herbig u. a. (2006)]. Je nach Zelltyp und Auslöser der Seneszenz zeigen die seneszenten Zellen häufig eine charakteristische Morphologie. Die Zellen sind meist flach und stark vergrößert und können im Zytoplasma Autophagosomen ansammeln [Gorospe und Abdelmohsen (2011)].

Es gibt drei Hauptphasen bei der Entwicklung von zellulärer Seneszenz [Akbar und Henson (2011)]. Die erste Phase ist die Induktion des Prozesses durch Telomer-abhängige oder Telomer-unabhängige Mechanismen. Dem folgt die DDR mit einem temporären Replikationsstop (Phase 2). Wenn die DNA-Schäden nicht repariert werden, folgt Phase 3, in der die Signale, die den Zellzyklus verhindern, fixiert werden und der seneszente Zustand permanent wird [Campisi und d'Adda di Fagagna (2007); d'Adda di Fagagna (2008)]. Eine schematische Darstellung der Seneszenz ist in Abb. 1.15 gezeigt.

1.6 Zielsetzung

Wie in Kapitel 1.1 diskutiert wurde, ist die Behandlung von Glioblastomen mit starken Beeinträchtigungen für die Patienten verbunden und eine Heilung zur Zeit nicht möglich. Außerdem bilden die Glioblastomzellen Resistenzen gegenüber der klassischen Krebstherapie (Chemotherapie und Bestrahlung) aus, sodass die Wirkung dieser klassischen Methoden eingeschränkt ist. Der Anti-Malaria-Wirkstoff Artesunat verursacht oxidative Schäden an der DNA von Tumorzellen und hemmt die Zellteilung der Krebszellen, weswegen Artesunat als ein vielversprechender Wirkstoff für neue Tumorthera-
pien angesehen werden kann. In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss von Artesunat auf die bestehende Therapie von Glioblastomen anhand von drei verschiedenen Zelllinien, LN-229, A172 und U87 MG, untersucht werden.

Temozolomid und Bestrahlung induzieren verschiedene DNA-Schäden und wirken somit genotoxisch auf die Tumorzellen ein. Nach Behandlung mit Artesunat konnte sowohl eine zytotoxische als auch eine genotoxische Wirkung bei Glioblastomzelllinien nachgewiesen werden. Daher ist es naheliegend, die Arbeitshypothese aufzustellen, dass die Kombination von Artesunat mit Temozolomid bzw. Bestrahlung die genotoxische Wirkung der entsprechenden Einzelbehandlung verstärkt. Auf Grund einer Verbesserung der kombinierten Wirkung gegenüber den Einzelbehandlungen könnte es möglich sein, die Dosen der Einzeltherapien zu reduzieren. Somit besteht die Möglichkeit, die Überlebenszeit der Patienten zu verlängern und die durchaus starken Nebenwirkungen der Krebstherapie zu senken.

Dazu sollen für die drei erwähnten Zelllinien zunächst *in vitro* die Toxizität der Einzelbehandlung sowie in der Kombination mit Artesunat untersucht werden. Dabei sollen die Dosen der Wirkstoffe angepasst und ein optimales Behandlungsschema etabliert werden. Nach erfolgreichen *in vitro*-Studien soll das neue Behandlungsschema *in vivo* untersucht werden. In verschiedenen Mausmodellen sollen dabei Ergebnisse in Bezug auf Tumorwachstum und Überlebensrate erzielt werden.

Ist tatsächlich eine gesteigerte Toxizität festzustellen, sollen die Gründe dafür untersucht werden. Dabei ist zunächst die Wirkungsweise von Artesunat auf die Chemotherapie von großer Bedeutung. Darüber hinaus spielen die involvierten Mechanismen in der Zelle ebenfalls eine wichtige Rolle. Ein tieferes Verständnis der involvierten Abläufe kann sowohl für die Therapie mit Artesunat als auch für künftige Therapieformen von grundlegender Bedeutung sein.

Somit werden in dieser Arbeit unter anderem folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Worauf ist die Steigerung der toxischen Wirkung in der Kombination der klassischen Therapie mit Artesunat zurückzuführen?
- Wie wirkt Artesunat auf die Chemotherapie ein?
- Welche Zellmechanismen spielen bei den Resistenzen eine Rolle und wie wirkt sich Artesunat darauf aus bzw. welche Mechanismen löst die Behandlung mit Artesunat aus?
- Wie unterscheiden sich die drei untersuchten Zelllinien in Bezug auf das kombinierte Behandlungsschema?
- Lassen sich die *in vitro*-Modelle auf Mausmodelle übertragen?
- Wie sehen bei den *in vivo*-Studien die Ergebnisse in Bezug auf das Tumorstadium und die Überlebensrate aus?

Kapitel 2

Material

2.1 Zelllinien

Humane Glioblastomzelllinien:

LN-229 DMEM + 10 % FCS, AG Weller, Tübingen, Deutschland

A172 DMEM + 10 % FCS, AG Weller, Tübingen, Deutschland

U87MG DMEM + 10 % FCS, Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Deutschland

2.2 Medien und Zellkulturkomponenten

10 x Trypsin-EDTA (0,5 %, 0,2 % in D-PBS) PAA, Pasching, Österreich

Dimethylsulfoxid (DMSO), Roth, Karlsruhe, Deutschland

DMEM, PAA/GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien

DMEM without Phenolred, PAA/GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien

Fetales Kälberserum (FCS) PAA, Pasching, Österreich

2.3 Versuchstiere

NMRI Nu/Nu Mäuse, Charles River, Sulzfeld, Deutschland

BALB/C Nu/Nu Mäuse, Charles River, Sulzfeld, Deutschland

BALB/C Nu/Nu Mäuse, Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE), Mainz, Deutschland

2.4 Versuchstier-Material

Federschere 8 cm spitz Fine, Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland

Feeding Needle 20 Gauge 30 mm, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland

Ear Punch 11,5 cm, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland

Universal-Kassetten, Engelbrecht, Edermünde, Deutschland

Einbetttschälchen 24x24x5 mm, Engelbrecht, Edermünde, Deutschland

Mikrochirurgische Schere, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland

Stereotaktisches Gerät, Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim-Ober Beerbach, Deutschland

Röhre mit Verschluss 114x44 mm, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Dotarem 0,5 mmol/ml, Guerbet, Sulzbach, Deutschland

MRT 1,5 Tesla Siemens, Erlangen, Deutschland

2.5 DNA-Oligonukleotide

Die Primersequenzen von Invitrogen Life Science sind in Tab. 2.1 zusammengestellt.

Name	Vorwärts	Rückwärts
p21-CIP	TGTGGACCTGTCACTGTCTTG	AAATCTGTCATGCTGGTCTGC
T53BP1	AAGAGAAGGAAGAAGATACTT	AAACCCAACCTGTGATGAG
p14-TA	CCCTCGTGCTGATGCTACTG	CATCATGACCTGGTCTTCTAGGAA
BCL-2	CCTGTGGATGACTGAGTACC	GAGACAGCCAGGAGAAATCA
BCL-XL	AAGCGTAGACAAGGAGAT	TAGGTGGTCATTCAGGTAA
MDM2	ATCTTGATGCGTTGTAA	AGGCTATAATCTTCTGAGTC
Noxa	GCTGGAAGTCGAGTGTGCTA	CCTGAGCAGAAGAGTTTGGGA
mTOR	CGCTGTCATCCCTTTATCG	ATGCTCAAACACCTCCACC
BECN1	GGATGGAAGGGTCTAAGA	CTGTGGTAAGTAATGGAG
cJUN	ATGGAAACGACCTTCTATG	TCTTGGGGTACTGTAGC
APAF1	TGTAGTATCTTTAATTGGTG	AAGACGAAGATTTCTTA
FASR	TTATCTGATGTTGACTTGAGTAA	GGCTTCATTGACACCATT
TERT	CTGGCTGATGAGTGTGTA	CAAGTGCTGTCTGATTCC
XIAP	CTGAGCCAGATCAAAGTATG	CCGAAGAGAAACCACATTT
IL6	TGGATTCAATGAGGAGACTTG	CTCACTACTCTCAAATCTGTTCT
ABH	AACCTAATGTATGTAACCT	TAGTCGCTTCTTTATACC

Tabelle 2.1: *Primersequenzen von Invitrogen Life Science.*

2.6 Primärantikörper

Anti-CHK2 Rabbit pAb, Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA
Anti-pCHK2 (T68) Rabbit mAb, Epitomics, Burlingame, Kalifornien, USA
Anti-ERK2 Rabbit pAb, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Anti-PARP1 Mouse mAb, BD Transduction Laboratories, New Jersey, USA
Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139) Mouse mAb, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Anti-LAMP2 Mouse mAb, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Anti-Nestin Rabbit mAb, Abcam, Cambridge, Großbritannien
Anti-LC3 Rabbit mAb, Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Anti-LC3 Mouse mAb, Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA
Anti-Caspase 1 Rabbit mAb, Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA
Anti-Caspase 8 Rabbit mAb, Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA
Anti-cleaved-Caspase 3 Rabbit mAb, Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA
Anti-cleaved-Caspase 7 Rabbit mAb, Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA
Anti-cleaved-Caspase 9 Rabbit mAb, Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA
Anti-Cyclin D1 Mouse pAb, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Anti-Cyclin B1 Mouse pAb, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Anti-p53 Mouse pAb, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Anti-phospho-JNK Mouse pAb, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Anti-IRE Rabbit mAb, Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA

2.7 Sekundärantikörper

Irdye 800CW Donkey Anti-Mouse IgG
Infrarot-Farbstoff-Konjugat
1 : 10.000
LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland

Irdye 800CW Donkey Anti-Rabbit IgG

Infrarot-Farbstoff-Konjugat

1 : 10.000

LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland

Alexa Fluor 488 Goat-Anti-Mouse IgG (H+L)

Fluorophor-Konjugat

1 : 1.000

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Alexa Fluor 546 Goat-Anti-Mouse IgG (H+L)

Fluorophor-Konjugat

1 : 1.000

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Alexa Fluor 647 Goat-Anti-Rabbit IgG (H+L)

Fluorophor-Konjugat

1 : 1.000

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.8 Chemikalien

1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]-Oktan (DABCO), Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2-(4-[2-Hydroxyethyl]-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES), Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI), Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Ammoniumpersulfat (APS), Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

β -Mercaptoethanol, Roth, Karlsruhe, Deutschland

Bromphenol Blau Natriumsalz, SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Coomassie Brillant-Blau G250, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Entwicklungs- und Fixier-Lösung, Kodak, Rochester, New York, USA
Ethidiumbromid-Lösung (1%, 10 mg/ml), Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethyldiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA), Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formamid, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Harnstoff, Roth, Karlsruhe, Deutschland
NAD, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS), Roth, Karlsruhe, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED), Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nonylphenylpolyethylen-Glykol (NP-40), Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Nocodazole, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ponceau S, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Propidiumiodid (PI), Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Rotiphorese Gel 40 (19:1), Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiszint eco plus, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris [Hydroxymethyl]-Aminomethan (Tris), Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X100, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween-20, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylen Cyanol FF, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Xylol, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2.9 Inhibitoren und Aktivatoren

Dithiothreitol (DTT), Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4), Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Pepstatin, Merck, Darmstadt, Deutschland

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Tumor Necrosis Factor- α (TNF), Sigma, Missouri, USA

3-Methyl-Adenin (3-MA), Thermo Scientific, Massachusetts, USA

Bafilomycin A1 (BafA1), Sigma, Missouri, USA

Ammoniak (MH_3), Sigma, Missouri, USA

Staurosporin (Stauro), Sigma, Missouri, USA

Chloroquinn (CQ), Sigma, Missouri, USA

Rapamycin (Rap), CYTO-ID^RAutophagy Detection Kit Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland

General Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK (ZVAD-fmk), R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland

Necrostatin-1 (NST), Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA

MG132, Sigma, Missouri, USA

2.10 Biologische und chemische Substanzen

Artesunat, Dafra Pharma, Turnhout, Belgien

Desoxinukleotid-Mix (dNTP), New England Bio Labs, Frankfurt am Main, Deutschland

5-dodecanoylaminofluorescein di-beta-D-galactopyranoside (C_{12} FDG), Invitrogen, Massachusetts, USA

Eosin-Y, Dako Agilent Technologies, Hamburg, Deutschland

Glycin, Roth, Karlsruhe, Deutschland

Hämatoxylin, Dako Agilent Technologies, Hamburg, Deutschland

Forene 100% Isofluran, Abott, Wiesbaden, Deutschland

Magermilch (Pulver), Frema Reform, Granovita, Reformhaus, Mainz, Deutschland

Mini-Protean TGX Precast Gels, Bio-Rad, München, Deutschland

Monodansylcadaverin (MDC), Sigma, Missouri, USA

Mounting, Medium Merck, Darmstadt, Deutschland

PeqGOLD Protein-Marker II, PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
PeqGOLD Protein-Marker IV, PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
100 bp DNA-Leiter, New England Bio Labs, Frankfurt am Main, Deutschland
Rinderserumalbumin, Fraktion V (BSA), Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Load 1, Proteinauftragspuffer, reduzierend Roth, Karlsruhe, Deutschland
Temozolomid, Schering-Plough, Kenilworth, New Jersey, USA
tert-Butylhydroperoxid (tBOOH), Sigma, Missouri, USA
Target Retrieval Lösung, Dako Agilent Technologies, Hamburg, Deutschland
VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, USA
Verdünnungsmedium, Dako Agilent Technologies, Hamburg, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30% (H₂O₂), Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.11 Kits und Assays

CYTO-ID^RAutophagy Detection Kit, Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland
FITC-Annexin V, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
H₂DCFDA Farbstoff, Thermo Scientific, Massachusetts, USA
LysoTracker Green DND-26, Thermo Scientific, Massachusetts, USA
MitoTracker Orange CMTMRos, Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Magic Red Caspase 3/7 Detection Kit, ImmunoChemistry Technologies, Bloomington, USA
Magic Red Cathepsin B/L Detection Kit, ImmunoChemistry Technologies, Bloomington, USA
NucleoSpin RNA Kit, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
SensiMix SYBR Hi-ROX Kit, Bioline, Aschaffenburg, Deutschland
SuperPictureTM Polymer Detection Kit, Thermo Scientific, Massachusetts, USA
VersoTM cDNA Synthese Kit, Thermo Scientific, Massachusetts, USA

2.12 Puffer und Lösungen

Annexin V-Bindepuffer (Annexin V/PI-Doppelfärbung)

10 mM HEPES
140 mM NaCl
2,5 mM CaCl₂
0,1 % BSA
pH 7,4

Antifade-Medium (Immunfluoreszenz)

48,75 % Glycerin
48,75 % PBS
2,5 % DABCO
pH 8,6

Blocklösung (Immunfluoreszenz)

5 % Magermilch
137 mM NaCl
2,7 mM KCl
10 mM Na₂HPO₄
1,76 mM KH₂PO₄
0,1 % Tween-20
pH 7,4

Blocklösung (Westernblot-Verfahren)

5 % Magermilch
20 mM Tris
137 mM NaCl
0,1 % Tween-20
46
pH 7,6

Bradford-Lösung (Proteinkonzentrationsbestimmung)

8,5 % Phosphorsäure
4,75 % Ethanol
0,01 % Coomassie Brillant-Blau G250
Lösung filtern

Einfriermedium (Zellkultur)

90 % Zellkulturmedium (DMEM mit
10 % FCS)
10 % DMSO

Elektrophorese-Puffer (Westernblot-Verfahren)

50 mM Tris
384 mM Glycin
0,1 % SDS

Färbelösung (Koloniebildungsassay)

1,25 % Giemsa
0,125 % Kristallviolett

Fixierlösung (Koloniebildungsassay)

1 Volumenanteil Essigsäure
1 Volumenanteil Methanol
8 Volumenanteile Wasser

**PBS-Tween-20 (PBST)
(Immunfluoreszenz)**

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄1,76 mM KH₂PO₄

0,1 % Tween-20

pH 7,4

**Phosphat-gepufferte Salzlösung
(PBS)**

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄1,76 mM KH₂PO₄

pH 7,4

**Polyacrylamid-Sequenziergel
(BER-Aktivitätstest)**

50 % Rotiphorese Gel 40

7 M Harnstoff

90 mM Tris

90 mM Borsäure

1,25 mM EDTA

0,035 % APS

0,0175 % TEMED

**Ponceau S-Lösung
(Westernblot-Verfahren)**

0,1 % Ponceau S

5 % CH₂COOH**Protein-Ladepuffer
(Westernblot-Verfahren)**

50 mM Tris/HCl

2 % SDS

10 % Glycerin

0,02 % Bromphenol-Blau

1 % β-Mercaptoethanol

**Lysispuffer A für Kernextrakte
(Westernblot-Verfahren)**

10 mM Tris-HCl [pH 7,4]

10 mM NaCl

3 mM MgCl₂

1 mM DDT

2 mM PMSF

**Lysispuffer B für Kernextrakte
(Westernblot-Verfahren)**

20 mM Hepes-KOH [pH 7,4]

0,6 M KCl

0,2 mM EDTA

0,5 mM PMSF

10 mM DDT

**Lowry I-Lösung
(Proteinkonzentrationsbestimmung)**2 % Na₂CO₃

0,1 M NaOH

**Lowry II-Lösung
(Proteinkonzentrationsbestimmung)**

2 % Na₂CO₃
0,1 M NaOH
0,0002 % Na-K-Tartrat
0,0001 % CuSO₄

**Protein-Transferpuffer
(Westernblot-Verfahren)**

50 mM Tris
384 mM Glycin
20 % Methanol

**SDS-Sammelgel-Lösung
(Westernblot-Verfahren)**

0,76 ml Rotiphorese Gel 40
0,76 ml 1 M Tris/HCl, pH 6,8
4,4 ml dH₂O
60 µl 10 % SDS
60 µl 10 % APS
6 µl TEMED

**SDS-Trenngel-Lösung
(Westernblot-Verfahren)**

(5 %/7,5 %/10 %/12,5 %)
1,5 ml/2,3 ml/3 ml/3,6 ml Rotiphorese
Gel 40
3 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
7,2 ml/6,5 ml/5,7 ml/5,1 ml
dH₂O

120 µl 10 % SDS
60 µl 10 % APS
6 µl TEMED

**Sonifizierungspuffer
(Westernblot-Verfahren)**

20 mM Tris(hydroxymethyl)-amino-
methan [Tris] - HCl
1 mM EDTA
1 mM β-Mercaptoethanol
5% Glycerin
100 µM Phenylmethylsulfonylfluorid
[PMSF]
pH = 8,5

**Tris-Borat-EDTA-Puffer
(TBE-Puffer)**

90 mM Tris
90 mM Borsäure
1,25 mM EDTA

**Tris-EDTA-Puffer
(TE-Puffer)**

10 mM Tris/HCl

1 mM EDTA

pH 8

**Tris-gepufferter Salzlösung-
Tween-20 (TBST)
(Westernblot-Verfahren)**

20 mM Tris

137 mM NaCl

0,1 % Tween-20

pH 7,6

**Zellysepuffer
(Proteinextraktherstellung
Westernblot-Verfahren)**

20 mM Tris/HCl

1 mM EDTA

1 mM β -Mercaptoethanol

5 % Glycerin

10 mM DTT

500 μ M PMSF1 μ M Na_3VO_4

pH 8,5

2.13 Software

Cell A, Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Deutschland

CellQuest Pro, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

GraphPad Prism v5.0, GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA

ImageQuant v5.2, Molecular Dynamics, Sunnyvale, Kalifornien, USA

JabRef Reference Manager v2.7, <http://jabref.sourceforge.net>

LibreOffice v5.0.1, The Document Foundation, Kaufbeuren, Deutschland

MS Office v2003, Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland

Multi-Analyst v1.0.1, Bio-Rad, München, Deutschland

Odyssey v3.0, LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland

Photoshop v7.0, Adobe Systems, München, Deutschland

Scanner Control v4, Molecular Dynamics, Sunnyvale, Kalifornien, USA

Wine v1.3.37, <http://winehq.org>WinMDI v2.9, J. Trotter, <http://facs.scripps.edu/software.html>

2.14 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien, die in dieser Studie Anwendung fanden, wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Verbrauchsmaterialien, die in dieser Studie Anwendung fanden, wurden von den Firmen Bio-Rad (München, Deutschland), Diagonal (Münster, Deutschland), Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland), GE Healthcare (München, Deutschland), B. Braun (Melsungen, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland) und Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

2.15 Geräte

[¹³⁷Cs]-Quelle Typ Gammacell 2000, Molsgaard Medical, Heorsholm, Dänemark

Analysenwaage Typ TE4101, Sartorius, Göttingen, Deutschland

Analysenwaage Typ A200S, Sartorius, Göttingen, Deutschland

Binokular Typ Wilovert A, Hund, Wetzlar, Deutschland

Binokular Typ Telaval 31, Carl Zeiss, Jena, Deutschland

Brutschrank Typ Hera Cell 150, Heraeus, Hanau, Deutschland

Durchflusszytometer Typ FACS Calibur BD, Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Durchflusszytometer Typ FACS Canto BD, Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Einfrierbox Typ Cryo 1°C Freezing Container, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Gelelektrophorese-Kammer Typ 41-2025, PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland

Gelelektrophorese-Kammer Typ Wide Mini-Sub Cell, Bio-Rad, München, Deutschland

Gefrierschrank (-80°C) Typ Forma 905, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Heizblock Typ Thermostat 5320, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Heizkammer für Schüttelinkubator Typ Certomat H, B. Braun, Melsungen, Deutschland

Infrarot-Abbildungsanlage Typ Odyssey LI-COR, Biosciences, Bad Homburg, Deutschland

Kombipipette Typ Multipette plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Mikroskop Typ Microphot-FXA, Nikon, Düsseldorf, Deutschland

Mikroskop Typ Axiovert 35, Carl Zeiss, Jena, Deutschland

Mikrozentrifuge Typ DW41, Qualitron, Korea

N2-Zelltank Typ Locator 6+, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

NanoDrop, Agilent Technologies, Hamburg, Deutschland

pH-Meter Typ pH525, WTW, Weilheim, Deutschland

Photometer Typ Multiscan EX, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Photometer Typ Sunrise RC TS/TW, Tecan, Crailsheim, Deutschland

Pipetten Typ Research 0,5-2,5 μ l, 1-10 μ l, 2-20 μ l, 10-100 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Pipettierhilfe Typ Pipetboy acu, IBS, Fernwald, Deutschland

Proteintransferkammer Typ Trans-Blot Cell, Bio-Rad, München, Deutschland

Roller Mixer Stuart SRT 6, Stuart, Staffordshire, Großbritannien

Schüttelinkubator Typ Certomat R, B. Braun, Melsungen Deutschland

SDS-PAGE-System Typ Mini-Protean 3 Cell, Bio-Rad, München, Deutschland

Sequenziergel-System Typ Sequi-Gen GT, Bio-Rad, München, Deutschland

Spannungsgerät Typ Power Pac 200, Bio-Rad, München, Deutschland

Spannungsgerät Typ Power Pac 300, Bio-Rad, München, Deutschland

Spannungsgerät Typ 200/2.0 Power Supply, Bio-Rad, München, Deutschland

Spannungsgerät Typ 3000Xi, Bio-Rad, München, Deutschland

Spektrophotometer Typ Nanodrop ND-1000, PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland

Stereotaktisches Gerät, Leihgabe AG Ella Kim Neurochirurgie, Mainz, Deutschland

Sterilbank Typ Hera Safe, Heraeus, Hanau, Deutschland

Überkopfschüttler Typ Eigenbau, Werkstatt, Universitätsmedizin Mainz, Deutschland

Ultraschallgerät Typ Sonifier Cell Disruptor B15, Branson Ultraschall, Dietzenbach, Deutschland

Vakuumpumpe Typ N022 AN.18, KNF Neuberger, Freiburg, Deutschland

Vortexer Typ Vortex Genie 2, Bender & Hobein, Gera, Deutschland

Wasserbad Typ 3044, Köttermann, Uetze Hänigsen, Deutschland

Wasserbad Typ 1002, GFL, Burgwedel, Deutschland

Wippschüttler Typ Certomat TC2, B. Braun, Melsungen, Deutschland

Zählkammer Typ Neubauer, Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland

Zellschaber, Deutsch & Neumann, Berlin, Deutschland

Zentrifuge Typ Centrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Zentrifuge Typ Megafuge 1.0R, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Zentrifuge Typ Megafuge 1.0, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Zentrifuge Typ Heraeus Pico 17 Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Zentrifuge Typ Sorvall RC-5, Du Pont, Neu Isenburg, Deutschland

Kapitel 3

Methoden

Der Methodenteil beinhaltet die Beschreibung der Kultivierung der Zellen, der Behandlung und der Methoden der einzelnen Analysen, sowie das Methodenspektrum zu den *in vivo*-Versuchen. Die Methoden sind in sechs übergeordneten Methodengruppen sortiert. Diese setzen sich aus der Zellkultur, den Untersuchungen am Durchflusszytometer, der Protein- und Genexpression, den Immunfluoreszenz-Färbungen, die am Mikroskop untersucht wurden, und den Methoden für die *in vivo*-Versuche zusammen.

3.1 Zellkultur

Die zu untersuchenden Zelllinien wurden über die Zeit der Versuche steril und kontrolliert kultiviert. Für die entsprechenden Versuche wurden die Zellen ausgesät, behandelt und analysiert. Um die Zellen in Kultur zu halten, mussten diese regelmäßig passagiert, neu in Kultur genommen und im flüssigen Stickstoff gelagert werden.

3.1.1 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien wurde in dem entsprechenden Nährmedium (siehe Kapitel 2.1) in Plastikzellkulturflaschen bei 37° C in wasserdampfgesättigter

Atmosphäre mit 7 % CO₂ durchgeführt. Die Zelllinien wurden drei mal wöchentlich passagiert. Dafür wurden die zu 80 % konfluenten Zellen mit auf 37° C vorgewärmten PBS gewaschen und mit ebenfalls auf 37° C vorgewärmten Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit frischem auf 37° C vorgewärmten Medium vereinzelt und die Zelldichte wurde mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden die entsprechenden Zellzahlen in frischem Medium aufgenommen, passagiert oder für die anstehenden Versuche ausgesät.

Zur Herstellung des in Stickstoff gelagerten Zellvorrats (Kryobank) wurden die Zellen im exponentiellen Wachstum geerntet, in PBS aufgenommen und 5 min bei 1500 Upm abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen in Einfriermedium aufgenommen, in ein Kryoröhrchen überführt und in der dafür vorgesehenen Einfrierbox bei -80° C eingefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen der Zellen aus dem Stickstoff-Vorrat wurden die Kryoröhrchen dem Stickstoff-Tank entnommen und das Medium am Rand des Kryoröhrchens im Wasserbad aufgetaut. Dann wurde die gesamte Zellsuspension in frisches vorgewärmtes Medium überführt, resuspendiert und 5 min bei 1500 Upm abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in frischem, angewärmtem Medium erneut ausgesät.

Nach erstem konfluenten Wachstum wurde 1 ml Medium für den Mykoplasmen-Test abgenommen, dieser wurde in regelmäßigen Abständen (4-6 Wochen) wiederholt. Nach drei Monaten wurden die passagierten Zellen verworfen und ein neues Aliquot aus dem Stickstoff-Vorrat neu in Kultur genommen.

3.1.2 Behandlung der Zellen

Die Behandlung der Zellen erfolgte durch direkte Zugabe des spezifischen Volumens der Stammlösung oder einer Vorverdünnung des Wirkstoffes zum Zellkulturmedium. Aufgrund der geringen Stabilitäten und der damit verbundenen kurzen Halbwertszeiten wurde bei der Behandlung mit TMZ und ART eine Dauerbehandlung durchgeführt und

auf einen Mediumwechsel verzichtet. Als Stammlösung wurde Artesunat (100 mg/ml) in DMSO gelöst. Die Arbeitslösung (2 mg/ml) wurde entsprechend in PBS verdünnt. Sowohl Stammlösung als auch Arbeitslösung von ART wurden bei -20°C gelagert. Die Stammlösung von TMZ (35mM) wurde in DMSO angesetzt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Unmittelbar vor Einsatz wurde die Stammlösung von TMZ im entsprechendem Zellmedium verdünnt. Bei einigen Hemmstoffen wurde aufgrund der abfallenden Aktivität und der Dauer der Experimente die Behandlung mit dem Hemmstoff 48 bis 72 Stunden nach Erstbehandlung wiederholt, hier wurden die Angaben nach Hersteller befolgt.

Alle anderen Schalen, die nicht mit dem entsprechenden Wirkstoff behandelt wurden, erhielten das entsprechende Volumen der Stammlösungen oder Vorverdünnungen ohne den entsprechenden Wirkstoff.

Die Bestrahlung der Zellkulturen mit IR erfolgte an der $[^{137}\text{Cs}]$ -Strahlungsquelle des Institutsgebäudes. Zellkulturschalen mit Zellen, die nicht bestrahlt wurden, wurden bis zur Strahlenquelle mitgeführt.

3.1.3 Verdopplungszeit und Aussaatzahlen

Zur Ermittlung der Verdopplungszeiten der Zelllinien wurden jeweils 5×10^4 Zellen in 6 cm-Schalen ausgesät, im Intervall von 24 Std. geerntet und die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die erste Zellzahlbestimmung 24 Stunden nach Aussaat war der Beginn der Messreihe ($t = 0$ Stunden), da sonst die Anwachseffizienz der Zellen die Werte zur Ermittlung der Verdopplungszeit verfälscht hätte. Mittels der GraphPad Prism v5.0 Software wurden die Verdopplungszeiten der verwendeten Zelllinien berechnet.

Zur Ermittlung der Aussaatzahlen der Zelllinien für die Kombinationsbehandlung wurden jeweils bis zu fünf Zellzahlen pro Behandlung pro Zelllinie in 6 cm-Schalen ausgesät und vor der zweiten Behandlungseinheit (ART-Behandlung, z.B. 72 Stunden nach

TMZ-Behandlung) geerntet und die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Mittels der GraphPad Prism v5.0 Software wurden wiederum die entsprechenden Zellzahlen der verwendeten Zelllinien berechnet.

3.1.4 Koloniebildungsassay

Die Zellen wurden geerntet und in entsprechenden Zellzahlen (200 bis 3.000 Zellen) in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät. Die Zellzahlen wurden so gewählt, dass auch nach der Behandlung noch genügend Zellen zur Koloniebildung überlebten. Nachdem die Zellen sich am Boden abgesetzt hatten, wurden diese nach dem Behandlungsschema in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Nach einer Dauer von 10 bis 15 Tagen wurde das Medium entfernt und die Zellen auf den Platten mit PBS vorsichtig gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit der Fixierlösung für 30 Minuten fixiert. Die Kolonien, bestehend aus mindestens 50 Zellen, wurden mit Färbelösung für 15 Minuten angefärbt. Die Überlebensrate wurde unter Berücksichtigung der Koloniebildungseffizienz relativ zur unbehandelten Kontrolle berechnet und in der Kombinationsbehandlung als Rohdaten und normiert dargestellt.

3.2 Durchflusszytometrische Analysen

Am Durchflusszytometer wurden der Zellzyklus und Zelltod, die ROS-Messung, die Autophagie und Seneszenz durchgeführt, sowie die Aktivität der Kaspasen und Katepsine gemessen.

3.2.1 PI-Färbung und Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie

In der Zellzyklusanalyse wurde der in den Phasen unterschiedliche DNA-Gehalt der Zellen genutzt. Unter Verwendung von Propidiumjodid (PI), das in Nukleinsäuren in-

terkaliert, können am Durchflusszytometer die Zellen nach DNA-Gehalt getrennt dargestellt werden.

Zur Analyse wurden sowohl die adhärennten Zellen als auch die abgelösten Zellen im Medium geerntet. Dazu wurden die adhärennten Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst (siehe Kapitel 3.1.1) und zusammen mit dem überstehenden Medium gesammelt. Die Zellsuspension wurde bei 1500 Upm für fünf Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden mit kaltem PBS (4° C) gewaschen und erneut für fünf Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in kaltem PBS aufgenommen und die Zellen darin resuspendiert. Zur Fixierung der Zellen wurden diese langsam in 80 % Ethanol aufgenommen und für mindestens zwei Stunden (bis zu zehn Tagen) bei -20° C inkubiert.

Zur Färbung wurden die Zellen mit PBS versetzt und bei 1500 Upm für fünf Minuten zentrifugiert. Zum Ausschluss der RNA wurden die Zellpellets in PBS mit 30 µg/µl Ribonuklease A aufgenommen und eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert (RNA-Verdau). Nach dem RNA-Verdau wurde die DNA der Zellen mit 16,7 µg/ml PI angefärbt. Bis zur durchflusszytometrischen Messung wurden die Zellsuspensionen auf 4° C gehalten.

Für jede zu analysierende Probe wurden 10.000 Zellen mit dem Durchflusszytometer BD FACSCantoTM (BD Canto) von Becton Dickinson Biosciences (New Jersey) untersucht und mit der Software CellQuest Pro dokumentiert. Anschließend wurden die aufgenommenen Daten mit der WinMDI Software v2.9 kalkuliert und mit der Graphpad Prism Software v5.0 ausgewertet.

3.2.2 Annexin V/PI-Doppelfärbung und Analyse mittels Durchflusszytometrie

In der Zelltodanalyse durch die Doppelfärbung mit Annexin V und PI werden die unterschiedlichen Zellzustände von lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen genutzt [Vermes u. a. (1995)]. Ein frühes Ereignis der Apoptose ist die Membranverän-

derung der Zelle. Dabei wird Phosphatidylserin von der Innenseite der Plasmamembran nach außen zur Zelloberfläche transferiert. Annexin V ist nicht membrangängig, bindet aber an frei zugängliches Phosphatidylserin. Das Annexin V mit gekoppelten Fluoresceinisothiocyanat (FITC) ermöglicht dadurch eine Unterscheidung im Durchflusszytometer zwischen vitalen und apoptotischen oder membrangestörten (nekrotischen) Zellen. Eine Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen wird unter zusätzlicher Verwendung von PI ermöglicht. Da bei apoptotischen Zellen (in frühen Stadien) die Membranen noch intakt sind, wird das PI von der Zelle ausgeschlossen. Im Gegensatz dazu wird das PI von nekrotischen Zellen (mit einem frühen Zusammenbruch der Membranen) nicht ausgeschlossen und es interkaliert in den Nukleinsäuren der Zelle.

Zur Analyse wurden sowohl die adhärenen Zellen als auch die abgelösten Zellen im Medium geerntet und gewaschen (siehe Kapitel 3.2.1). Das Pellet wurde anschließend in 52,5 μ l Annexin V-Färbelösung (50 μ l Annexin V-Bindepuffer mit 2,5 μ l FITC-markiertem Annexin) resuspendiert und für eine Inkubation von 15 bis 20 min auf Eis im Dunkeln gelagert. Danach wurde die Zellsuspension mit 440 μ l PI-Färbelösung (430 μ l Annexin V-Bindepuffer mit 10 μ l PI-Lösung mit einer Konzentration von 50 mg/ml) resuspendiert und die Zellen mit PI gefärbt. Bis zur durchflusszytometrischen Messung wurden die Zellsuspensionen auf 4° C gehalten.

Für jede zu analysierende Probe wurden 10.000 Zellen mit dem Durchflusszytometer BD FACSCaliburTM (BD Calibur) von Becton Dickinson Biosciences (New Jersey) untersucht und mit der Software CellQuest Pro dokumentiert. Anschließend wurden die aufgenommenen Daten mit der WinMDI Software v2.9 kalkuliert und mit der Graphpad Prism Software v5.0 ausgewertet.

3.2.3 ROS-Messung

Für die ROS Messung wurden die Zellen in DMEM ohne Phenolrot ausgesät und entsprechend behandelt. Zur semiquantitativen Untersuchung der ROS-Bildung in den Zellen wurde der Farbstoff H₂DCFDA von Thermo Scientific in einer Konzentration von 1 µM von Thermo Scientific nach den Angaben des Herstellers verwendet. Für jede zu analysierende Probe wurden 10.000 Zellen mit dem Durchflusszytometer BD Calibur untersucht und mit der Software CellQuest Pro dokumentiert. Anschließend wurden die aufgenommenen Daten mit der Graphpad Prism Software v5.0 ausgewertet.

3.2.4 MDC-Messung

Die Autophagie-Messung wurde durch den autofluoreszierenden Farbstoff Monodansylcadaverin (MDC) ermöglicht [Biederbick u. a. (1995)]. MDC ist eine fluoreszierende Substanz, die saure Kompartimente, z.B. mit Lysosomen fusionierte Autolysosome, anfärbt. Die zu analysierenden Zellen wurden geerntet und in 500 µl 0,1 mM MDC in PBS aufgenommen und 30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen drei mal in 4 ml PBS gewaschen und dann in 2 ml 1 % Formaldehyd in PBS für 30 Minuten bei RT im Dunkeln fixiert. Abschließend wurden die Zellen einmal in 8 ml PBS und zweimal in 4 ml PBS gewaschen und in 400 bis 500 µl PBS aufgenommen. Bis zur Messung wurden die Zellen auf Eis im Dunkeln gelagert.

Für jede zu analysierende Probe wurden 10.000 Zellen mit dem Durchflusszytometer BD Canto untersucht und mit der Software CellQuest Pro dokumentiert. Anschließend wurden die aufgenommenen Daten mit der Graphpad Prism Software v5.0 ausgewertet.

3.2.5 CytoID-Messung

Die Autophagie-Messung wurde mittels CYTO-ID® Autophagy Detection Kit von Enzo Life Sciences (Lörrach) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für jede zu

analysierende Probe wurden 10.000 Zellen mit dem Durchflusszytometer BD Canto untersucht und mit der Software CellQuest Pro dokumentiert. Anschließend wurden die aufgenommenen Daten mit der Graphpad Prism Software v5.0 ausgewertet.

3.2.6 MagicRed-Messungen

Für die Aktivitätsbestimmung der Kaspasen und Kathepsine in den Zellen wurde mittels Magic Red Caspase 3/7 und Cathepsin B/L Detection Kit von ImmunoChemistry Technologies (Bloomington) nach Angaben des Herstellers verfahren. Für jede zu analysierende Probe wurden 10.000 Zellen mit dem Durchflusszytometer BD Canto untersucht und mit der Software CellQuest Pro dokumentiert. Anschließend wurden die aufgenommenen Daten mit der Graphpad Prism Software v5.0 ausgewertet.

3.2.7 C₁₂-FDG-Messung

Zur Messung der Seneszenz der Zellen wurde das fluoreszierende Substrat der SA-Galactosidase 5-Dodecanoylamino fluorescein Di-beta-D-Galactopyranosid (C₁₂FDG) verwendet [Debacq-Chainiaux u. a. (2009)]. Um die einzusetzenden Mengen zu reduzieren, wurde zunächst das Medium auf den Zellen auf 2 ml reduziert. Dann wurde zur Ansäuerung der Zellen der Protonenhemmer Bafilomycin in einer Konzentration von 100 nM zu den Zellen gegeben und eine Stunde im Inkubator (37° C) inkubiert. Anschließend wurden 33 µl einer 2 mM C₁₂FDG-Lösung zu den Zellen gegeben und diese ebenfalls für eine Stunde im Inkubator (37° C) im Dunkeln gefärbt. Abschließend wurden die Zellen zweimal in 2 ml PBS gewaschen und in 400 µl PBS aufgenommen. Die Zellen wurden bis zur Messung im Dunkeln auf Eis gelagert.

Für jede zu analysierende Probe wurden 10.000 Zellen mit dem Durchflusszytometer BD Canto untersucht und mit der Software CellQuest Pro dokumentiert. Anschließend wurden die aufgenommenen Daten mit der Graphpad Prism Software v5.0 ausgewertet.

3.3 Proteinexpression

Für die Analyse der Proteinexpression der behandelten Zellen wurden von diesen und von den unbehandelten Kontrollzellen die Proteine isoliert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Antikörperbindung quantifiziert.

3.3.1 Herstellung von Proteinextrakten

Bei der Herstellung von Proteinextrakten für die Westernblot-Analyse wurden drei unterschiedliche Protokolle angewendet. Zur Untersuchung von Proteinen, die im Zellkern lokalisiert sind, wurden Kernextrakte isoliert und für alle anderen Proteine wurden Gesamtzellextrakte hergestellt. Bei den Gesamtzellextrakten wurden methodisch die Untersuchungen von phosphorylierten und nicht phosphorylierten Proteinen unterschieden, da bei der Herstellung des einfachen Gesamtzellextrakts die Wahrscheinlichkeit groß ist, dass die zu untersuchenden Phosphorylierungen enzymatisch abgebaut werden. Anschließend wurde die Proteinkonzentration der Extrakte mittels der Methode nach Bradford oder nach Lowry (siehe folgendes Kapitel 3.3.2) bestimmt. Bei den Extrakten mit Sonifizierungspuffer/Proteinladepuffer sind diese Methoden der Proteinbestimmung nicht möglich, da die Puffer diese Messung stören. Hier wurde das gleichmäßige Beladen der Gele durch ein Probegels ermöglicht. Das Auftragsvolumen der Extrakte für die weiteren Gele wurde anhand der Bandenintensitäten des Probegels bestimmt und für die folgenden Gele entsprechend angepasst.

3.3.1.1 Herstellung von Kernextrakten

Die zu verwendeten Zellen wurden mit Trypsin/EDTA-Lösung geerntet, gewaschen und pelletiert (5 min, 4° C, 1500 Upm). Zum Aufschluss der Zellen wurden die Pellets zuerst in 1 ml Lysispuffer A resuspendiert und auf Eis für zehn Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere fünfminütige Inkubation mit 50 μ l 10 %-igem NP40, in der

die Membranen aufgebrochen wurden. Die Zellkerne wurden bei 3200 Upm und 4° C für fünf Minuten pelletiert. Zur Entfernung aller Membranreste wurden die Zellkerne in 1 ml Lysispuffer A resuspendiert und erneut zentrifugiert. Für die Zellkernlysen wurden je nach Pelletgröße 150 bis 300 μ l Lysispuffer B zu den Kernen gegeben, resuspendiert und dann sonifiziert (2 x 10 Impulse, Ausgangsreglerstufe 4, Auslastungsgrad 40 %). Nach erneutem Waschen der Lysate durch einen weiteren Zentrifugationsschritt wurde die Proteinbestimmung mit der Methode nach Lowry durchgeführt. Anschließend wurden die Lysate bei -80° C gelagert.

3.3.1.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Die zu verwendeten Zellen wurden mit Trypsin/EDTA-Lösung geerntet, gewaschen, pelletiert (5 min, 4° C, 1500 Upm) und im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bis zur Lyse auf -80° C (bis zu drei Wochen) gelagert.

Zum Aufschluss der Zellen wurden die Pellets auf Eis aufgetaut und im Sonifizierungspuffer aufgenommen. Anschließend erfolgte der Aufschluss durch Sonifizierung auf Eis (3 x 10 Impulse, Ausgangsreglerstufe 4, Auslastungsgrad 40 %). Die verbleibenden Zellfragmente wurden für zehn Minuten bei maximaler Geschwindigkeit in der gekühlten (4° C) Zentrifuge pelletiert. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20° C gelagert. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (siehe folgendes Kapitel 3.3.2).

3.3.1.3 Herstellung von Gesamtzellextrakten zur Untersuchung von phosphorylierten Proteinen

Die zu erntenden Zellen wurden mit PBS gespült und sorgfältig vom PBS befreit. Auf die Zellen wurden je nach Zelldichte 200–400 μ l heißer Roti-Load 1 Proteinauftragspuffer (95° C) gegeben. Durch den Puffer und leichtes Klopfen und Schwenken der Platten wurden die Zellen von der Zellkulturplatte gelöst und anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die beginnende Lyse der Zellen wurde durch eine anschlie-

ßende Sonifizierung (2 x 10 Impulse, Ausgangsreglerstufe 4, Auslastungsgrad 40 %) abgeschlossen. Zum Denaturieren der Proteine wurden die Proteinextrakte anschließend für fünf Minuten auf 95° C erhitzt. Die Lagerung der Proteinextrakte erfolgte bei -20° C.

3.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten

Bei der Proteinkonzentrationsbestimmung nach der Methode von Bradford beruht das Testverfahren auf der Bindung von Comassie Blue G250 an die Aminogruppen der Proteine und der folgenden Verschiebung des Adsorptionsspektrums [Bradford (1976)].

Es wurden je nach zu erwartender Proteinkonzentration ein bis drei Mikroliter Proteinextrakt pro Loch einer 96-Lochplatte (in Verfachbestimmung) pipettiert und mit 200 µl Bradford-Lösung versetzt. Nach zehnmütiger Inkubation im Dunkeln wurde die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch bestimmt. Als Referenz wurde eine Eichreihe mit ein bis fünf Mikrogramm BSA (in Doppelbestimmung) mitgeführt. Mittels der Absorptionswerte der Eichreihe und der Proben wurde mit der Ascent Software v2.6 eine Regressionsgerade ermittelt und anhand der daraus resultierenden Steigungsfunktion die Konzentrationen der Proben bestimmt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Methode von Lowry beruht auf einer chemischen Reaktion, bei der die reaktiven Gruppen der Proteine unter alkalischen Bedingungen Kupferionen reduzieren [LOWRY u. a. (1951)]. Diese reagieren mit Na-K-Tartrat zu einem Komplex, dessen Absorption bei 600 nm am Photometer bestimmt wird.

Zur Konzentrationsbestimmung wurden 10 µl der Proteinextrakte mit 140 µl Lowry I-Lösung gemischt. Anschließend wurde die Proteinlösung mit 250 µl Lowry II-Lösung (frisch zubereitet) und danach mit 30 µl 50%-iges Folin-Reagenz versetzt und 30 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Zur Messung wurden je 100 µl in Doppelwerten in eine 96-Lochplatte pipettiert und bei einer Wellenlänge von 600 nm vermessen. Als

Referenz wurde eine Eichreihe mit ein bis fünf Mikrogramm BSA mitgeführt. Mittels der Absorptionswerte der Eichreihe und der Proben wurde eine Regressionsgerade ermittelt und anhand der daraus resultierenden Steigungsfunktion die Konzentrationen der Proben bestimmt.

3.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte nach der Beschreibung in [Laemmli (1970)]. Es wurden selbstgegossene und fertige denaturierende Polyacrylamidtrenngelle von Bio-Rad mit einem Polyacrylamidanteil von 5 %, 7,5 %, 10 %, 12 % oder 15 % verwendet. Das Trenngel für die selbstgegossenen Gele wird zwischen Glasplatten (Bio-Rad, München) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach 45 Minuten ist die Polymerisation abgeschlossen. Nach dem Entfernen des Isopropanols wurde ein Sammelgel (4 % Polyacrylamidanteil) auf das Trenngel gegossen und ein Kamm für die Ladetaschen eingebracht. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel feucht eingepackt und bei 4° C bis zum Gebrauch (bis zu 48 Stunden) gelagert.

Vor Gebrauch des Gels wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit SDS-Laufpuffer ausgespült. Pro Probe/Tasche wurden 15-50 μg Protein mit 1/4 Volumenanteil Protein-Ladepuffer versetzt und fünf Minuten bei 95° C denaturiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in SDS-Laufpuffer bei 130 Volt.

3.3.4 Proteintransfer

Nach der Gelelektrophorese erfolgte der Proteintransfer im elektrischen Feld vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran. Dazu wurde das Gel der Elektrophoresekammer entnommen und auf einer mit Transferpuffer getränkten Nitrozellulose-Membran gelegt. Von beiden Seiten wurden die Membran und das Gel mit feuchten Transferpapier und Schwammplatten umschlossen. Der gesamte Stapel wurde in einer speziellen Halterung

(Bio-Rad) fixiert und in die mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer gelegt. Anschließend erfolgte der Transfer bei einer Stromstärke von 100 mA über Nacht. Dabei wandern die Proteine aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld in Richtung Anode auf die Transfer-Membran.

3.3.5 Antikörperbindung

Nach abgeschlossenem Proteintransfer erfolgte die Antikörperbindung auf der Membran. Dazu wurde die Membran der Transferkammer entnommen und mit TBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran kurz mit Ponceau S-Lösung, das Proteine unspezifisch anfärbt, inkubiert, um einen ersten Eindruck von der Elektrophorese und dem Transfer zu erhalten. Die Membran wurde erneut mit TBST gewaschen und anschließend entsprechend dem Marker die Banden mit Bleistift markiert. Zum Abblocken unspezifischer Antikörperbindungen wurde die Membran eine Stunde bei RT in Blocklösung inkubiert und anschließend erneut mit TBST gewaschen. Die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper wurde bei 4°C über Nacht in Rotation durchgeführt. Dazu wurden die Antikörper in einer Konzentration von 1:500 bis 1:5000 in Blocklösung verdünnt und zur Membran gegeben. Abschließend wurde die Membran 3 x 10 Minuten mit TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde für 1,5 Stunden bei RT in Rotation durchgeführt. Dazu wurden die Sekundärantikörper ebenfalls in Blocklösung verdünnt (Infrarot-Farbstoff-konjugierte Antikörper 1:10000). Danach wurde die Membran erneut 3 x 10 Minuten im Dunkeln mit TBST gewaschen und abschließend im Dunkeln bei RT getrocknet.

3.3.6 Antikörperdetektion

Die Detektion der Antikörper erfolgte mit der Odyssey-Infrarot-Abbildungsanlage. Die getrocknete Membran wurde dazu plan in die Anlage gelegt und zunächst bei geringer Auflösung gescannt. Die Intensität der abgebildeten Banden wurde soweit runterge-

regelt, dass kleinste Unterschiede in der Intensität der Banden möglich waren, aber keine Bande durch zu geringe Intensität verloren ging. Dann wurden mit hoher Auflösung die relevanten Bereiche der Membran erneut gescannt und im Anschluss mittels der Software die Intensität jeder Bande erfasst. Die Scans und die Auswertungen wurden dokumentiert und gespeichert. Anschließend wurden die aufgenommenen Daten mit der LibreOfficeCalc Software kalkuliert und mit der Graphpad Prism Software v5.0 ausgewertet.

3.4 Immunfluoreszenz-Färbungen zur mikroskopischen Auswertung

Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz-Färbung können nicht nur am Durchflusszytometer untersucht werden, sondern auch an speziellen Laser-Scanner-Mikroskopen. Die Zellen können dafür fixiert (tot) sein oder auch lebend untersucht werden.

3.4.1 Fixierte Zellen

Für die Immunfluoreszenz-Färbung der Zellen wurden diese in Zellkulturschalen ausgesät, in denen zuvor entsprechend präparierte Deckgläschen ausgelegt worden waren, auf denen die Zellen ebenfalls wie auf den Boden der Zellkulturschalen adhärend wachsen konnten. Auf den Deckgläschen konnten die Zellen wie zuvor behandelt und gewaschen werden. So wurden sie darauf anschließend gefärbt, auf Objektträgern fixiert und unter dem Mikroskop dokumentiert und analysiert.

3.4.1.1 Vorbereitung der Deckgläschen

Die Deckgläschen wurden zunächst 20 Minuten in Methylether gespült und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100 % Ethanol, 70 % Ethanol, Wasser) gewaschen. Dann wurden sie 20 Minuten in 1 N HCl gespült, erneut mehrmals mit Wasser

gewaschen und anschließend bis zur Anwendung in 70 % Ethanol bei 4° C gelagert. Vor der Aussaat der Zellen wurden in die 6 cm Zellkulturschälchen je zwei Deckgläschen steril eingelegt und trocknen gelassen.

3.4.1.2 Fixierung der Zellen

Zu den gewählten Endpunkten der Versuche wurde das Medium aus den Schalen vorsichtig abgesaugt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Für die Fixierung wurden die Zellen zuerst 15 Minuten bei RT in Paraformaldehyd (4% in PBS) inkubiert und nach drei Waschsritten mit PBS 10 Minuten in 100 % Methanol bei -20° C inkubiert. Abschließend wurden die Deckgläschen erneut dreimal mit PBS gewaschen und dann in 3 cm Schalen umgesetzt. Die Deckgläschen konnten im PBS einige Tage bei 4° C gelagert werden oder direkt weiter prozessiert werden.

3.4.1.3 Antikörperbindung

Um unspezifische Bindungen zu unterbinden, wurden die Deckgläschen für eine Stunde in 5% BSA-Lösung (in 0,3% Tritonx100-PBS) geblockt. Die Inkubation der Deckgläschen mit dem Primärantikörper wurde bei 4° C über Nacht in einer Feuchtkammer durchgeführt. Dazu wurden die Antikörper in einer Konzentration von 1:200 (LC3, LAMP2) bis 1:1000 (*gamma*H2AX) in Blocklösung verdünnt und je 100 μ l auf die Deckgläschen gegeben. Abschließend wurden die Deckgläschen 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Dann folgt ein kurzer Waschsritt von zwei Minuten mit High Salt PBS (0,4 M NaCl). Anschließend wurden die Deckgläschen 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde für zwei Stunden bei RT im Dunkeln durchgeführt. Dazu wurden die Sekundärantikörper in 0,3% Tritonx100-PBS verdünnt (Infrarot-Farbstoff-konjugierte Antikörper 1:400 für LC3 und LAMP2, 1:500 für γ H2AX). Danach wurden die Deckgläschen erneut 3 x 10 Minuten im Dunkeln mit PBS gewaschen und abschließend im Dunkeln bei RT mit VECTASHIELD Mounting Medium mit DAPI (Vector Laboratories) zur Kernfärbung auf saubere Objektträger

eingedeckelt.

Für die Untersuchungen am LSM wurden die Zellkerne der Zellen vor dem Eindeckeln auf den Objektträger mit TO-PRO3 gefärbt. Dazu wurden die Deckgläschen mit 100 μ l TO-PRO3-Lösung (1 % in PBS) versetzt und 15 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurden die Deckgläschen kurz in PBS gewaschen.

3.4.2 Lebende Zellen

Zur Untersuchung lebender Zellen ist es wichtig, sie so schonend wie möglich zu behandeln und die äußere Umgebung für die Zellen so gut wie möglich stabil am Optimum zu halten. Daher wurden die Zellen nur kurz unter das Mikroskop gelegt und analysiert, da dieses noch nicht über einen internen Inkubator verfügte.

3.4.2.1 Mito-/LysoTracker-Untersuchung

Für die Immunfluoreszenz-Analyse der Zellen wurden diese in spezielle Zellkulturschalen ausgesät, die mikroskopische Aufnahmen von unten an die Zellkulturschale ermöglichen (Schälchen mit Glasboden). Auf den Schälchen konnten die Zellen wie zuvor behandelt und gewaschen werden. So wurden sie darauf anschließend gefärbt und lebend unter dem Mikroskop dokumentiert und analysiert. Da das Phenolrot im Zellkulturmedium für die mikroskopischen Aufnahmen störend wirkt, wurde für diese Untersuchung das gleiche Medium aber ohne Phenolrot verwendet.

Für die qualitative Untersuchung der Mitochondrien in den Zellen wurde der Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Orange CMTMRos (100 nM) genutzt. Für die Lysosomen wurde der Fluoreszenzfarbstoff LysoTracker Green DND-26 (50 nM) ebenfalls von Thermo Fisher Scientific (Carlsbad) verwendet. Das Anfärben der Zellen wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit dem Laser-Scan-Mikroskop LSM 710 (Zeiss) wurden die die Lebendaufnahmen dokumentiert und mit der ZEN Software (Zeiss) anschließend ausgewertet.

3.5 Genexpression

Für die Analyse der Genexpression behandelter Zellen wurde von diesen und den unbehandelten Kontrollzellen die RNA isoliert, daraus cDNA synthetisiert und dann mittels semiquantitativer PCR die Genexpression mit entsprechenden Primern analysiert.

3.5.1 RNA-Isolierung

Aus den schockgefrorenen Zellpellets (siehe Kapitel 3.3.1.2) wurde die Gesamt-RNA mittels NucleoSpin RNA Kit von Macherey-Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers isoliert. Anschließend erfolgte die Qualitäts- und Konzentrationsbestimmung mittels der optischen Dichte (OD) am NanoDrop. Einer OD bei 260 nm von 1 entspricht 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Das Verhältnis von einer OD bei 260 nm zu einer OD bei 280 nm gibt Aufschluß über die Reinheit der RNA (Verunreinigung durch Proteine). Der Quotient einer reinen RNA hat einen Wert von zwei.

3.5.2 cDNA-Synthese

Aus der zuvor isolierten RNA wurde die cDNA mittels Verso cDNA Synthesis Kit von Thermo Scientific (Massachusetts) nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Als Ausgangsmaterial wurden 2 μg RNA für einen dreifach Ansatz eingesetzt. Als Qualitätskontrolle der cDNA wurde eine PCR mit dem Haushaltsgen *betaAktin* durchgeführt.

3.5.3 Semiquantitative PCR

Die semiquantitative PCR erfolgte im MyiQ5-Zykler (Real-Time PCR Detection Systems von Bio-Rad). Die verwendeten Primer von Invitrogen (Carlsbad) wurden vor Gebrauch auf eine Konzentration von 10 μM eingestellt. Als Ausgangsmaterial wurden 100 ng cDNA für eine Reaktion eingesetzt. Für jede spezifische PCR wurden drei

Reaktionen durchgeführt. Die weiteren Komponenten und das Protokoll zur PCR wurden aus dem SensiMix SYBR Hi-ROX Kit von Bioline (Aschaffenburg) bezogen. Anschließend wurden die aufgenommenen Daten mit der Bio-Rad Software kalkuliert, die Qualität der PCR (Schmelzkurvenanalyse) visuell überprüft und abschließend mit der Graphpad Prism Software v5.0 ausgewertet.

3.6 In vivo-Analysen

Zu den *in vivo*-Untersuchungen sind hier die Methoden zum subkutanen Tumormausmodell und dem intrakranialen Tumormausmodell aufgezeigt. Ebenso werden die durchgeführten histologischen Methoden besprochen.

Alle Tierversuche wurden unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

3.6.1 Subkutanes Tumormausmodell

Für das subkutane Xenograph-Tumor-Modell wurden vier Wochen alte BALB/C nu/nu Mäuse beiden Geschlechts verwendet. Die Mäuse bekamen unter einer leichten Isofluran-Bedämpfung jeweils 100 μ l 5×10^6 Zellen in PBS unter die Haut jeder Flanke injiziert. Nachdem die Tumore auf ein Volumen von mindestens 100 μ l je Tumor herangewachsen waren, wurden die Tiere in möglichst gleiche Gruppen (Tumorvolumen und Geschlecht) von mindestens fünf Tieren eingeteilt und es wurde mit der Behandlung der Tiere begonnen.

3.6.1.1 Behandlung der Tiere

Vor der initialen TMZ-Behandlung wurden die Tiere gewogen und anschließend entsprechend ihrem Gewicht wurden 100 mg/kg Körpergewicht TMZ *intra peritoneal* (i.p.) injiziert. Einen Tag später begann die Artesunat-Behandlung über das Trinkwasser der

Tiere. Es wurde eine Konzentration von 1 mg/ml Artesunat mit 2% Saccharose verwendet. Diese wurde alle zwei Tage frisch angesetzt und das Trinkvolumen der Gruppe dokumentiert. Die Tiere anderer Gruppen bekamen den gleichen Ansatz der Behandlungen, aber ohne den Wirkstoff.

Alle zwei Tage wurden die Tumore der Tiere mit einer Schieblehre gemessen. Jede Woche wurden die Tiere gewogen und das Gewicht der Tiere dokumentiert. Bei zu großem Gewichtsverlust oder zu großem Tumor wurden die Tiere terminiert. Die Tiere wurden ebenfalls terminiert, wenn sie einen offenen Tumor oder andere Einschränkungen ihrer Lebensqualität zeigten.

Den Tieren wurden nach Versuchsende die Tumore entnommen und in 4% PFA für die histologischen Untersuchungen fixiert. Abschließend wurden die aufgenommenen Daten mit der Graphpad Prism Software v5.0 ausgewertet.

3.6.2 Intrakranielles Tumormausmodell

Für das intrakranielle Xenograph-Tumor-Modell wurden vier Wochen alte MNRI nu/nu Mäuse weiblichen Geschlechts verwendet. Die Tiere wurden schon vor Beginn des Versuchs an die Handhabung bei der Sondierung und den Injektionen gewöhnt, damit die Tiere während der Behandlung weniger gestresst wurden.

Während des Versuchs wurden die Tiere jeden Tag auf ihre Vitalität hin untersucht. Bei ersten Anzeichen neurologischer Ausfälle oder sonstigen Einschränkungen ihrer Lebensqualität wurden die Tiere zweimal am Tag kontrolliert und ggf. terminiert.

In unregelmäßigen Abständen wurden einzelne Tiere im MRT untersucht. Dazu wurden die Tiere zuvor mit Avertim narkotisiert und ihnen wurde das Kontrastmittel Dotarem i.p. gespritzt. Die Tiere wurden zur Reduzierung der lauten Geräusche des MRT mit Ohrstöpseln versehen und in Zellstoff eingewickelt, um die narkotisierte Maus zu stabilisieren. Anschließend wurden die Tiere in einer sterilen Transport-Box fixiert, sodass die Tiere zum MRT transportiert und nach der Untersuchung wieder zurück in die Bar-



Abbildung 3.1: Sterile Barriere-Box. Darstellung der sterilen Barriere-Box in Seitenansicht und in Aufsicht von oben. Am Boden der Barriere-Box befindet sich das Wärmepack, abgedeckt mit einem sterilen OP-Tuch (1). Am linken Rand der Box ist die Handgelenksspule (2) fixiert, in die der Kopf der Mäuse gelegt wird. Nach rechts Außen ist der Anschluss (3) für das MRT-Gerät gelegt. Neben der Spule ist der Zellstoff zur Fixierung der Maus zu sehen (4). Die Box wird mit einem Deckel, der mit einer sterilen Gaze versehen ist, verschlossen. Die Gaze ermöglicht den sterilen Luftaustausch.

riere geschleust werden konnten. Während der gesamten Untersuchung befanden sich die Tiere in der Box. In dieser Box war eine Handgelenksspule des MRT installiert, um das geringe Signal, das aufgrund der kleinen Größe der Tiere entsteht, zu verstärken. Die Tiere wurden so fixiert, dass ihr Kopf mittig in der Spule zu liegen kommt. Unter den Tieren befand sich ein Wärmepack, damit die Tiere während der Untersuchung und des Transports nicht auskühlen. Die dafür eigens entwickelte Box ist in Abb. 3.1 dargestellt.

Nachdem die Tiere gestorben sind bzw. terminiert wurden, wurden ihnen anschließend die Gehirne entnommen, die Lymphknoten und inneren Organe auf andere Todesursachen untersucht und anschließend in 4% PFA für die histologischen Untersuchungen fixiert.

3.6.2.1 Vorbereitung der Zellen

Die zu erntenden Zellen wurden auf den Platten mit vorgewärmten PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Die Lyse wurde kurz mit Medium abgestoppt. Die erneut gewaschenen Zellen wurden vorsichtig in wenigen ml PBS resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl und die Vitalität der Zellen mit Tryphanblau in einer Neubauerkammer bestimmt. Die Zellen mussten eine Vitalität von mindestens 85% aufweisen, um ein sicheres Anwachsen im Gehirn der Mäuse sicher zu stellen. Dann wurden die Zellen auf eine Endkonzentration von 50.000 Zellen/ μ l eingestellt und bis zur Injektion auf Eis gestellt.

Kurz vor der Injektion wurde eine Hamiltonspritze mit den Zellen präpariert und in das stereotaktische Gerät eingespannt. Diese Spritze trug einen Stutzen, der genau auf 3 mm Eintauchtiefe eingestellt wurde.

3.6.2.2 Injektion der Zellen

Die Tiere wurden vor der Operation gewogen und entsprechend markiert. Dann wurden die Tiere nacheinander mit Arvertim in Narkose gelegt und für die Operation vorbereitet. Zuerst wurde der Kopf der Mäuse desinfiziert und ggf. rasiert. Dann wurde die Tiefe der Narkose überprüft. Anschließend wurde der Kopf der Tiere in einem stereotaktischen Gerät fixiert. Zunächst wurde die Zunge der Tiere nach vorne und zur Seite aus dem Maul gelegt, damit eine ausreichende Luftversorgung während des Eingriffs gewährleistet wurde. Dann wurden die Zähne auf das Gebissstück gelegt und das Maul mit einer Schraubklemme fixiert. Der Kopf wurde dann mit den Fixierstäben in den Ohren/an den seitlichen Schädelknochen fixiert. Mit einem leichten Druck von oben auf den Schädel wurde die stabile Fixierung der Maus überprüft, Der Aufbau des stereotaktischen Geräts ist in Abb. 3.2 dargestellt. Nach Fixierung der Maus wurde die Schädelhaut der Tiere mit einem Skalpel mittig aufgeschnitten und mit einer Pinzette zu den Seiten gezogen, sodass die Schädelmerkmale zur Orientierung gut sichtbar vorlagen.

Mit einer frischen Injektionsnadel wurde vorsichtig mit minimalen Druck ein Loch in die Schädeldecke gebohrt, 2 mm oberhalb des Bregma in der rechten Hemisphäre. Anschließend wurde die Hamiltonspritze bis zum Stutzen auf genau 3 mm in das Loch geführt. Dann wurden mit 1 μ l pro Minute 100.000 Zellen in das Gehirn injiziert. Daraufhin wurde die Nadel mit 1 mm pro Minute aus dem Kopf gezogen.

Die Tiere wurden dann aus dem stereotaktischen Gerät genommen, genäht und zum Aufwachen auf eine Wärmematte gelegt. Wenn die Tiere aus der Narkose erwachten, wurden sie wieder zurück in die Käfige gebracht und das Trinkwasser der Käfige wurde mit einem Schmerzmittel für die erste Nacht ausgestattet.



Abbildung 3.2: Stereotaktisches Gerät. Darstellung des stereotaktischen Geräts aus unterschiedlichen Perspektiven. Die Tiere werden auf dem OP-Tisch (1) platziert, die Zunge zur Seite gelegt und der Kopf mit den Zähnen auf dem Gebissstück (2) und den Fixierstäben (3) in den Ohren fixiert. In die freie Taxiereinheit (4) wird eine Hamiltonspritze justiert. Die Spritze wird an die entsprechende Stelle über dem Kopf der Maus fixiert und dann in den Schädel der Maus wenige Millimeter eingelassen.

3.6.2.3 Behandlung der Tiere

Nachdem das Anwachsen der Tumore durch Bilder der MRT-Untersuchung bestätigt wurde, wurde mit der Behandlung der Tiere wie in Kapitel 4.3.2.1 dargestellt begonnen. Die Behandlung der Tiere mit TMZ erfolgte i.p. und die Artesunat-Behandlung erfolgte mittels Schlundsonde. Zur Ermittlung der zu verabreichenden Dosen und zur Kontrolle des Zustandes der Tiere wurden diese jede Woche gewogen. Zudem wurden in unregelmäßigen Abständen die Tiere zur Kontrolle unter Zugabe des Kontrastmittels Dotarem am MRT untersucht.

3.6.3 Histologie

Sowohl die Gehirne als auch die Tumore wurden aus der Fixierlösung genommen und zunächst in Wasser gespült. Anschließend wurden sie in Einbettkammern gegeben. Die Gehirne wurden zuvor in Querschnitte aufgeteilt, da die geringere Schichtdicke das Einbetten (schnelleres Eindringen der verschiedenen Lösungen) verbessert.

Das Einbetten erfolgte am Einbettautomaten VIP der MTA-Schule an der Universitätsmedizin. Anschließend wurden die Tumore und die Querschnitte der Gehirne in Parafin eingeblockt und daraufhin am Mykrotom in 1 μ M Schnitte aufgereiht. Die einzelnen Schnitte wurden auf Objekträger (OT) fixiert und anschließend gefärbt. Bis zur Färbung wurden die Schnitte auf den OT bei 4° C gelagert.

Zunächst erfolgte eine Übersichtsfärbung, dann folgten die immunhistologischen Färbungen mit den Antikörpern für Nestin, LC3 und für die gespaltene Form der Kaspase 3. Nach den entsprechenden Färbungen wurden die Schnitte durch Eindecken (siehe Kapitel 3.6.3.1) fixiert und mit dem Mikroskop untersucht. Die Schnitte wurden in verschiedenen Vergrößerungsstufen dokumentiert und ausgewertet.

3.6.3.1 Übersichtsfärbung

Die Färbungen mit Hämatoxylin und Eosin (HE) dienen einer einfachen Übersichtsfärbung. Dazu wurden die OT in einer Küvette zunächst entparafiniert und in Wasser gespült. Anschließend wurden die OT für 90 Sekunden in Hämatoxylin von Dako inkubiert und danach in fließendem Leitungswasser gebläut. Nachdem die OT zweimal kurz in destilliertem Wasser gespült wurden, wurden diese in Eosin-Y von Dako für 30 Sekunden inkubiert. Danach wurden die OT dreimal in destilliertem Wasser gewaschen und einer aufsteigenden Alkoholreihe unterzogen. In 100 % Ethanol blieben die OT für drei Minuten, bevor sie in Xylol für zweimal drei Minuten inkubiert wurden. Nach kurzem Abläufen wurden die OT mit Eukitt von Merck und einem entsprechenden Deckgläschen eingedeckt.

3.6.3.2 Immunhistologische Färbung

Dazu wurden die OT in einer Küvette zunächst entparafiniert und in Wasser gespült. Anschließend erfolgte die Hitzevorbereitung mit Target Retrieval Lösung von Dako für 30 Minuten im Dampfgarer. Dann wurden die OT kurz mit destilliertem Wasser gespült und mit TBS gewaschen. Zum Blocken der endogenen Peroxidase wurden die OT mit 30 % H₂O₂ fünf Minuten inkubiert und abschließend in TBS gewaschen.

Dann wurden die Primärantikörper im Verdünnungsmedium von Dako verdünnt (1:200 bis 1:1000) und für 30 Minuten auf die OT zur Inkubation gegeben. Anschließend wurden die OT in TBS gewaschen und mit Rabbit Link von Dako für 15 Minuten vorbehandelt. Dann erfolgte die Sekundärantikörperbindung mit Super Picture HRP Polymer Kit von Thermo Scientific für 20 Minuten. Danach wurden die OT in TBS gewaschen und für 10 Minuten in AEC Chromogen inkubiert. Nach kurzem Spülen mit destilliertem Wasser wurden die OT in Hämatoxylin von Dako für drei Minuten inkubiert. Abschließend wurden die OT für fünf Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und mit Mounting Medium von Merck eingedeckt.

Kapitel 4

Ergebnisse

Dieses Kapitel ist in mehrere Unterkapitel aufgeteilt. Es beginnt mit einem kurzen allgemeinen Überblick über die verwendeten Zelllinien. Daran schließt sich der erste Teil der *in vitro*-Experimente mit den Untersuchungen nach Behandlung mit TMZ und ART als Einzeldosen an. Darauf folgen die Untersuchungen zur Kombinationsbehandlung von TMZ und ART. Im zweiten Teil der *in vitro*-Experimente sind die Resultate der Untersuchungen zur Kombination von IR und ART zusammengetragen. Im folgenden *in vivo*-Teil sind die Ergebnisse der Tierexperimente aufgeführt.

Aufbauend auf den Arbeiten im Institut fungiert die Zelllinie LN-229 als Hauptzelllinie der Experimente. Deswegen wurden mit dieser Zelllinie sowohl die ersten als auch die meisten Versuche durchgeführt. Da diese Zelllinie unter den hier gewählten Bedingungen keine Tumorgenität unter der Haut der Mäuse zeigte, wurde für diese *in vivo*-Versuche mit der Zelllinie U87MG in den Mausmodellen begonnen. Im Gegensatz dazu konnte im intrakraniellen Experiment wieder auf die Zelllinie LN-229 zurückgegriffen werden, da sie direkt im Gehirn wiederum eine gute Tumorgenität aufweist.

In den grafisch dargestellten Ergebnissen sind die Einzelbehandlungen mit ART in blau, die Einzelbehandlungen mit TMZ oder IR in rot und die Kombinationen von ART und TMZ oder ART und IR in violett dargestellt. Sind Signifikanzen in den Abbildungen

farblich dargestellt, entspricht die Farbe in den Abbildungen jeweils der hier gewählten Zuordnung.

4.1 In vitro-Modelle

Die 1979 etablierte Glioblastomzelllinie LN-229, mit der die meisten Experimente durchgeführt wurden, stammt von einer 60-jährigen Patientin mit einem Glioblastom in der rechten Hirnhälfte (right frontal parieto-occipital glioblastoma). Als weitere Zelllinien wurden die A172 und die U87 MG Zelllinien untersucht. Die Zelllinie A172 stammt von einem 53-jährigen Patienten und die Zelllinie U87 MG von einem 44-jährigen Patienten mit einem Glioblastom. Diese Zelllinien wurden alle aus einem Glioblastom der WHO-Klassifizierung Grad IV isoliert und kultiviert. Die Zelllinie U87 MG wurde direkt von Cell Lines Service bezogen (Klassifizierung WHO-Grad IV).

Die wichtigsten bekannten Charakteristika dieser Zelllinien für die Tumorthherapie sind in Tabelle 4.1 zusammengetragen. Alle Zelllinien zeigen keine bzw. keine relevante MGMT-Aktivität. Sie verfügen über funktionsfähiges p53 und p21. Für das Protein

	LN-229	A172	U87 MG
MGMT	–	–	–
P53	+	+	+
P21	+	+	+
PTEN	+	–	–
P16	–	–	–
Verdopplungszeit (Std)	24	32	28

Tabelle 4.1: Zusammenstellung der für die Tumorthherapie und somit auch für die hier durchgeführten Untersuchungen wichtigen Charakteristika der Zelllinien LN-229, A172 und U87 MG.

p16 sind sie negativ, hier weisen alle Zelllinien eine Deletion auf. Die Zelllinie LN-229 verfügt im Unterschied zu den anderen beiden Zelllinien über die Phosphatase PTEN (Phosphatase and Tensin homolog). Die Bedeutung der hier aufgeführten Charakteristika wird an den entsprechenden relevanten Stellen diskutiert.

Ein weiteres Charakteristikum für diese Zelllinien ist die uneingeschränkte Proliferation. Zur Bestimmung der Verdopplungszeit wurden die Zellen vor Aussaat gezählt und die Zellzahl an weiteren vier Zeitpunkten bestimmt (siehe Methodenteil 3.1.3). Die kürzeste Verdopplungszeit mit 24 Stunden wurde bei der Zelllinie LN-229 beobachtet, sie war somit die am schnellsten proliferierende Zelllinie. Mit einer Verdopplungszeit von 28 Stunden folgte die Zelllinie U87 MG. Die Zelllinie A172 war mit 32 Stunden die Zelllinie mit der längsten Verdopplungszeit.

Ein anderes Merkmal der Zelllinie LN-229 ist gegeben durch die (Pro-)Kaspase-8, die in dieser Zelllinie in nur sehr geringen Mengen vorhanden ist [Heylmann (2011)].

4.2 In vitro Experimente

Zu den *in vitro*-Experimenten zählen alle Untersuchungen der drei Zelllinien nach verschiedenen Behandlungen mit Temozolomid, Bestrahlung und Artesunat innerhalb der Kultivierung im Brutschrank. Die Analysen erfolgten am Durchflusszytometer und Fluoreszenz-Mikroskop nach verschiedenen Färbungen. Ebenso wurden zur Untersuchung Proliferations-Assays, Protein- und Genexpressionsanalysen durchgeführt.

4.2.1 Temozolomid und Artesunat

Zur Etablierung eines geeigneten Behandlungsschemas wurden die Zellen zunächst nach Einzelbehandlungen von Temozolomid und Artesunat untersucht und anschließend die Kombination der beiden Wirkstoffe studiert. Dazu wurde zuerst die Induktion des Zelltods in Abhängigkeit von Konzentrationen und Zeit der Gabe analysiert. Zudem wurde

der Einfluss der Zellzahl auf die Behandlung und die Art des Zelltods in Abhängigkeit der Behandlung untersucht. Darüber hinaus wurde der Einfluss auf den Zellzyklus und die Proliferation studiert. Ein weiteres Augenmerk wurde auf die Untersuchung der Überlebensmechanismen der Zellen gelegt. Hierzu wurde der Autophagie-Prozess analysiert und im späteren Verlauf auch die Induktion der Seneszenz bestimmt.

4.2.1.1 **Untersuchung der zellulären Sensitivität nach Behandlung mit TMZ und ART**

Die Sensitivität der Zelllinien gegenüber TMZ und ART wurde bestimmt, indem die dosisabhängige Koloniebildung analysiert wurde. Diese spiegeln die Proliferation und das Überleben der Zellen wider. Darüber hinaus wurden zudem dosis- und zeitabhängige Zelltodanalysen mit Annexin/PI am Durchflusszytometer durchgeführt. Zum direkten Vergleich der Zelllinien wurde in den Zelltodanalysen der induzierte Zelltod dargestellt.

Nach Behandlung mit TMZ zeigte sich die Zelllinie LN-229 am sensitivsten, sowohl in der Koloniebildung als auch in der Zelltodanalyse über die Zeit von 144 Stunden nach verschiedenen Dosen von TMZ (siehe Abb. 4.1). In den Zelltodanalysen zeigte sich die Zelllinie A172 als die resistensteste gegenüber der Behandlung mit TMZ. In der Koloniebildung aber war die Zelllinie U87 MG noch etwas widerstandsfähiger als die Zelllinie A172 und zeigte auch noch nach einer Behandlung mit 5 μ M TMZ keine Veränderung in der Koloniebildung.

Nach Behandlung mit ART manifestierte sich die Zelllinie A172 in der Koloniebildung zunächst als stabilste Zelllinie gegenüber ART, doch bei der höchsten Konzentration von 5 μ g/ml drehte sich das Ergebnis und zeigte die Zelllinie U87 MG und auch LN-229 als widerstandsfähiger (siehe Abb. 4.2). In den Zelltodanalysen ist die Zelllinie U87 MG die resistensteste der drei. Die anderen beiden Zelllinien variierten in ihrer Sensitivität gegenüber ART in Abhängigkeit der ART-Konzentration und der Dauer der Behandlung.

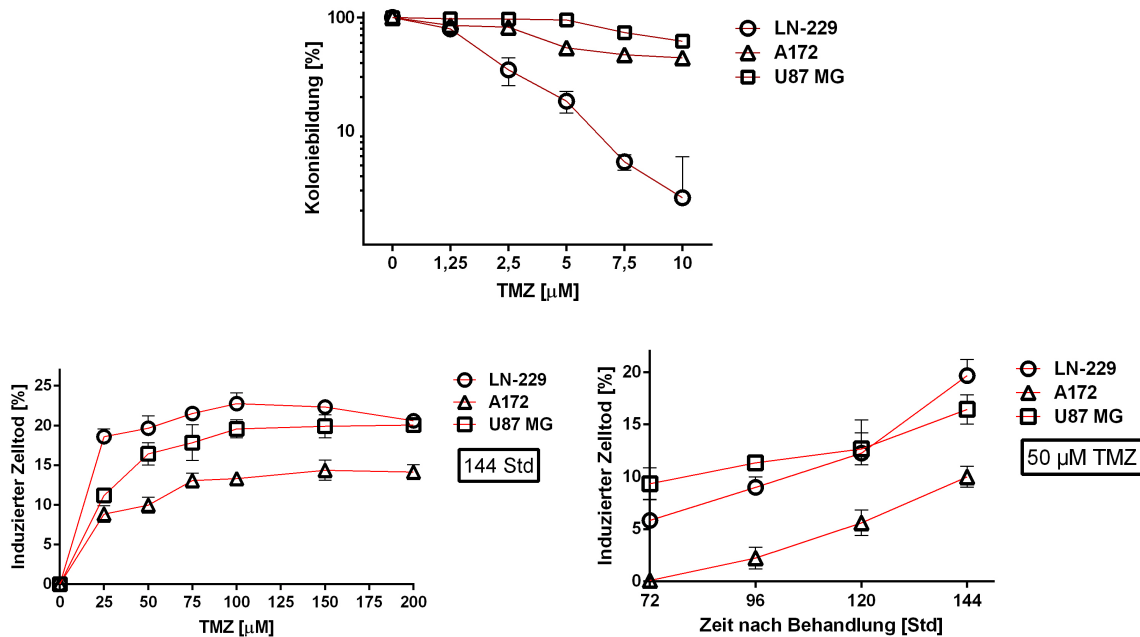


Abbildung 4.1: Zytotoxische Wirkung der TMZ-Behandlung auf Glioblastomzellen. Koloniebildung ausgesäter Zellen nach TMZ-Behandlung in Abhängigkeit aufsteigender TMZ-Konzentrationen (oben). Mittels Durchflusszytometrie ermittelte induzierter Zelltod nach TMZ-Behandlung in Abhängigkeit aufsteigender TMZ-Konzentrationen nach 144 Stunden Inkubationszeit (unten links) und in Abhängigkeit der Inkubationszeit nach 50 μM TMZ-Behandlung (unten rechts).

4.2.1.2 Konzentrationen für die Kombination von ART und TMZ

Um Therapien zu kombinieren und ein Urteil über die Effektivität und Wirksamkeit fällen zu können, dürfen die Konzentrationen nicht zu hoch gewählt werden, da eine Auswertung nur unterhalb der Sättigung möglich ist. Bei Zelltodanalysen heißt das, dass die addierten Zelltodanteile unter 100 % bleiben müssen. Desweiteren sollten die Dosen in den *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten nicht die Dosen überschreiten, die bei der Therapie von Patienten eingesetzt werden.

Bei TMZ wurde eine Konzentration von 50 μM gewählt, da hier eine Wirkung der

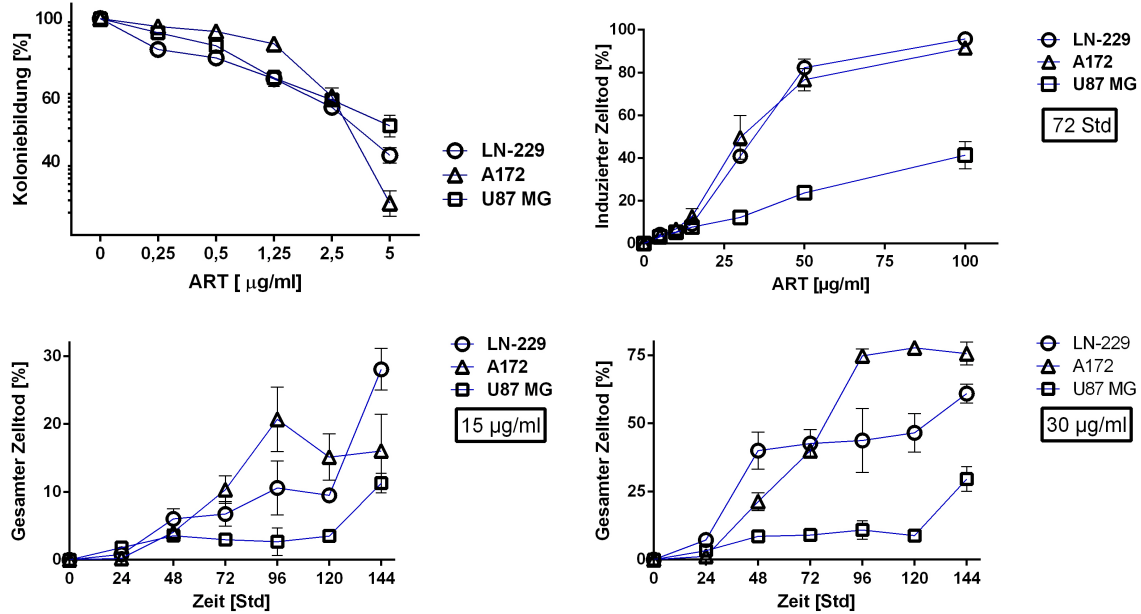


Abbildung 4.2: Zytotoxische Wirkung der ART-Behandlung auf Glioblastomzellen. *Koloniebildung ausgesäter Zellen nach ART-Behandlung in Abhängigkeit aufsteigender ART-Konzentrationen (oben links). Mittels Durchflusszytometrie ermittelter induzierter Zelltod nach ART-Behandlung in Abhängigkeit aufsteigender ART-Konzentrationen nach 72 Stunden Inkubationszeit (oben rechts) und in Abhängigkeit der Inkubationszeit nach 15 µg/ml (unten links) und 30 µg/ml ART-Behandlung (unten rechts).*

Einzel-dosis klar zu definieren war, und diese aber nicht zu hoch für eine Kombination mit weiteren Noxen war. Zudem zeigten höhere Dosen nur eine geringe Steigerung der toxischen Wirkung von TMZ. Erst 120 Stunden nach TMZ-Zugabe war eine deutliche Zunahme der Zelltodinduktion zu beobachten. Daher wurden die weiteren Analysen bis einschließlich 144 Stunden angelegt.

Artesunat zeigte nicht nur über die Zeit eine starke Zunahme der Toxizität, sondern auch mit Erhöhung der Konzentration. Für die Kombination mit TMZ wurde hier eine Konzentration von 15 µg/ml gewählt, da diese auch über eine Dauer von 144 Stunden

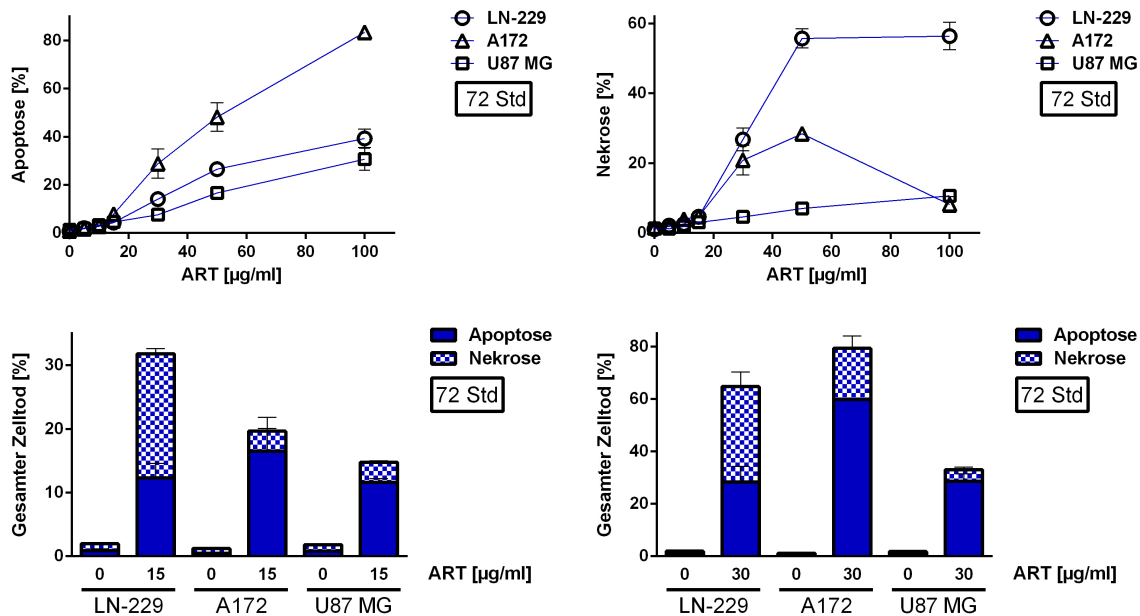


Abbildung 4.3: Zelltodanalysen der Zelllinien nach ART-Behandlung. *Induzierte Apoptose (oben links) und Nekrose (oben rechts) der Zelllinien 72 Stunden nach ART-Behandlung in Abhängigkeit aufsteigender ART-Konzentrationen. Gegenüberstellung der Zelllinien nach Apoptose- und Nekrose-Anteil unbehandelter Zellen und 72 Stunden nach 15 $\mu\text{g/ml}$ (unten links) und 30 $\mu\text{g/ml}$ ART-Behandlung (unten rechts).*

noch Spielraum zur Kombination mit anderen Noxen und deren Analysen zuließ.

4.2.1.3 Untersuchung des induzierten Zelltods nach Behandlung mit ART

Durch die spezifischen Charakteristika von Apoptose und Nekrose können Zellen durch Annexin/PI-Färbung und Durchflusszytometrie in frühe Apoptose (Apoptose) und späte Apoptose/Nekrose (Nekrose) unterschieden werden (siehe auch Kapitel 3.2). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 4.3 grafisch dargestellt.

Die untersuchten Zelllinien zeigten 72 Stunden nach ART-Zugabe Parallelen in der Induktion des Gesamtzelltods in Abhängigkeit der Konzentration von ART. Sie unter-

schieden sich aber in der Art des induzierten Zelltods. Die Zelllinie U87MG zeigte sich in allen Untersuchungen als die resistanteste gegenüber ART.

Die Zelllinien LN-229 und A172 zeigten konzentrationsabhängig einen sehr ähnlichen Verlauf in der Induktion des Gesamtzelltods (siehe Abb. 4.2), während sie sich in der Aufteilung von Apoptose und Nekrose stark unterschieden, wie in Abb. 4.3 (oben links bzw. rechts) dargestellt ist. In der Zelllinie LN-229 wurde nach Zugabe von ART in den Konzentrationen von 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mehr Nekrose als Apoptose induziert (Abb. 4.3 unten: 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ links, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ rechts). In diesen Graphen ist ebenfalls die Aufteilung von Apoptose und Nekrose der anderen beiden Zelllinien dargestellt. Bei diesen beiden Zelllinien überwog der Anteil der Apoptose gegenüber der Nekrose in Bezug auf den Gesamtzelltod (Apoptose und Nekrose addiert).

In der grafischen Darstellung des induzierten Gesamtzelltods (siehe Abb. 4.2), der in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen ist (unten links nach ART-Zugabe von 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und unten rechts nach 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$), wurde deutlich, dass sich die Zelllinien nicht nur in der Sensitivität gegenüber ART, sondern auch in dessen zeitlichen Verlauf unterschieden. Bei den Zelllinien LN-229 und U87MG stieg die Toxizität von ART nach der Dauer von 120 Stunden noch einmal deutlich an. Die Zelllinie A172 hingegen zeigte schon nach einer Dauer von 96 Stunden keinen weiteren Anstieg in der Toxizität von ART.

4.2.1.4 Morphologische Untersuchung des induzierten Zelltods nach Behandlung mit ART und TMZ

Für ein besseres Verständnis der Induktion und Charakteristika des Zelltods nach Zugabe von ART folgten morphologische Untersuchungen am Mikroskop. Zur Unterscheidung des induzierten Zelltods nach Behandlung mit ART und TMZ wurden spezifische Substanzen genutzt, die als Kontrolle des induzierten Zelltods fungierten. So konnte durch die Zugabe von Staurosporin (stauro) die Induktion von Apoptose und durch die Zugabe von tert-Butylhydroperoxid (tBOOH) die Induktion von Nekrose bei den Zelllinien beobachtet werden.

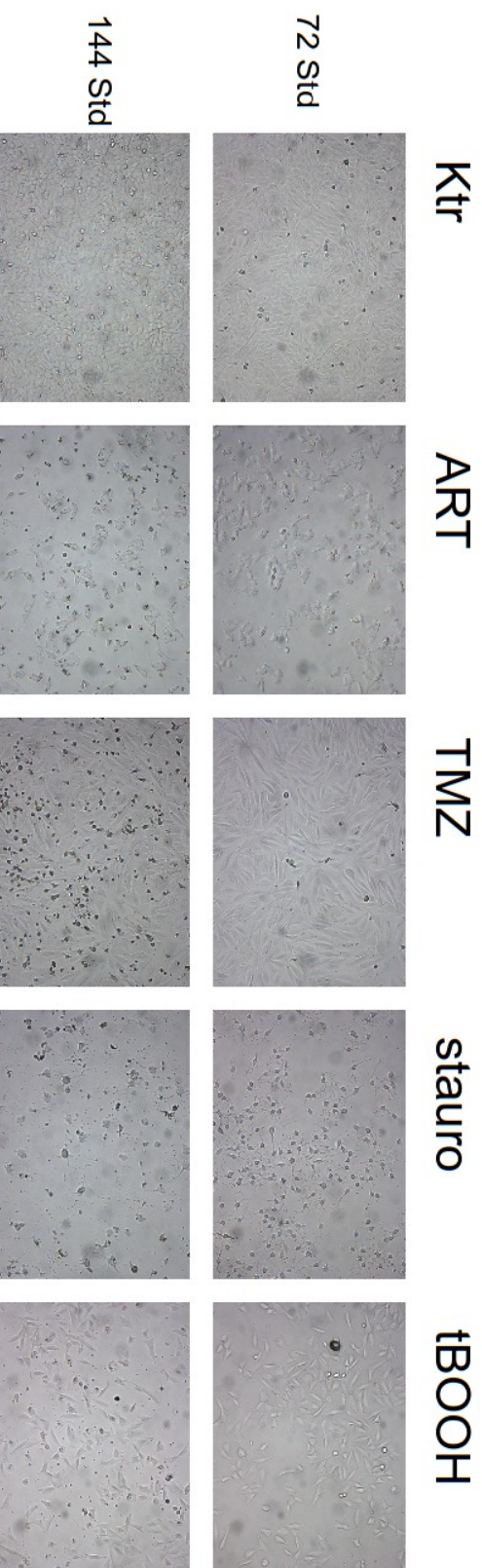


Abbildung 4.4: Morphologie der Zelllinie LN-229 nach verschiedenen Behandlungen. Lebendaufnahmen der Zelllinie LN-229 in 10-facher Vergrößerung 72 Stunden (obere Reihe) und 144 Stunden (untere Reihe) nach ART- und TMZ-Behandlung. Als Positivkontrolle für die Apoptoseinduktion dient Staurosporin (stauro) und für die Nekroseinduktion *tert*-Butylhydroperoxid (tBOOH).

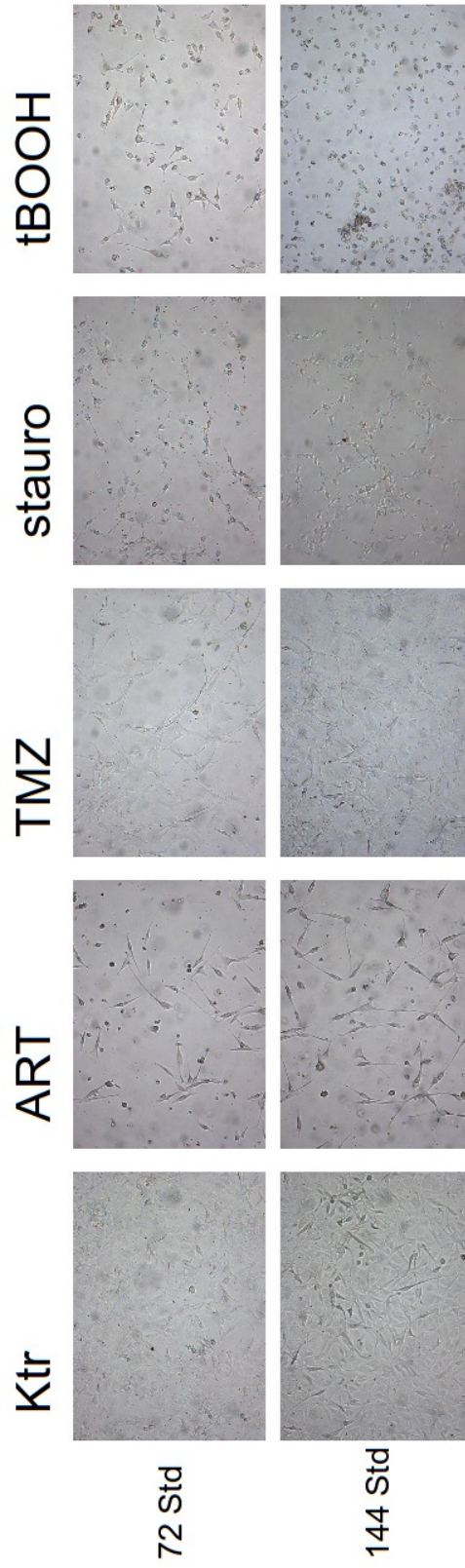


Abbildung 4.5: Morphologie der Zelllinie A172 nach verschiedenen Behandlungen. Lebendaufnahmen der Zelllinie A172 in 10-facher Vergrößerung 72 Stunden (obere Reihe) und 144 Stunden (untere Reihe) nach ART- und TMZ-Behandlung. Als Positivkontrolle für die Apoptoseinduktion dient Staurosporin (stauro) und für die Nekroseinduktion tert-Butylhydroperoxid (tBOOH).

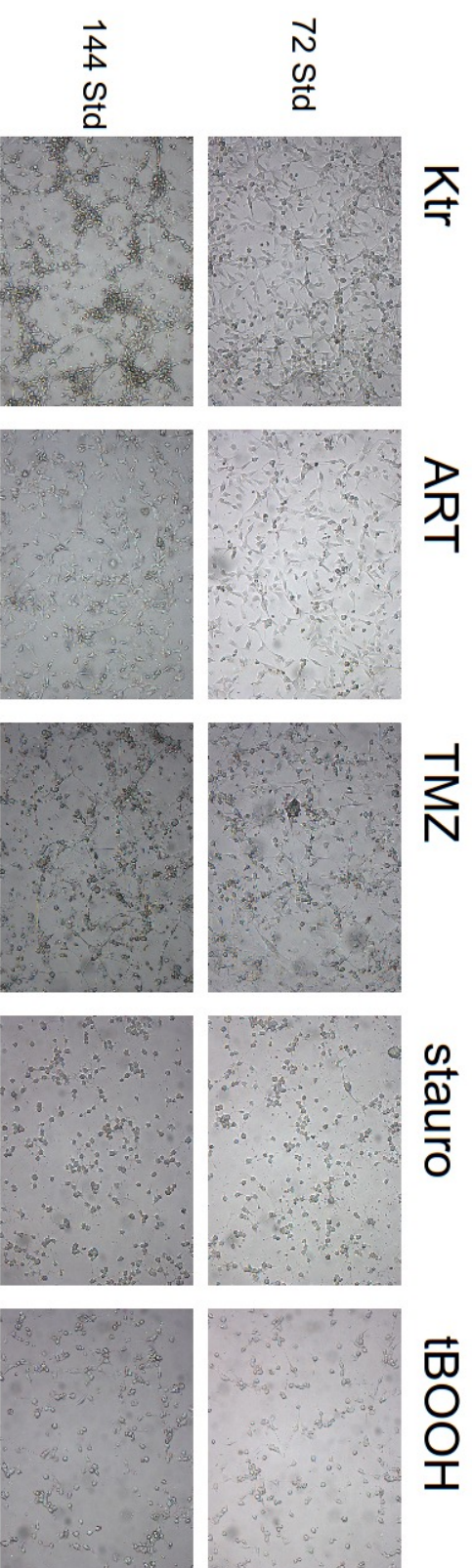


Abbildung 4.6: Morphologie der Zelllinie U87 MG nach verschiedenen Behandlungen. Lebendaufnahmen der Zelllinie U87MG in 10-facher Vergrößerung 72 Stunden (obere Reihe) und 144 Stunden (untere Reihe) nach ART- und TMZ-Behandlung. Als Positivkontrolle für die Apoptoseinduktion dient Staurosporin (stauro) und für die Nekroseinduktion *tert*-Butylhydroperoxid (tBOOH).

In Abb. 4.4 bis 4.6 sind die mikroskopischen Bilder mit 10-facher Vergrößerung 72 Stunden (jeweils obere Reihe) und 144 Stunden (jeweils untere Reihe) der drei Zelllinien LN-229, A172 und U87 MG zusammengestellt.

Bei der Zelllinie LN-229 ließ sich nach Zugabe von ART eine morphologische Veränderung der Zellform und der Granularität beobachten. Die Granularität in den Zellen nahm zu, bis die Zelle sich dem nekrotischen Zelltod ähnelnd vom Boden der Zellkulturplatte ablöste und im Medium schwamm. Durch die Zugabe von TMZ durchliefen die Zellen der Zelllinie LN-229 ebenfalls eine morphologische Veränderung der Zellform und der Granularität. Die Zellen zeigten sich abgeflacht und wesentlich größer, auch die Zellkerne veränderten sich und nahmen deutlich an Größe zu. Zudem stieg die Granularität der Zellen an. Nur wenige Zellen lösten sich vom Boden ab, einige der Zellen zeigten eher apoptotischen Charakter und andere wiederum eher nekrotische Merkmale.

Die Zelllinie A172 zeigte sowohl nach Behandlung mit ART als auch nach Behandlung von TMZ eher den apoptotischen Zelltod. Auch hier veränderten sich die Zellformen und die Granularität der Zellen nahm zu. Nach ART-Zugabe wurden die Ausläufer der Zellen schmaler und der Zellkörper mit Nukleus wurde kugelig. Die Zellen nach TMZ-Zugabe zeigten sich wiederum abgeflacht und vergrößerten sowohl die Zelloberfläche als auch den Zellkern. Bei der Zelllinie U87 MG waren kaum Veränderungen nach Behandlung von ART und TMZ zu beobachten, somit war es hier nicht möglich, ein Ergebnis zur Tendenz der induzierten Zelltodart festzuhalten.

4.2.1.5 Untersuchung der ROS-Bildung in den Zelllinien und Nekrosomaktivität in der Zelllinie LN-229 nach Behandlung mit ART

Um der Frage nachzukommen, wieso es in der Zelllinie LN-229 zu einer so hohen Induktion der Nekrose kam (siehe Kapitel 4.2.1.3 und Abb. 4.3), wurde die Induktion der ROS über die Zeit gemessen und die Aktivität des Nekrosoms untersucht. Zudem wurde die sich aus den Analysen ergebende Hypothese bearbeitet, nach der eine höhere

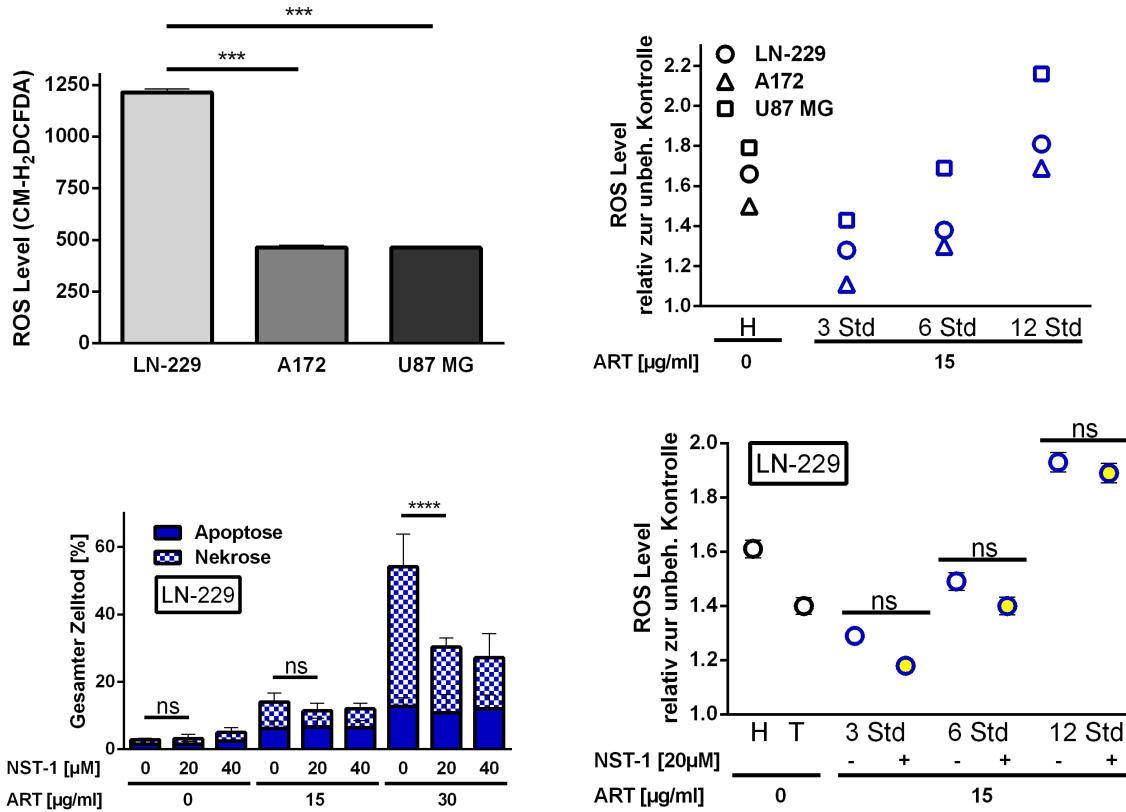


Abbildung 4.7: ART-Behandlung in Abhängigkeit von ROS-Bildung und Nekrosomaktivität. Vergleich des ROS-Levels der unbehandelten Zelllinien (oben links) und des ROS-Levels relativ zur unbehandelten Kontrolle der mit 15 µg/ml ART behandelten Zelllinien (oben rechts) in Abhängigkeit der Zeit. Als Positivkontrolle dient Wasserstoffperoxid (H). Zelltodanalyse der Zelllinie LN-229 72 Stunden nach ART-Behandlung in Abhängigkeit aufsteigender Nekrostatinkonzentrationen (unten links). Vergleich des ROS-Levels in der Zelllinie LN-229 nach ART-Behandlung in Abhängigkeit der Zeit und Nekrostatinbehandlung. Als Positivkontrolle dient Wasserstoffperoxid (H) und tert-Butylhydroperoxid (T). Die Unterschiede zu verschiedenen Zeitpunkten sind nicht signifikant (ns).

Induktion des Nekrosoms sowohl zum nekrotischen Zelltod als auch zu einem weiteren Anstieg der ROS führt.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen sind in Abb. 4.7 dargestellt. Der basale ROS-Level in der Zelllinie LN-229 war deutlich höher als in den beiden anderen Zelllinien, die in etwa den gleichen basalen ROS-Level zeigten (oben links). Nach ART-Behandlung stiegen die ROS-Level mit der Dauer der Behandlung stetig in allen drei Zelllinien weiter an. Hier unterschieden sich die beiden Zelllinien A172 und U87MG deutlich von einander. Bei der Zelllinie U87MG stieg der ROS-Level schneller an als in den anderen beiden. Besonders in der Zelllinie A172 erhöhte sich der ROS-Level langsamer über die Zeit.

Anhand der Ergebnisse mit Annexin/PI-Färbung (Abb. 4.7 unten links) war eine signifikante Aktivität des Nekrosoms nur nach einer hohen ART-Dosis von 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ detektierbar. Eine Konzentration von 20 μM des spezifischen Nekrosominhibitors Nekrostatin war ausreichend zur Hemmung der Nekrosomaktivität. Bei einer Konzentration von 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ART war keine signifikante Aktivität bzw. Hemmung der Aktivität zu messen.

Dieses Ergebnis wurde durch die ROS-Messung widerspiegelt. Nach einer Behandlung von 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ART war die Nekrosomaktivität nur gering und nahm mit der Dauer der ART-Behandlung weiter ab (Abb. 4.7 unten rechts).

4.2.1.6 Untersuchung der Genexpression der Zelllinie LN-229 nach Einzelbehandlung von ART und TMZ und in Kombination

Da sowohl für TMZ als auch für ART die Induktion von DNA-Schäden bekannt ist, aber der genotoxische Einfluss der Kombination hingegen noch nicht, wurde ein Screening spezifischer Proteine, die an einer DDR beteiligt sein können, bzw. deren Genregulation durchgeführt. Zur Genexpressionsanalyse der Zelllinie LN-229 nach Einzelbehandlung von ART und TMZ und in Kombination wurde ein PCR-Array mit über hundert Primern für spezifische Gene der DNA-Schadensantwort, DNA-Reparatur, Apoptose und

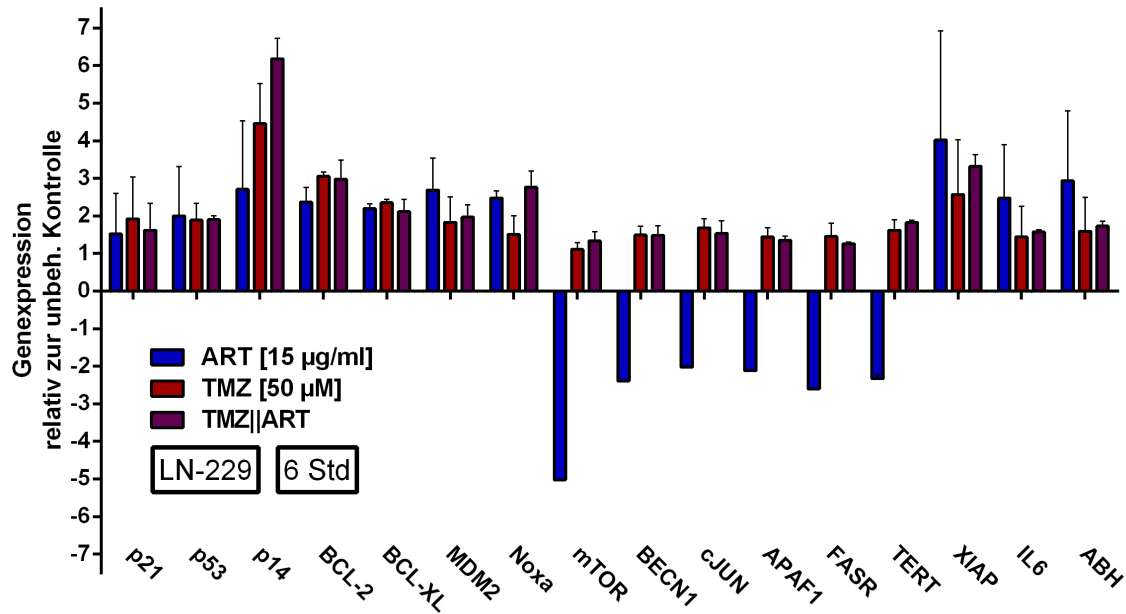


Abbildung 4.8: Expression ausgewählter Gene nach TMZ- und ART-Behandlung. Zusammenstellung der wiederholten PCRs der über 1.5-fach regulierten Gene aus einem durchgeführten PCR-Array (DNA-Repair-Array) der Zelllinie LN-229 sechs Stunden nach Einzelbehandlung von ART und TMZ und nach Kombinationsbehandlung mit simultaner Zugabe.

Autophagie genutzt. Bei einer Geninduktion über einen Wert von 1,5 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurden diese PCRs erneut dreimal wiederholt und anschließend analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.8 grafisch dargestellt.

Nach simultaner Gabe von ART und TMZ waren keine Genregulationen abweichend zur unbehandelten Kontrolle zu messen. Nach Einzelbehandlung von ART fielen sechs Gene auf, die im Vergleich zu Kontrolle herunter reguliert waren. Besonders das Gen für mTOR war über vierfach nach ART-Behandlung reprimiert.

4.2.1.7 Morphologische Untersuchung der Zelllinie LN-229 nach Einzelbehandlung mit ART und TMZ und simultaner Kombination von ART und TMZ

Um einen ersten visuellen Eindruck zur Wirkung der Kombinationsbehandlung zu bekommen, wurden die Zellen 72 Stunden und 144 Stunden nach Behandlung unter dem Mikroskop beobachtet. Repräsentative Bilder sind in Abb. 4.9 zusammengestellt.

Nach der Gabe der Einzeldosen verhielt sich die Zelllinie LN-229 analog zu den Beobachtungen der in Kapitel 4.2.1.4 beschriebenen Experimente. In der Kombinations-

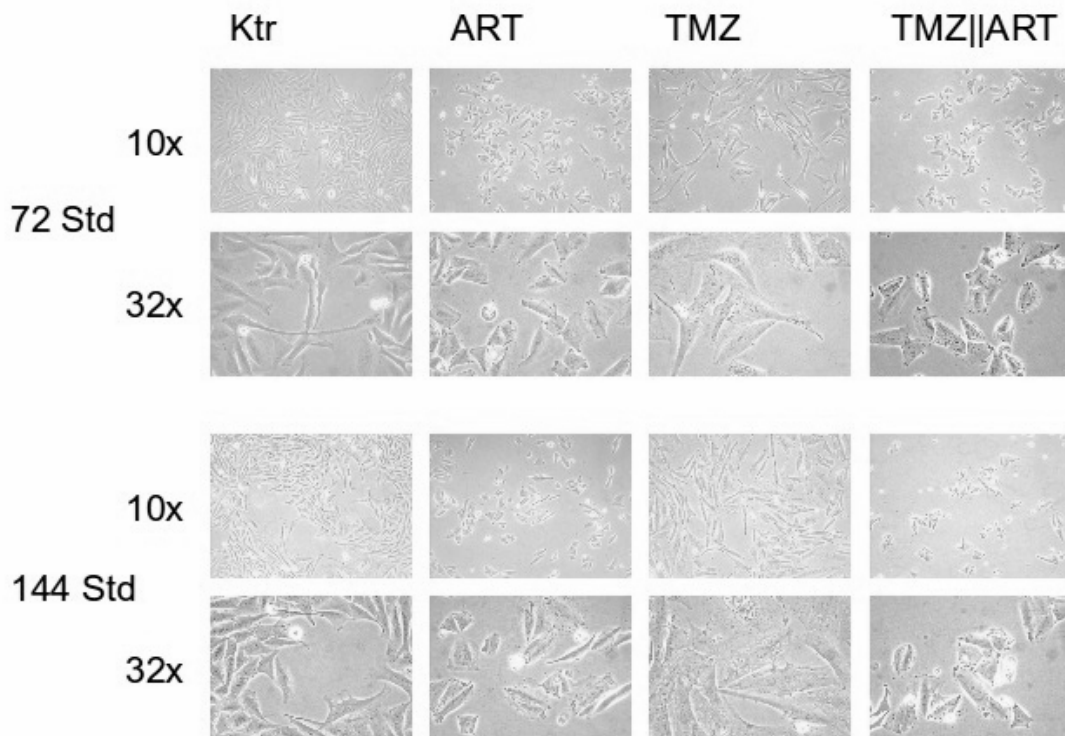


Abbildung 4.9: Morphologie der Zelllinie LN-229 nach ART- und TMZ-Behandlung. Lebendaufnahmen der Zelllinie LN-229 72 Stunden (oberer Block) und 144 Stunden (unterer Block) nach Einzelbehandlung von ART und TMZ und nach Kombinationsbehandlung mit simultaner Zugabe in 10-facher (jeweils obere Reihe) und 32-facher Vergrößerung (jeweils untere Reihe).

behandlung überwog die zelluläre Veränderung ähnlich wie nach alleiniger Gabe von ART. Die Zellen zeigten sich nicht abgeflacht und vergrößerten sich auch nicht wie nach TMZ-Einzelbehandlung. Stattdessen nahm die Granularität stark zu und die Zellen verkürzten ihre Ausläufer und wirkten somit in ihrer Form kantiger.

Die vielen Vesikel in den Zellen waren nach Kombinationsbehandlung besonders deutlich zu erkennen. Im Vergleich der Aufnahmen nach 72 Stunden zu denen nach 144 Stunden waren kaum Unterschiede auszumachen. Nur in den unbehandelten Zellen war eine deutliche Zunahme der Dichte an Zellen zu beobachten.

4.2.1.8 Zellzyklusanalyse der Zelllinie LN-229 nach Einzelbehandlung von ART und TMZ und in Kombination

Um die Auswirkungen der Behandlungen auf den Zellzyklus zu untersuchen, wurde der DNA-Gehalt mittels PI-Färbung am Durchflusszytometer gemessen. Durch ein besseres Verständnis der Abläufe in den Zellen nach den Einzelbehandlungen und der Kombination können eventuell effektivere Abfolgen für das Behandlungsschema definiert werden. Da ausschließlich der Zyklus von lebenden Zellen untersucht werden sollte, wurden die SubG1-Fraktionen (tote Zellen) gesondert dargestellt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.10 als Balkendiagramme aufgezeigt. Oben sind die SubG1-Daten gezeigt und unten sind die Zellzyklusphasen zusammengestellt.

Anhand der SubG1-Daten war bei simultaner Kombinationsbehandlung keine Verstärkung der Zelltodinduktion zu erkennen. In den Zellzyklen waren einige Unterschiede nach den Behandlungen zu beobachten. Nach Behandlung mit ART waren weniger Zellen in der S-Phase und deutlich mehr Zellen in der G2-Phase als in den unbehandelten Zellen. Wesentlich deutlicher war der G2-Block nach TMZ-Behandlung zu beobachten. Die G1-Phase und S-Phase waren kaum noch zu erkennen. Über die Zeit wurde der G2-Block weniger und die Population von Zellen mit einem DNA-Gehalt über 4n nahm zu. Diese Population an Zellen war deutlich niedriger nach Kombinationsbehandlung von ART und TMZ. Die G1-Phase war wesentlich weniger ausgeprägt als nach

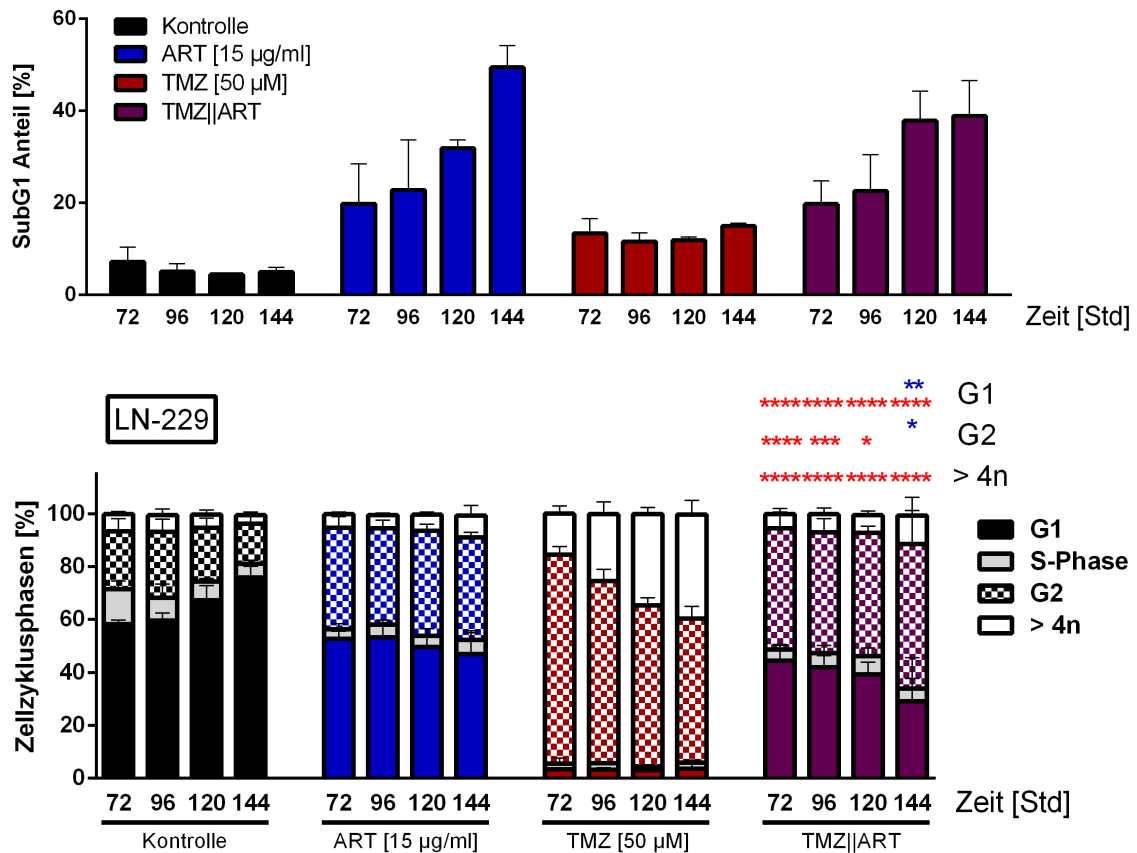


Abbildung 4.10: Apoptose- und Zellzyklusanalysen der Zelllinie LN-229 nach ART- und TMZ-Behandlung. Apoptoseanalyse als SubG1 Anteil (oben) und Zellzyklusanalysen ohne SubG1 Anteil (unten) der Zelllinie LN-229 von 72 Stunden bis 144 Stunden nach Einzelbehandlung von ART und TMZ und nach Kombinationsbehandlung mit simultaner Zugabe. Die Signifikanzen zur Kombinationsbehandlung sind für ART (blau) und TMZ (rot) getrennt für die Phasen G1, G2 und >4n dargestellt. Unterschiede in den S-Phasen sind nicht signifikant.

ART-Zugabe alleine, aber wesentlich höher als nach alleiniger TMZ-Behandlung. Ein G2-Block war gut zu erkennen, der mit der Zeit weiter zunahm.

4.2.1.9 Untersuchung der DNA-Schäden der Zelllinie LN-229 nach Einzelbehandlung von ART und TMZ und in Kombination

Eine der ersten sich aus den genotoxischen Eigenschaften von TMZ und ART entwickelnde Hypothese besagt, dass die DSB akkumulieren und in der Kombinationsbehandlung in der Anzahl höher sind als in den Einzelbehandlungen. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden die DNA-Schäden nach den Behandlungen quantifiziert. Da die Zeitpunkte der höchsten Intensität an DNA-Schäden bei den beiden Substanzen mit 48 Stunden bei TMZ und acht Stunden bei ART deutlich auseinanderlagen, wurden diese entsprechend kombiniert, sodass die beiden Höhepunkte genau aufeinanderfielen.

Dazu wurden die Zellen 24 Stunden nach Aussaat mit TMZ behandelt und 40 Stunden nach TMZ-Behandlung mit ART behandelt. Acht Stunden nach ART-Behandlung (entspricht 48 Stunden nach TMZ-Behandlung) wurden die Zellen fixiert (siehe dazu auch Abb. 4.11).

Zur Bestimmung der DNA-Schadensmenge wurden die γ H2AX-Foci mittels Fluoreszenzmikroskopie ermittelt und quantifiziert. Die Zellen der Zelllinie LN-229 wurden 48 Stunden nach TMZ-Behandlung fixiert, gefärbt und mikroskopiert. Repräsentative Bilder sind oben in Abb. 4.12 gezeigt. Darunter ist die quantitative Auswertung der Versuche als Balkendiagramm aufgeführt.

Die γ H2AX-Foci akkumulierten nach den Einzeldosen sowohl von ART mit 15 μ g/ml als auch von TMZ mit 50 μ M. Nach ART-Behandlung lagen die Mittelwerte mit 25 γ H2AX-Foci pro Zelle deutlich unter denen nach TMZ-Behandlung, die Mittelwerte nach TMZ-Behandlung lagen deutlich über 100 γ H2AX-Foci pro Zelle. Nach der Kombinationsbehandlung mit TMZ und ART lagen die Mittelwerte der γ H2AX-Foci pro Zelle nur wenige Foci über denen der TMZ-Einzelbehandlung.

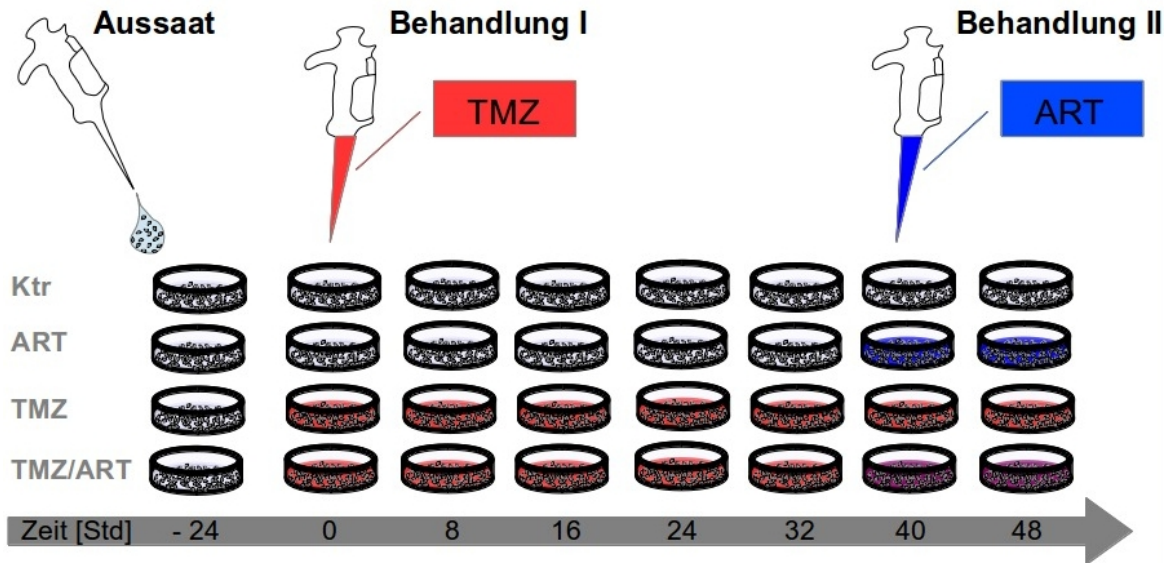


Abbildung 4.11: Behandlungsschema zur zeitversetzten Behandlung von ART und TMZ. *Behandlungsschema zur zeitversetzten Behandlung 48 Stunden nach TMZ-Behandlung und 8 Stunden nach ART-Behandlung.*

4.2.1.10 Zelltoduntersuchung der drei Zelllinien zur Anpassung der Kombinationsbehandlung von ART und TMZ

Zur Anpassung der Kombinationsbehandlung wurde der induzierte Zelltod nach Einzel- und Kombinationsbehandlung durch Annexin/PI-Färbung und mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Alle Zellen wurden 144 Stunden nach TMZ-Behandlung geerntet und analysiert. Das ART wurde an verschiedenen Tagen zu den Zellen gegeben, um das Behandlungsschema in Abhängigkeit der zeitlichen Kombination mit ART zu untersuchen. Die Ergebnisse der Zelllinien sind in Abb. 4.13 grafisch dargestellt. Wurde ART 72 Stunden nach TMZ-Behandlung zu den Zellen dazugegeben, war die Zelltodinduktion besonders effektiv.

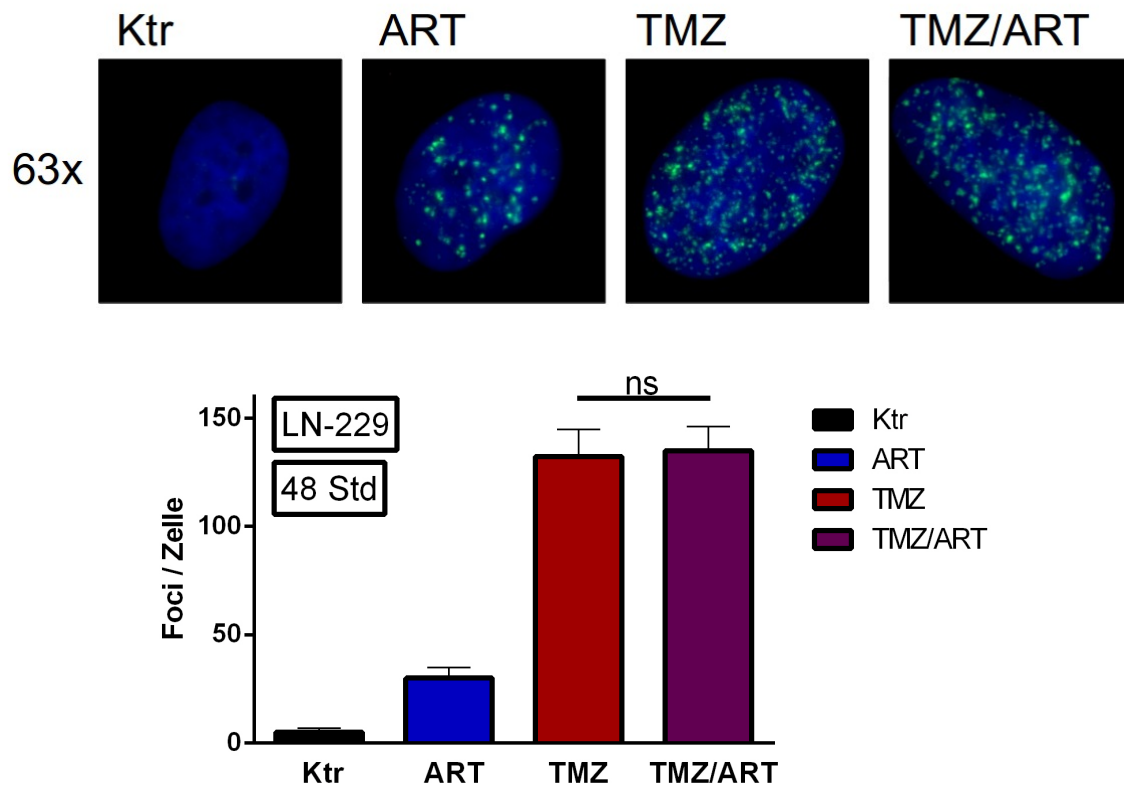


Abbildung 4.12: DNA-Schäden (gemessen als γ H2AX-Foci) der Zelllinie LN-229 nach ART- und TMZ-Behandlung. Repräsentative IF-Bilder der Zelllinie LN-229 48 Stunden nach TMZ-Behandlung und 8 Stunden nach ART-Behandlung (oben): die Zellkerne sind blau und γ H2AX-Foci grün dargestellt. Quantitative Auswertung des Versuchs, die die mittlere Anzahl der Foci pro Zelle nach Einzelbehandlung von 15 μ g/ml ART und 50 μ M TMZ und nach Kombinationsbehandlung zeigt (unten).

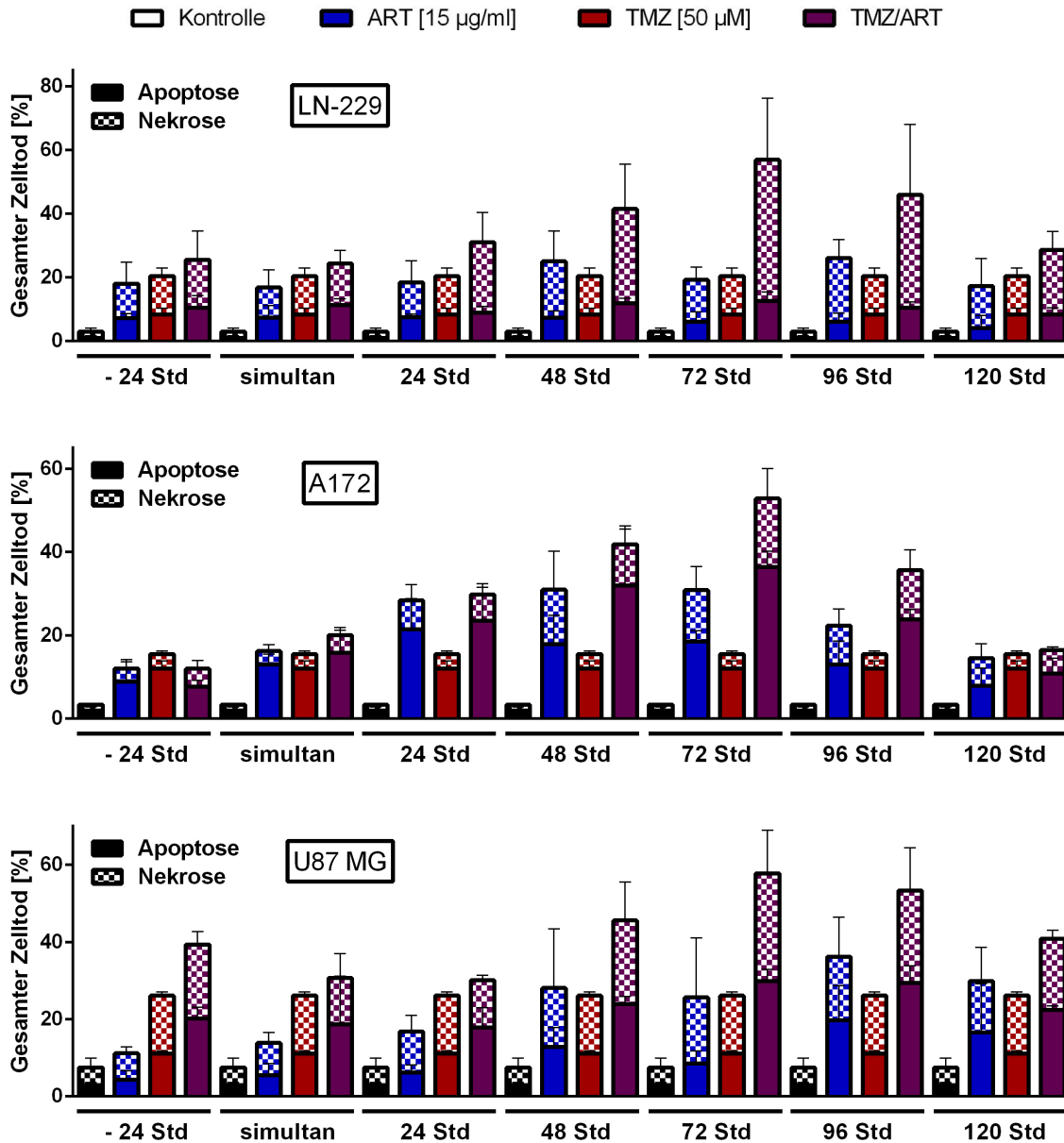


Abbildung 4.13: Anpassung der Kombinationsbehandlung von ART und TMZ. Gesamter Zelltod der Zelllinien LN-229 (oben), A172 (Mitte) und U87 MG (unten) mittels Durchflusszytometrie 144 Stunden nach TMZ-Behandlung in Abhängigkeit der Zugabe von ART von 24 Stunden vor TMZ-Zugabe (-24 Std) bis 120 Stunden nach TMZ-Behandlung (120 Std).

4.2.1.11 Untersuchung der Sensitivität der drei Zelllinien auf die angepasste Kombinationsbehandlung von ART und TMZ

Zur weiteren Untersuchung der Sensitivität der Zelllinien auf die angepasste Kombinationsbehandlung und deren Auswirkung auf die Proliferation wurde das Behandlungsschema auf die Koloniebildung übertragen und analysiert. Zunächst wurden die Zellen mit TMZ behandelt, 72 Stunden danach mit verschiedenen ART-Konzentrationen. Zwölf bis sechzehn Tage nach Aussaat wurden die Kolonien analysiert. Die Ergebnisse sind als Rohdaten und normiert in den Überlebenskurven in Abb. 4.14 dargestellt.

In den Zelllinien LN-229 (links) und A172 (Mitte) war deutlich eine konzentrationsabhängige Sensitivierung nach ART-Zugabe zu beobachten, da die Kurven mit Kombinationsbehandlung unter der Kurve der Zellen lagen, die nur mit TMZ behandelt wurden. Bei der Zelllinie U87MG gab es eine deutliche Abweichung zu den anderen Zelllinien. Bei der höchsten Konzentration von ART und den höchsten Konzentrationen von TMZ war die Sensitivität in der Kombinationsbehandlung geringer als in der Einzelbehandlung mit TMZ.

4.2.1.12 Untersuchung der Zellzahlabhängigkeit auf die Induktion des Zelltods nach Behandlung von TMZ und ART

Während der Behandlung der Zelllinie LN-229 mit ART konnte beobachtet werden, dass je nach Zellzahl die Intensität der Zelltodinduktion unterschiedlich stark ausfiel. Dies legte die Hypothese nahe, dass die Wirkung von ART zellzahlabhängig ist. Um die Abhängigkeit für beide Behandlungen mit TMZ und ART zu untersuchen, wurden verschiedene Zellzahlen von LN-229 ausgesät und für 144 Stunden mit TMZ bzw. 72 Stunden mit ART behandelt. Bei der Behandlung mit ART hatte die Zellzahl eine große Auswirkung auf die Induktion des Zelltods, die mit der Konzentration von ART anstieg. Bei 15 und 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ stieg der Zelltod von den ausgesäten 40.000 Zellen auf das mehr als vierfache bei 100.000 ausgesäten Zellen an. Im Gegensatz dazu hatte jedoch bei der Behandlung mit TMZ die Zellzahl kaum Einfluss auf die Induktion

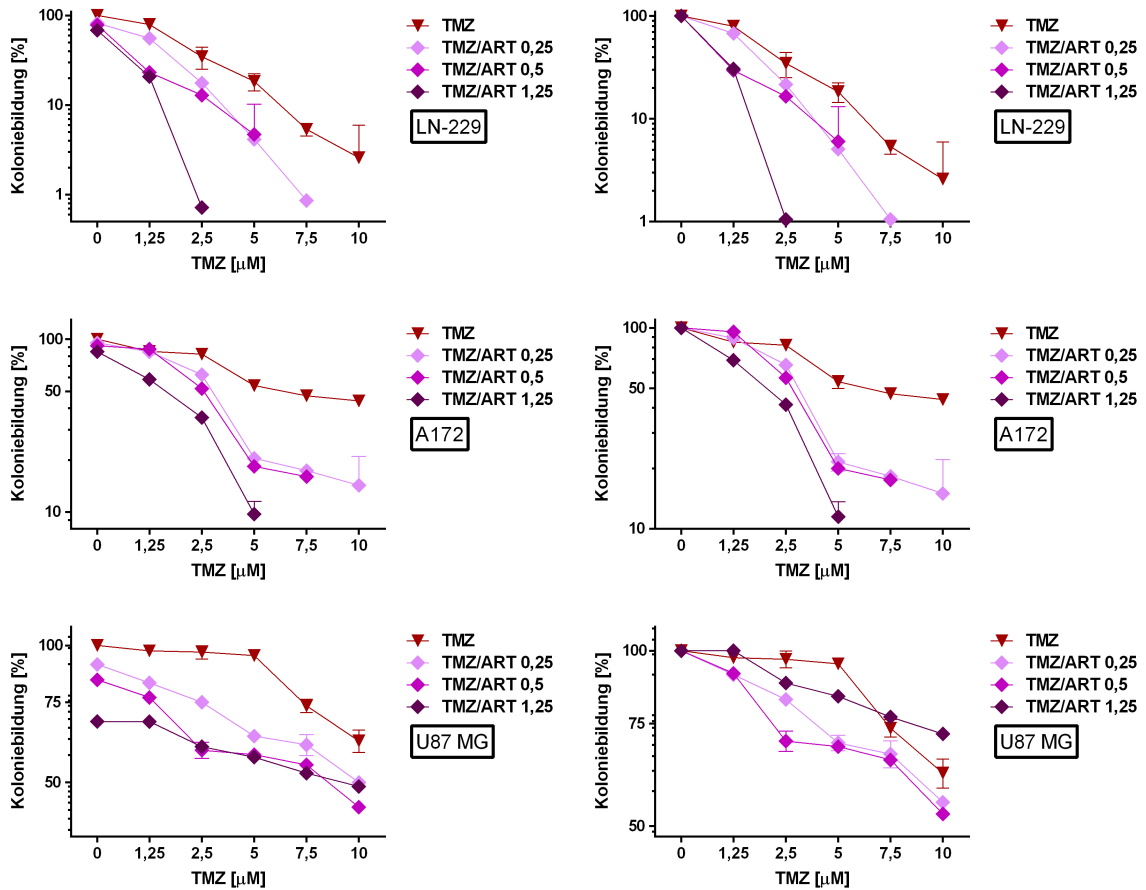


Abbildung 4.14: Zytotoxische Wirkung der Kombinationsbehandlung von TMZ und ART auf Glioblastomzellen. Kolonien ausgesäter Zellen der Zelllinien LN-229 (oben), A172 (Mitte) und U87MG (unten) nach TMZ-Behandlung in Abhängigkeit der Zugabe von ART 72 Stunden nach TMZ-Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von ART (links) und nach Normierung der aufsteigenden Konzentrationen von ART (rechts).

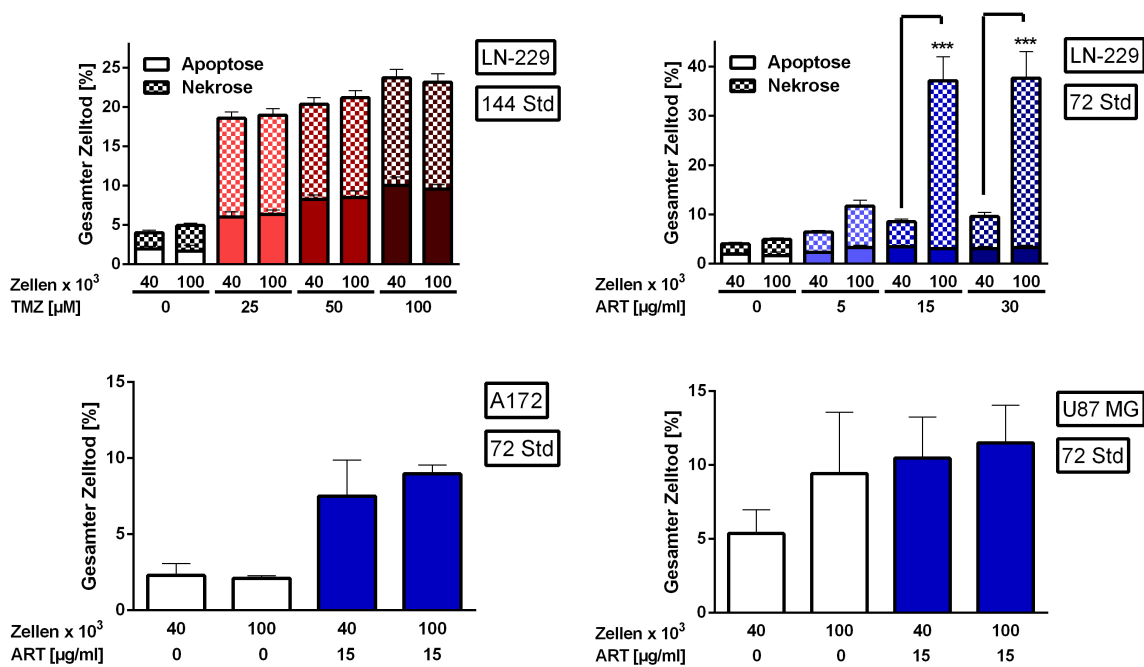


Abbildung 4.15: Analyse der Zellzahlabhängigkeit der Einzelbehandlungen von TMZ und ART. Zelltodanalyse der Zelllinie LN-229 144 Stunden nach TMZ-Behandlung (oben links) und 72 Stunden nach ART-Behandlung (oben rechts) in Abhängigkeit der Behandlungsdosen und der ausgesäten Zellzahlen. Zelltodanalysen der Zelllinien A172 (unten links) und U87MG (unten rechts) 72 Stunden nach ART-Behandlung von 15 $\mu\text{g/ml}$ in Abhängigkeit der ausgesäten Zellzahlen.

des Zelltods. Die Ergebnisse der Zelltodanalysen der Zelllinie LN-229 sind oben in Abb. 4.15 dargestellt. Darunter folgen die Ergebnisse der Zelllinien A172 und U87MG für die Messung 72 Stunden nach der Behandlung mit 15 $\mu\text{g/ml}$ ART. Im Gegensatz zur Zelllinie LN-229 waren bei den anderen beiden Zelllinien keine Abhängigkeiten von den ausgesäten Zellzahlen zu erkennen.

4.2.1.13 Anpassung der Zellzahl der Zelllinie LN-229 auf das neue Behandlungsschema von TMZ und ART

Nach Bestätigung der Zellzahlabhängigkeit wurden die Versuche zur Kombinationsbehandlung entsprechend neu angesetzt. Um die gleichen Voraussetzungen vor ART-Behandlung zu schaffen und somit zur Behandlung von ART die gleichen Zellzahlen in allen Schalen vorliegen zu haben, wurden die Zellzahlen zur Aussaat so gewählt, dass zum Zeitpunkt der Zugabe von ART in allen Schalen die gleichen Zellzahlen vorlagen. Anschließend wurde die Untersuchung des Behandlungsschemas analog dem in Kapitel 4.2.1.10 beschriebenen Versuch bis ART-Zugaben 72 Stunden nach TMZ-Zugabe wiederholt und 144 Stunden nach TMZ-Behandlung ausgewertet. Die Ergebnisse der Zelltodanalyse sind in Abb. 4.16 dargestellt. Das neue Behandlungsschema ist oben in Abb. 4.17 in einer schematischen Zeichnung dargestellt.

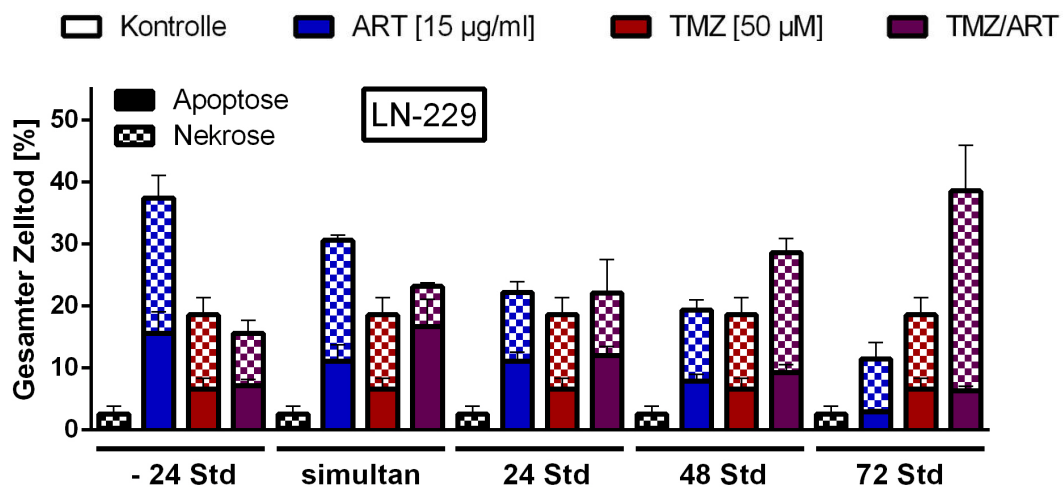


Abbildung 4.16: Anpassung des Behandlungsschemas und der Zellzahl bei der Zelllinie LN-229. Zelltodanalysen der Zelllinie LN-229 144 Stunden nach TMZ-Behandlung in Abhängigkeit der Zugabe von ART von 24 Stunden vor TMZ-Zugabe (-24 Std) bis 72 Stunden nach TMZ-Behandlung (72 Std), wobei die Zellzahlen bei ART-Zugabe der Zellzahl der unbehandelten Kontrollen und der TMZ-behandelten Zellen entsprechen.

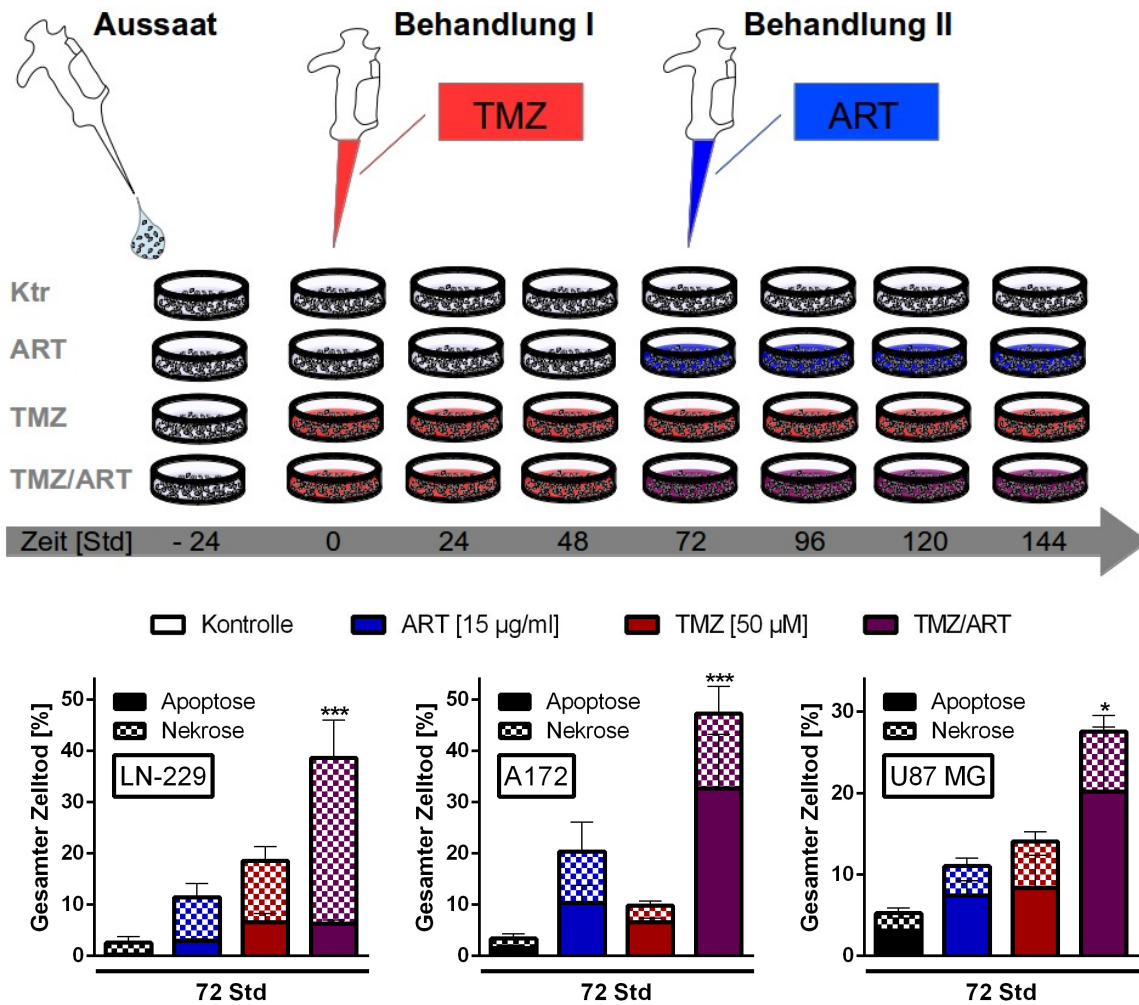


Abbildung 4.17: Neues Behandlungsschema entsprechend ART-Zugabe 72 Stunden nach TMZ-Behandlung. Versuchsschema für die Behandlung von ART-Zugabe 72 Stunden nach TMZ-Behandlung (oben). Gegenüberstellung der Zelllinien LN-229 (unten links), A172 (unten Mitte) und U87MG (unten rechts) mittels Zelltodanalyse unter Verwendung des Behandlungsschemas von ART-Zugabe 72 Stunden nach TMZ-Behandlung. Die Zellzahlen bei ART-Zugabe sind angepasst. Es sind die Signifikanzen von ART und TMZ zur Kombinationsbehandlung dargestellt.

4.2.1.14 Untersuchung des neuen Behandlungsschemas von TMZ und ART auf die Induktion des Zelltodes

Die entsprechenden Zellzahlen wurden in die Schalen ausgesät. Vierundzwanzig Stunden nach der Aussaat wurden die Zellen mit TMZ behandelt. Die ART-Behandlung folgte 72 Stunden nach der TMZ-Behandlung. Für die verschiedenen Analysen wurden die Zellen 72 bis 144 Stunden nach TMZ-Behandlung geerntet oder direkt fixiert und anschließend analysiert. Für die Zelltodanalyse zur Bestimmung der Effektivität des neuen Behandlungsschemas für alle drei Zelllinien wurden die Zellen nach 144 Stunden geerntet und mittels Annexin/Pi-Färbung und Durchflusszytometer analysiert. Die Ergebnisse für die Zelllinien LN-229 (links), A172 (Mitte) und U87 MG (rechts) sind unten in Abb. 4.17 dargestellt. Bei allen drei Zelllinien konnte durch die Kombinationsbehandlung von ART und TMZ die Induktion des Zelltods gesteigert werden. Besonders bei der Zelllinie A172 konnte der Zelltod von unter 20 % bei den Einzelbehandlungen auf über 40 % in der Kombinationsbehandlung gesteigert werden.

Wenn nicht explizit anders erwähnt, wurden die weiteren Versuche und Analysen unter Verwendung des neuen Behandlungsschemas durchgeführt.

4.2.1.15 Untersuchung der Induktion von DNA-Schäden nach Behandlung von TMZ und ART

Nach Etablierung des neuen Behandlungsschemas wurden einige Hypothesen erneut überprüft. Zur Untersuchung der induzierten DNA-Schäden nach dem neuen Behandlungsschema wurden die Zellen 96 Stunden nach TMZ-Behandlung (24 Stunden nach ART-Behandlung) fixiert. Mittels Immunfluoreszenzfärbung wurden die γ H2AX-Foci im Zellkern quantifiziert. Repräsentative IF-Bilder der einzelnen Zelllinien und Behandlungen sind oben in Abb. 4.18 in 63-facher Vergrößerung dargestellt. Die quantitative Auswertung des Versuchs für alle drei Zelllinien ist in Abb. 4.19 gezeigt.

In keiner Zelllinie war eine deutliche Steigerung der DNA-Schäden in der Kombinationsbehandlung zu beobachten. Bei der Zelllinie A172 war eher eine Minderung der

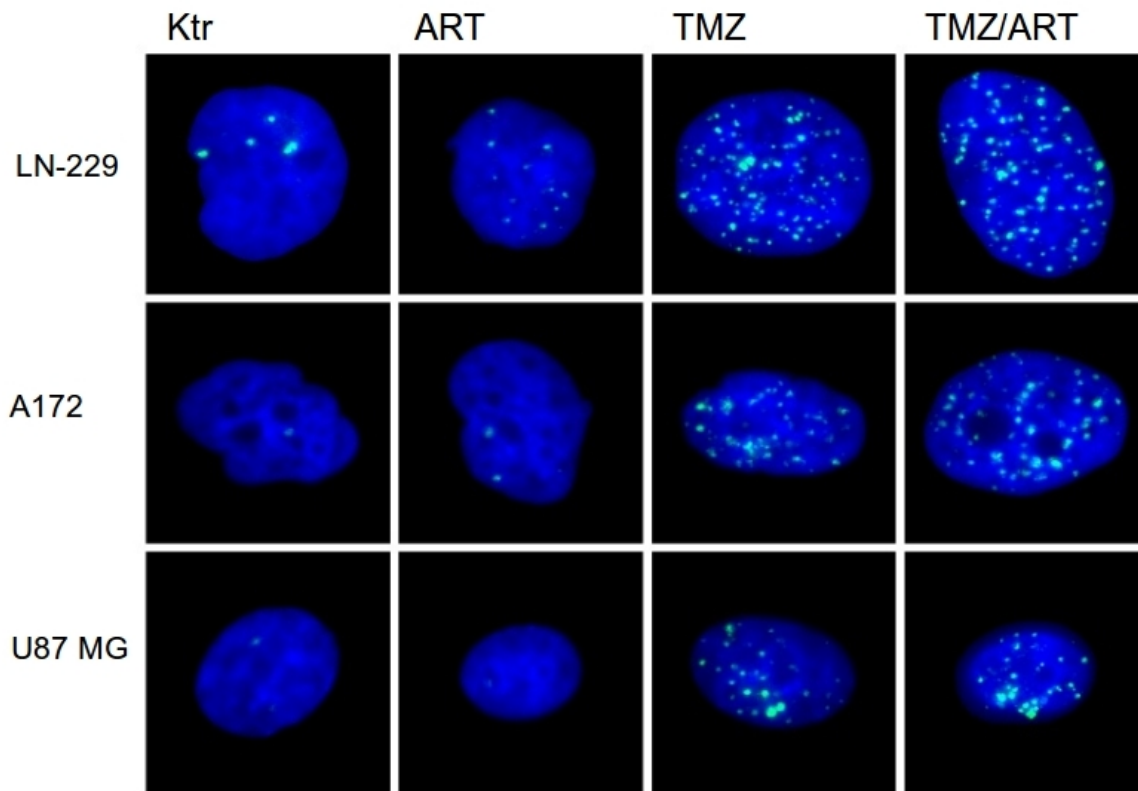


Abbildung 4.18: DNA-Schäden der Zelllinien nach neuem Behandlungsschema. Repräsentative IF-Bilder in 63-facher Vergrößerung der drei Zelllinien 96 Stunden nach TMZ-Behandlung und 24 Stunden nach ART-Behandlung. Die Zellkerne sind blau und γ H2AX-Foci grün dargestellt.

Schäden in der Kombinationsbehandlung im Vergleich zu der Einzelbehandlung mit TMZ zu erkennen. Die direkte Gegenüberstellung der quantitativen Auswertung des Versuchs mit der Zelllinie LN-229 ohne und mit Zugabe von Nekrostatin (unten rechts) zeigte eine deutliche Minderung der γ H2AX-Foci in der Kombinationsbehandlung mit Nekrostatin zu der Einzelbehandlung von TMZ und Nekrostatin.

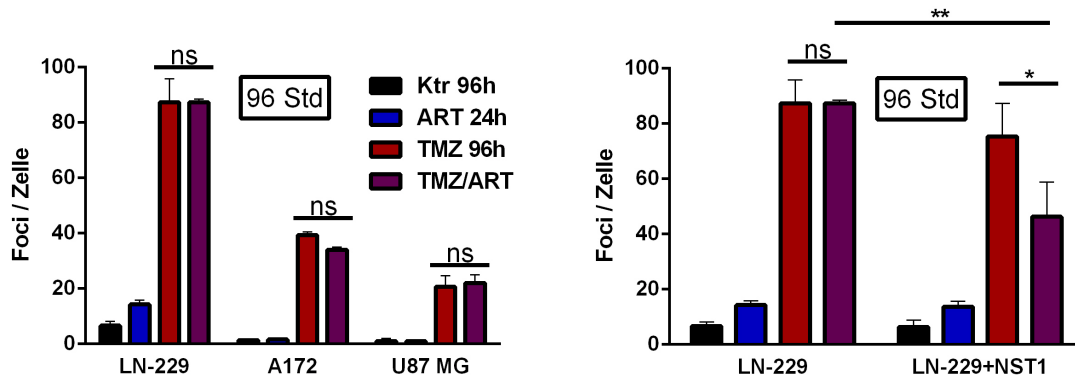


Abbildung 4.19: Quantitative Auswertung der DNA-Schäden nach neuem Behandlungsschema. Die quantitative Auswertung des Versuchs für alle drei Zelllinien zeigt die mittlere Anzahl der Foci pro Zelle nach Einzelbehandlung von ART und TMZ und nach Kombinationsbehandlung (links). Die direkte Gegenüberstellung der quantitativen Auswertung des Versuchs mit der Zelllinie LN-229 ohne und mit Zugabe von Nekrostatin (rechts).

4.2.1.16 Untersuchung des Proteinexpressionsprofils zum induzierten Zelltod

Zur Analyse der Induktion des Zelltods wurde das Expressionsprofil der Zelllinien auf verschiedene Proteine untersucht, die an der Induktion und dem Prozess des Zelltods beteiligt sein könnten. Die Zellen wurden nach dem neuen Behandlungsschema ausgesät und behandelt. Sechshundneunzig Stunden nach TMZ-Behandlung wurden die Zellen geerntet und die Proteine isoliert und analysiert. Das resultierende Expressionsprofil ist in Abb. 4.20 aufgeführt.

Im Expressionsprofil der Zelllinie LN-229 (oben in Abb. 4.20) waren keine signifikanten Unterschiede in der Kombinationsbehandlung zu den Einzelbehandlungen zu beobachten. Zudem waren die hier untersuchten Proteine maximal zweifach zur unbehandelten Kontrolle hochreguliert. Bei der Zelllinie A172 (Mitte in Abb. 4.20) zeigte sich bei der Kaspase 1 und dem gespaltenen PARP eine deutliche Regulation nach Behand-

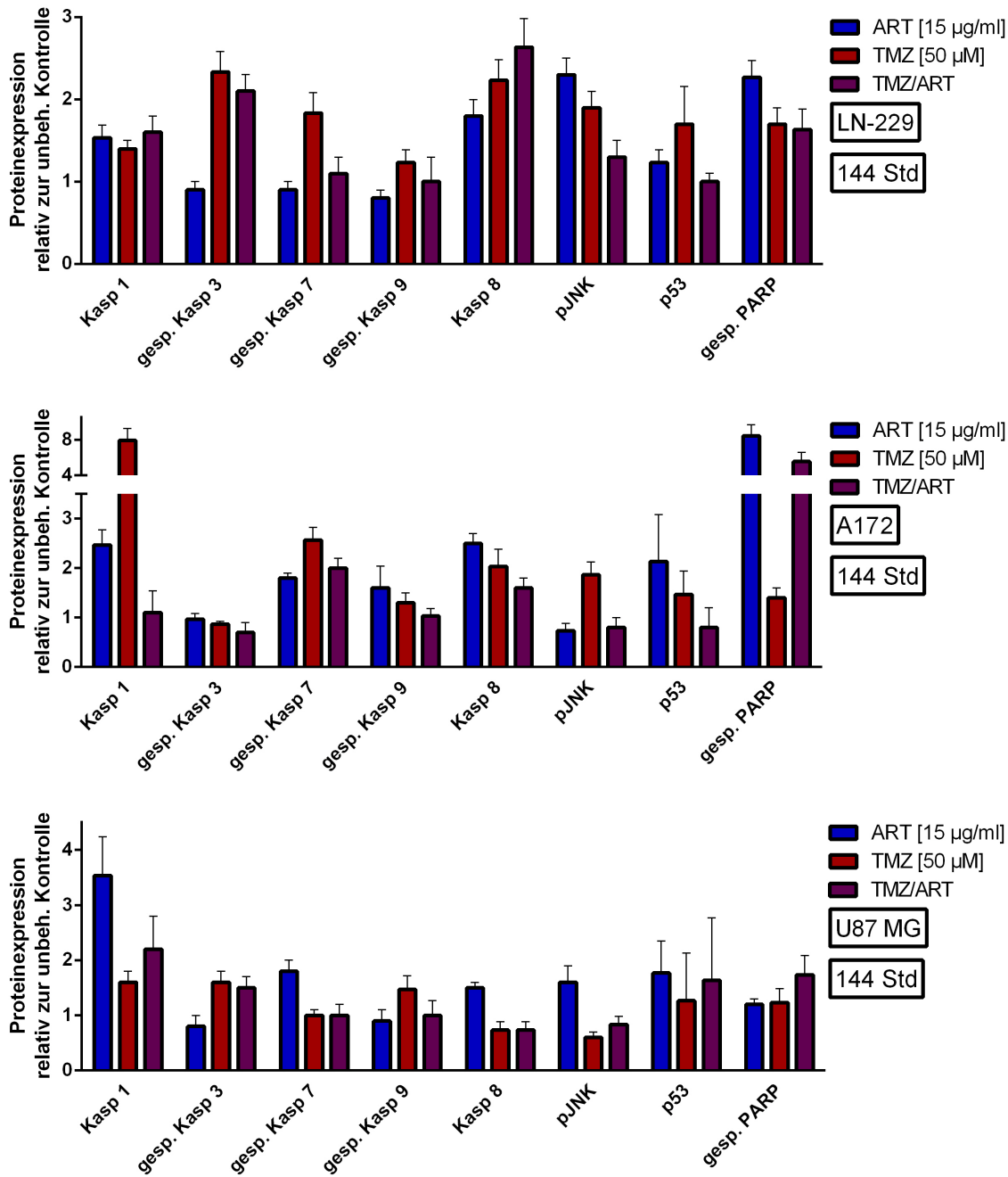


Abbildung 4.20: Zelltodanalyse der Zelllinien nach neuem Behandlungsschema. Expressionsanalyse Zelltod-relevanter Proteine der Zelllinien LN-229 (oben), A172 (Mitte) und U87MG (unten) nach neuem Behandlungsschema. Die Proteinexpression der Einzelbehandlungen von ART und TMZ und der Kombinationsbehandlung ist relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt.

lung. Nach ART-Behandlung und nach der Kombinationsbehandlung war das gespaltene PARP über siebenfach höher exprimiert als in der unbehandelten Kontrolle. Nach TMZ-Behandlung war in dieser Zelllinie nicht einmal eine zweifach höhere Regulation zu messen. Bei der Kaspase 1 war eine über siebenfache Hochregulation nach TMZ-Behandlung zu beobachten. Obwohl nach ART-Behandlung ebenfalls eine zweifache Hochregulation zu messen war, war in der Kombinationsbehandlung kein Unterschied zur unbehandelten Kontrolle zu sehen. Umgekehrt zum Expressionsprofil der Zelllinie A172 zeigte die Zelllinie U87 MG (unten in Abb. 4.20) bei der Kaspase 1 eine deutliche Hochregulation nach ART-Behandlung und kaum einen Unterschied zur unbehandelten Kontrolle nach TMZ-Behandlung. Auch nach der Kombinationsbehandlung war nur eine knapp zweifache Hochregulation zu beobachten. Alle anderen untersuchten Proteine zeigten bei der Zelllinie U87 MG eine Regulation weit unter einem Wert von zwei. Repräsentative Bilder der Westernblots von Kaspase 1 und dem gespaltenen PARP sind in Abb. 4.21 für alle drei Zelllinien dargestellt.

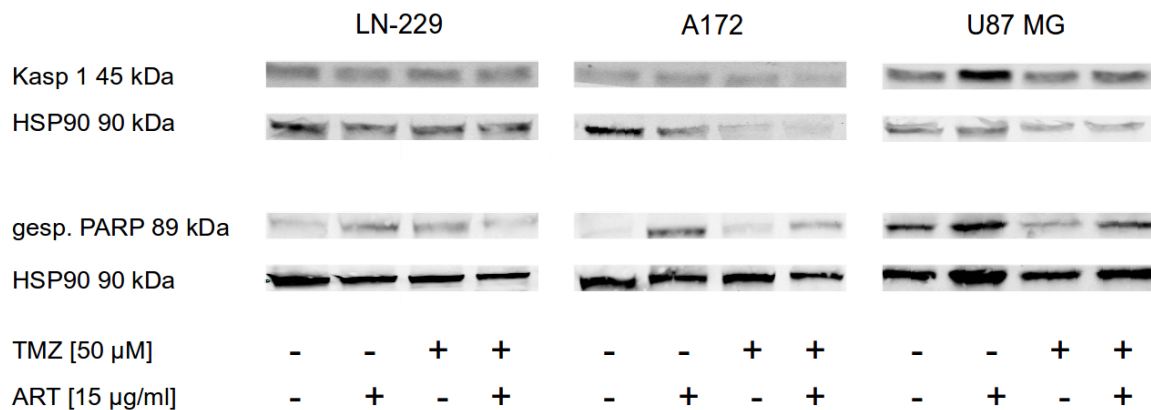


Abbildung 4.21: Westernblots der Zelllinien für Kaspase 1 und PARP. *Repräsentative Westernblots von Kaspase 1 und gespaltenem PARP der Zelllinien LN-229 (links), A172 (Mitte) und U87 MG (rechts). Die Proteinisolierung erfolgte 96 Stunden nach TMZ-Behandlung. Das Protein HSP90 wurde als Auftragskontrolle verwendet.*

4.2.1.17 Untersuchung zur Zelltodanalyse von Apoptose und Nekrose

Um die Art des Zelltods genauer zu analysieren, wurde die Wirkung spezifischer Marker der Nekrose und Apoptose auf den durch TMZ und ART induzierten Zelltod untersucht. Da die Kaspase 8 ein entscheidender Faktor in der Art der Zelltodinduktion zwischen Apoptose und Nekrose ist (siehe Kapitel 1.5.1.3), wird diese hier noch mal genauer untersucht. Besonders zwischen den Zelllinien LN-229 und A172 ist der Unterschied in der Induktion der beiden Zelltodarten groß (siehe Kapitel 4.2.1.3). In der Expression von Kaspase 8 waren allerdings kaum Unterschiede zu sehen, obwohl die Tendenzen von den Einzelbehandlungen hin zur Kombination gegenläufig waren. Nach TMZ-Behandlung lag die Expression für das Protein Kaspase 8 bei beiden Zelllinien bei einem Wert von zwei (siehe Abb. 4.22).

Durch eine Vorbehandlung mit Interferon β kann die Kaspase 8-Expression gesteigert werden [Heylmann (2011)]. Der Einfluß der Kaspase 8-Expression auf den Zelltod wurde anschließend durch die Zelltodanalyse mittels Annexin/PI-Färbung und Durchflusszytometer untersucht. Zudem wurde die Induktion der Zelltodarten Nekrose und Apoptose durch spezifische Inhibitoren studiert. Für die Nekrose wurde der Inhibitor Nekrostatin verwendet und für die Apoptose der Inhibitor ZVADfmk. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 4.22 dargestellt. Links sind die Ergebnisse der Untersuchungen nach Vorbehandlung von Interferon β und den Behandlungen mit TMZ und Nekrostatin gezeigt, rechts sind die Behandlungen nach dem neuen Behandlungsschema in Abhängigkeit von Nekrostatin und ZVADfmk abgebildet.

Bei der Zelllinie LN-229 steigerte die Vorbehandlung von Interferon β den induzierten Zelltod von TMZ um 10 %, das Nekrostatin zeigte nur in Kombination mit TMZ und Interferon β eine zelltodinhibierende Wirkung. Diese Inhibition war etwas stärker in der Nekrose als in der Apoptose sichtbar. Die Zelllinie A172 reagierte viel intensiver auf die Vorbehandlung von Interferon β als die Zelllinie LN-229. Die Zelltodinduktion von TMZ wurde durch die Vorbehandlung von Interferon β auf das Dreifache gesteigert. Das Nekrostatin zeigte in dieser Zelllinie absolut keinen Einfluss auf die Zelltodinduktion.

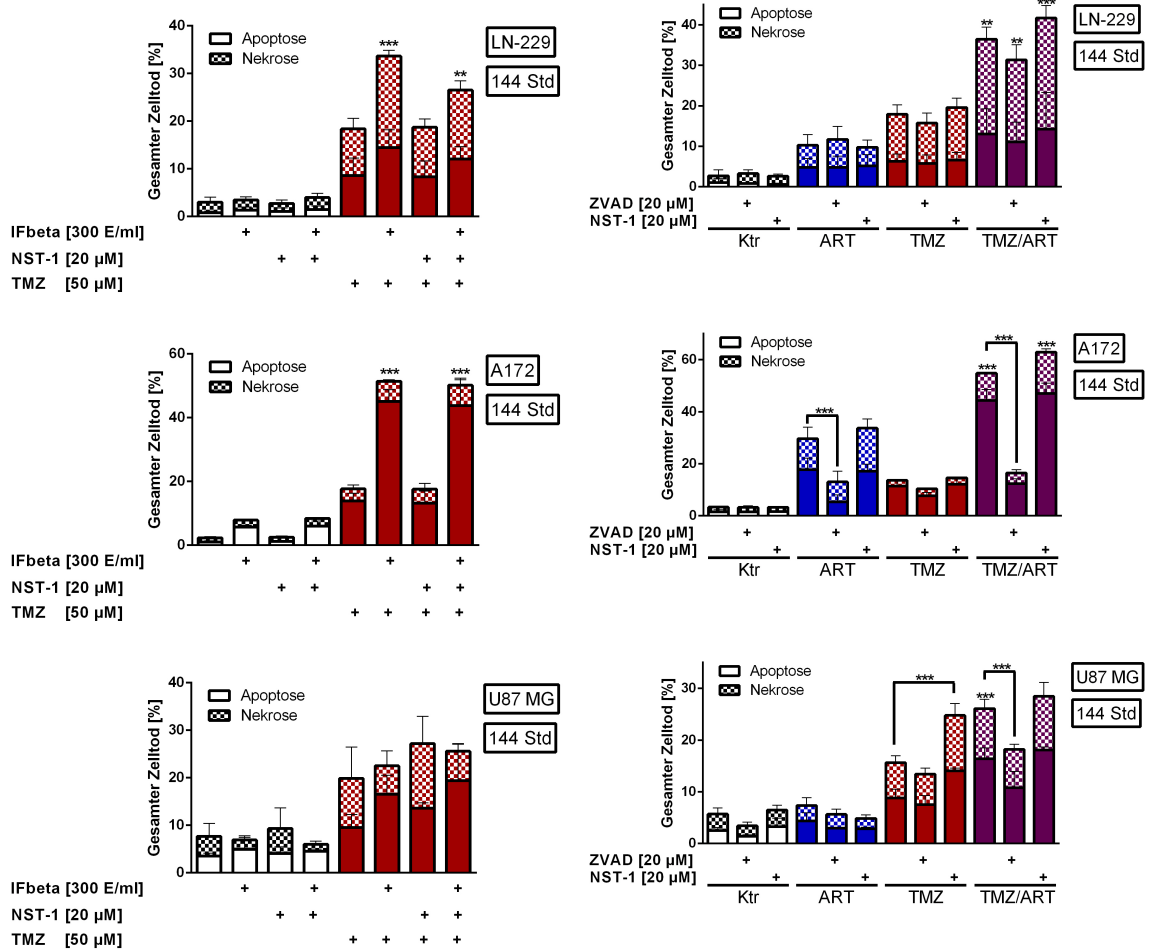


Abbildung 4.22: Zelltodanalyse der Zelllinien in Abhängigkeit des Apoptose- und Nekrose-Signalwegs. Zelltodanalyse mittels Durchflusszytometrie der Zelllinien LN-229 (oben), A172 (Mitte) und U87 MG (unten) 144 Stunden nach TMZ-Behandlung. Die Analyse wird mit und ohne Vorbehandlungen von Interferon β und Nekrostatin (linke Spalte) und des Kaspase Inhibitors ZVADfmk und Nekrostatin nach neuem Behandlungsschema (rechte Spalte) durchgeführt. Dargestellte Signifikanzen ohne direkten Verweis beziehen sich auf alle anderen Einzeldosen.

Ebenso zeigte die Vorbehandlung von Interferon β und auch die Behandlung durch Nekrostatin bei der Zelllinie U87MG keine Wirkung.

Innerhalb des Behandlungsschemas waren die Wirkungen von Nekrostatin denen in der Kombination von TMZ in den Zelllinien LN-229 und A172 gleich. Nur die Zelllinie U87MG zeigte nach TMZ und Nekrostatin-Behandlung eine deutliche Zunahme von Apoptose und Nekrose. Die Behandlung mit ZVADfmk führte zur Abnahme des induzierten Zelltods, besonders die Apoptose wurde reduziert. Dieses Bild zeigte sich in allen drei Zelllinien, aber besonders die Zelllinie A172 zeigte eine drastische Abnahme der Apoptose in der Kombinationsbehandlung. Die Abnahme der Apoptose nach ZVADfmk-Behandlung war in dieser Zelllinie auch schon in der Einzelbehandlung von ART zu beobachten. Hier nahm sowohl die Apoptose als auch die Nekrose ab.

4.2.1.18 Morphologische Untersuchung der Zelllinie LN-229 nach Einzelbehandlung mit ART und TMZ und Kombination von ART und TMZ

Um einen besseren Eindruck zur Wirkung der Kombinationsbehandlung nach dem neuen Behandlungsschema zu bekommen, wurden die Zellen 144 Stunden nach Behandlung unter dem Mikroskop beobachtet. Repräsentative Bilder sind in Abb. 4.23 zusammengestellt.

Wie bei der Untersuchung zur simultanen Gabe von ART und TMZ (siehe Kapitel 4.2.1.7) verhielten sich die Zellen nach der Gabe der Einzeldosen gleich. Nach Kombinationsbehandlung überwog die zelluläre Veränderung ähnlich der nach ART-Einzeldosis. Die Zellen zeigten sich nicht abgeflacht und vergrößert wie nach TMZ-Einzelbehandlung. Stattdessen nahm die Granularität stark zu und die Zellen verkürzten ihre Ausläufer und wirkten somit in ihrer Form kantiger. Die vielen Vesikel in den Zellen waren nach Kombinationsbehandlung besonders deutlich zu erkennen. Im Unterschied zur simultanen Gabe von TMZ und ART zeigten sich die Zellen nach Kombinationsbehandlung nach dem neuem Schema größer als bei der Einzelbehand-

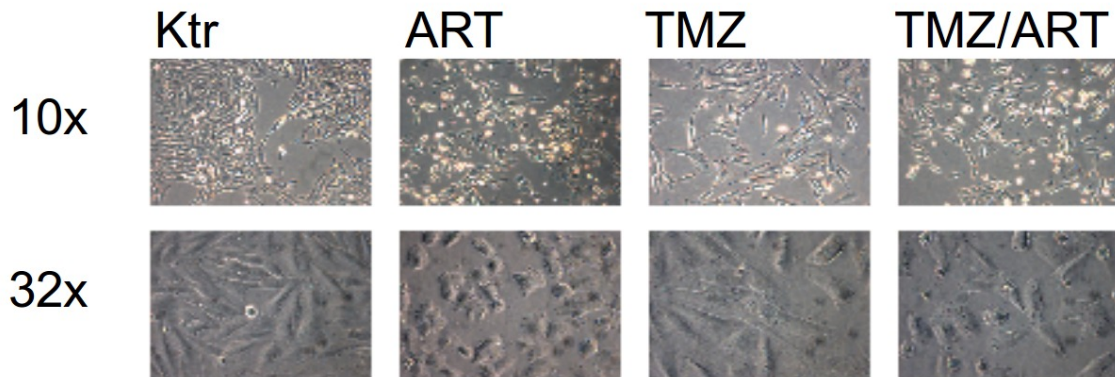


Abbildung 4.23: Morphologie der Zelllinie LN-229 nach ART- und TMZ-Behandlung. Lebendaufnahmen der Zelllinie LN-229 in 10-facher (oberer Block) und 32-facher Vergrößerung (unterer Block) 144 Stunden nach Einzelbehandlung von ART und TMZ und nach Kombinationsbehandlung mit neuem Behandlungsschema.

lung von ART. Dennoch zeigten sich die Zellen nicht abgeflacht und so vergrößert wie nach der Einzelbehandlung mit TMZ. Auch die Menge an Vesikeln war in der Kombinationsbehandlung deutlich höher als nach Einzelbehandlung von ART.

4.2.1.19 Untersuchungen zur Autophagie-Induktion nach ART-Behandlung in der Zelllinie LN-229

Aufgrund der morphologischen Beobachtungen der Zellen (Zunahme von Vesikeln in den Zellen nach ART-Zugabe), einzelner Ergebnisse im Screening (m-TOR) und der Zelltodanalysen (verschiedene Anteile von Apoptose und Nekrose) ergab sich die Hypothese, dass der Überlebensmechanismus/Zelltodtyp Autophagie eine Rolle im Wirkungsmechanismus von TMZ und ART spielt.

Um die Induktion der Autophagie eindeutig zu bestimmen, wird ein Inhibitor benötigt, der den letzten Schritt der Autophagie, die Fusion von Lysosom und Autophagosom, verhindert. Ohne den Inhibitor kann zwischen einer gesteigerten Induktion der Autophagie und einer Hemmung am Ende des autophagischen Prozesses nicht unterschieden

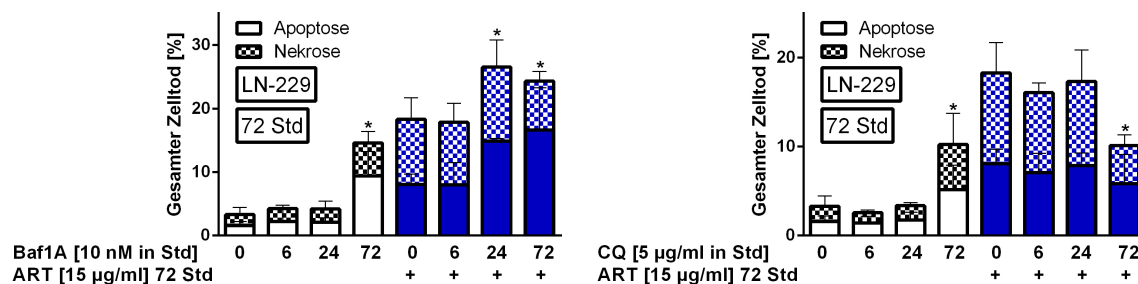


Abbildung 4.24: Zytotoxische Untersuchung zur Kombination von ART mit Autophagie-Inhibitoren. Zelltodanalysen der Zelllinie LN-229 72 Stunden nach ART-Behandlung ohne und mit Zugabe der Autophagie-Inhibitoren Bafilomycin (links) und Chloroquin (rechts) in Abhängigkeit der Dauer der Inhibitoren-Behandlung. Die Signifikanzen sind zu den 0 Stunden-Werten dargestellt.

werden. In beiden Fällen steigt die Anzahl der autophagischen Vesikel an und somit das LC3BII, ein spezifischer Marker für die Autophagie in den Zellen (siehe Kapitel 1.5.2). Im ersten Fall wird aufgrund der Steigerung der Autophagie eine Zunahme der Autophagosomen erreicht, wohingegen im zweiten Fall durch eine Verhinderung des Abbaus der Autophagosomen eine Anreicherung in der Zelle herbeigeführt wird. Ein Inhibitor, der die letzten Schritte der Autophagie verhindert, erlaubt somit eine Unterscheidung zwischen den beiden Fällen.

Wenn die Autophagie in den Zellen gesteigert und ein solcher Inhibitor eingesetzt wird, werden mehr Autophagosomen in den Zellen angereichert als nur durch Inhibition oder Induktion alleine. Dennoch ist die Autophagie in vielen Zellen ein lebenswichtiger Prozess, der basal zu jeder Zeit abläuft. Wird dieser Prozess zu lange inhibiert, kann er zum Zelltod führen. Um die Dauer der Behandlung mit dem Inhibitor festzulegen, wurde zunächst eine zytotoxische Untersuchung mit den Inhibitoren durchgeführt. Die Ergebnisse der Zelltodanalysen mit den Autophagie-Inhibitoren Bafilomycin und Chloroquin in Kombination mit ART sind in Abb. 4.24 grafisch dargestellt. Die Inhibitoren alleine zeigten in den ersten 24 Stunden nach Behandlung keine zytotoxische Wirkung

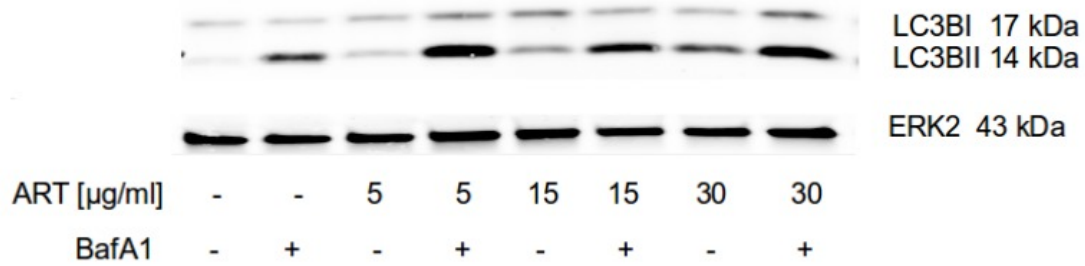


Abbildung 4.25: Untersuchung zur Autophagie-Induktion durch ART-Zugabe. Westernblot zur LC3BII Expressionsanalyse bei der Zelllinie LN-229 48 Stunden nach ART-Zugabe ohne und mit Bafilomycin in Abhängigkeit aufsteigender ART-Konzentrationen. Als Ladekontrolle diente das Protein ERK2.

in den Zellen. Bei der Kombination mit ART zeigten sich ab 24 Stunden die ersten zytotoxischen Wirkungen auf die Zellen.

Um die Wirkung auf den Autophagie-Prozess in der Zelllinie LN-229 nach ART-Zugabe zu analysieren, wurden die Zellen für 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von ART behandelt und anschließend 12 Stunden mit dem Autophagie-Inhibitor Bafilomycin inkubiert. Ein repräsentativer Westernblot zur Expressionsanalyse von LC3BII ist in Abb. 4.25 dargestellt. Als Ladekontrolle fungierte die durch extrazelluläre Signale regulierte Kinase 2 (extracellular signal-regulated kinases 2, ERK2).

Nach der Behandlung mit 5 µg/ml ART (siehe Abb. 4.25) war eine eindeutige Induktion und Steigerung des Autophagie-Prozesses zu erkennen. Dies wurde deutlich, da die LC3BII-Bande wesentlich stärker war als die der unbehandelten Kontrolle. Ebenso war die Bande mit Bafilomycin und ART deutlich stärker als die mit Bafilomycin alleine. Eine eindeutige ART-konzentrationsabhängige Steigerung des gesamten Autophagie-Prozesses war nicht zu erkennen. Zwar nahm die Akkumulation der LC3BII-Proteine mit Steigerung der ART-Konzentration zu (Autophagie-Induktion), aber die Intensität der Bande mit ART und Bafilomycin stieg nicht im selben Verhältnis an.

4.2.1.20 Untersuchungen zum Autophagie-Prozess nach Behandlung von TMZ und ART

Für die Untersuchungen des Autophagie-Prozesses nach Behandlung von TMZ und ART innerhalb des neuen Behandlungsschemas wurden die Zellen 144 Stunden nach TMZ-Behandlung geerntet und die Proteine isoliert. Analog zu der in Kapitel 4.2.1.19 diskutierten Untersuchung wurde die LC3BII-Expression analysiert. Ein repräsentativer Westernblot von jeder Zelllinie und die zur Ladekontrolle ERK2 berechneten Expressionsprofile sind in Abhängigkeit der unbehandelten Kontrolle in Abb. 4.26 dargestellt. Desweiteren wurde die p62-Expression analysiert. Das p62 Protein erkennt toxische Zellabfälle, die dann in das Autophagosom transportiert und degradiert werden [Rusten und Stenmark (2010)]. Mangelnde Autophagie kann so zu einer Akkumulation von p62 führen. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.27 zusammengestellt.

Nach Einzelbehandlung mit ART zeigte die Zelllinie LN-229 eine gesteigerte Expression von LC3BII (siehe Abb. 4.26). Mit dem Inhibitor Bafilomycin zusammen war die Ansammlung an LC3BII in den Zellen aber nur wenig höher. Bei der Einzelbehandlung von TMZ zeigte sich der umgekehrte Fall. Hundertvierundvierzig Stunden nach TMZ-Behandlung war nur noch wenig mehr LC3BII in den Zellen als bei der unbehandelten Kontrolle. In Kombination mit dem Inhibitor Bafilomycin zeigte sich eine deutliche Akkumulation an LC3BII in den Zellen. Nach Kombinationsbehandlung von ART und TMZ war die LC3BII-Expression deutlich gesteigert gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Wurde diese Behandlung noch mit dem Inhibitor Bafilomycin kombiniert, zeigte sich aber eine deutlich geringere Ansammlung an LC3BII als in den nur mit Bafilomycin behandelten Zellen.

In der Zelllinie A172 zeigten sich in den Zellen, die mit TMZ behandelt wurden, sowohl einzeln als auch in Kombination die gleichen Tendenzen wie in der Zelllinie LN-229. Insgesamt war die Expression an LC3BII schwächer als in der Zelllinie LN-229. Zudem zeigte sich nach Einzelbehandlung von ART eine deutlich geringere LC3BII-Expression im Vergleich zur TMZ-Behandlung im Unterschied zur Zelllinie LN-229. In der Kom-

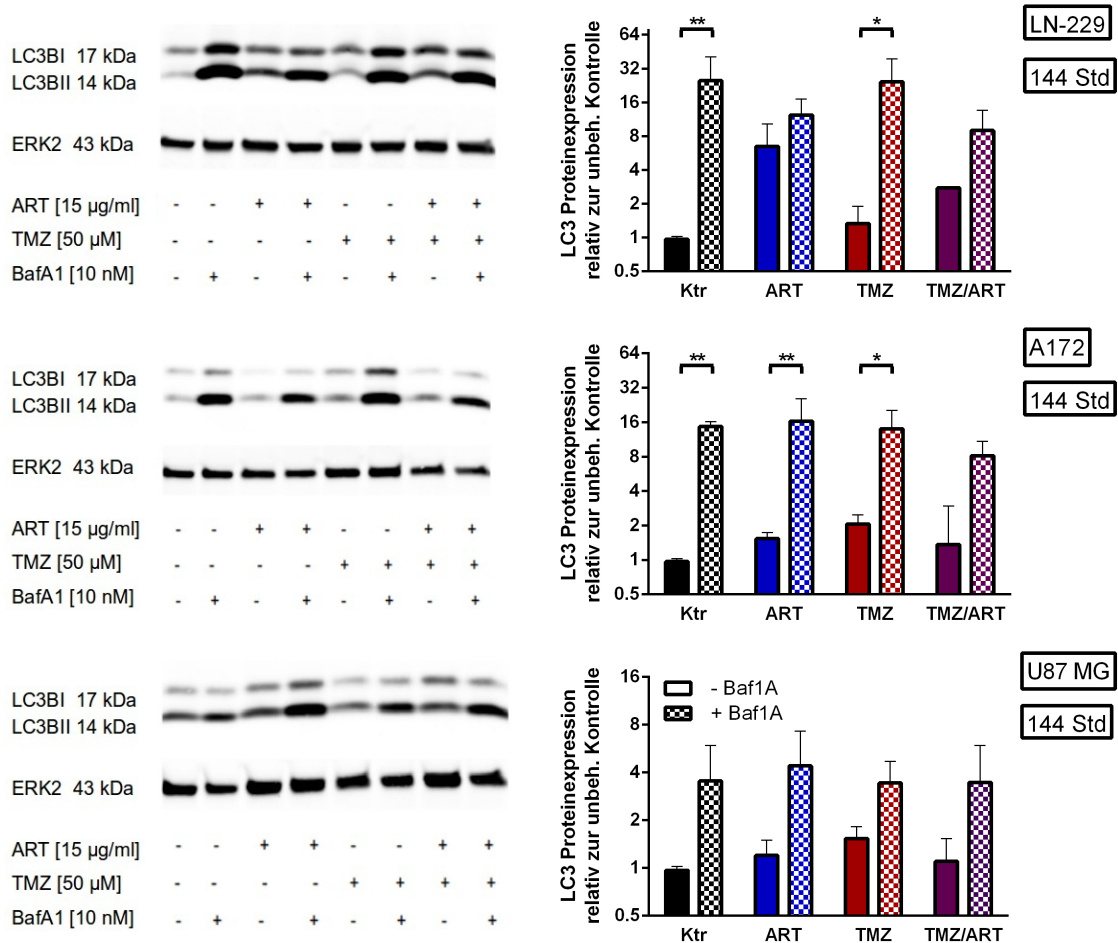


Abbildung 4.26: Untersuchung zum Autophagie-Prozess (LC3BII) innerhalb des neuen Behandlungsschemas. Repräsentative Westernblots zur LC3BII Expressionsanalyse 144 Stunden nach TMZ-Zugabe ohne und mit Bafilomycin (linke Spalte) und quantitative Auswertung der LC3BII Expression relativ zur unbehandelten Kontrolle (rechte Spalte) für die Zelllinien LN-229 (oben), A172 (Mitte) und U87 MG (unten). Als Ladekontrolle diente das Protein ERK2.

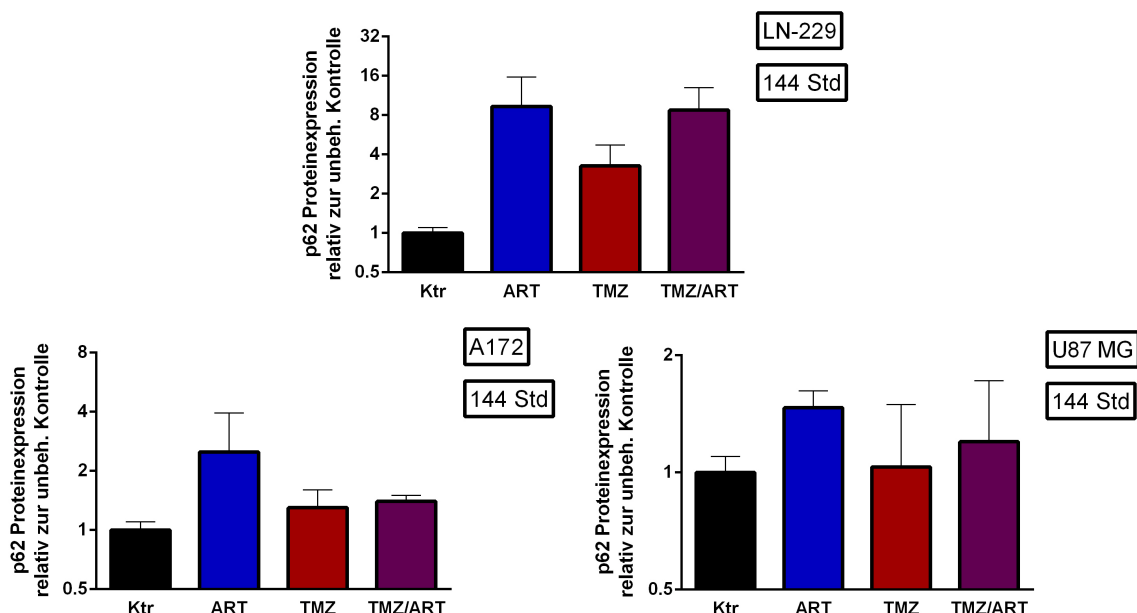


Abbildung 4.27: Untersuchung zum Autophagie-Prozess (p62) innerhalb des neuen Behandlungsschemas. *Quantitative Auswertung der p62 Expression 144 Stunden nach TMZ-Zugabe relativ zur unbehandelten Kontrolle für die Zelllinien LN-229 (oben), A172 (unten links) und U87MG (unten rechts).*

binationsbehandlung von ART und TMZ war die gleiche Wirkung wie in der Zelllinie LN-229 zu beobachten, da auch hier nach Kombinationsbehandlung von ART und TMZ die LC3BII-Expression deutlich gesteigert war gegenüber der unbehandelten Kontrolle (trotz geringerer Proteinbeladung der Kombinationsbehandlung). Wurde die Kombinationsbehandlung noch mit dem Inhibitor Bafilomycin kombiniert, zeigte sich auch hier eine deutlich geringere Ansammlung an LC3BII als in den nur mit Bafilomycin behandelten Zellen.

Die Zelllinie U87MG zeigte nach Behandlung nur wenig Expression an LC3BII im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Selbst nach Behandlung mit dem Inhibitor Bafilomycin lag die Expression unter einem Wert von vier im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Ohne Bafilomycin zeigten sich die Expressionsprofile in ihrer Tendenz denen der Zelllinie A172 ähnlich. In Kombination mit Bafilomycin zeigte sich in der Kombi-

nationsbehandlung mit ART und TMZ aber keine geringere Ansammlung an LC3BII im Vergleich zu den Einzelbehandlungen und der Kontrolle. Somit unterscheidet sich hier die Zelllinie U87 MG deutlich von den anderen beiden Zelllinien.

Die Intensität der Expression an p62 war in den drei Zelllinien unterschiedlich hoch (siehe Abb. 4.27). Die Zelllinie LN-229 zeigte das intensivste Expressionsprofil, gefolgt von der Zelllinie A172. Die Zelllinie U87 MG zeigte auch hier das schwächste Expressionsprofil. In allen drei Zelllinien zeigten sich jedoch die gleichen Tendenzen im Expressionsprofil von p62 in Bezug auf das neue Behandlungsschema von ART und TMZ.

Nach Einzelbehandlung von ART zeigte sich die höchste Akkumulation von p62 in den Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Nach Einzelbehandlung von TMZ zeigte sich eine nur gering höhere Akkumulation von p62 in den Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Obwohl die Expression in der Zelllinie LN-229 vierfach höher ist als zur Kontrolle, fiel die Expression im Vergleich zur Expression nach ART und in der Kombination mit mehr als 10-fach gering aus. Die Akkumulation an p62 nach der Kombinationsbehandlung von TMZ und ART lag zwischen denen der Einzelbehandlungen von ART und TMZ.

4.2.1.21 Untersuchungen zu den Abbauprozessen Autophagie und Proteasom-Aktivität nach Behandlung von TMZ und ART

Da Proteine nicht nur durch die Autophagie degradiert werden können sondern auch im Proteasom, wurde deren Aktivität in Bezug auf die in der Autophagie beteiligten Proteine LC3BII und p62 innerhalb des neuen Behandlungsschema mit ART und TMZ in der Zelllinie LN-229 untersucht. Durch eine erhöhte Aktivität des Proteasoms in den behandelten Zellen und besonders in der Kombinationsbehandlung könnte in Proteinanalysen nicht mehr allein auf die Autophagie geschlossen werden. Um dieser Fragestellung nachzukommen, wurde die Proteasom-Aktivität mittels Proteasom-Inhibitor gehemmt. Dazu wurde der Proteasom-Inhibitor MG132 verwendet, somit wurde ein

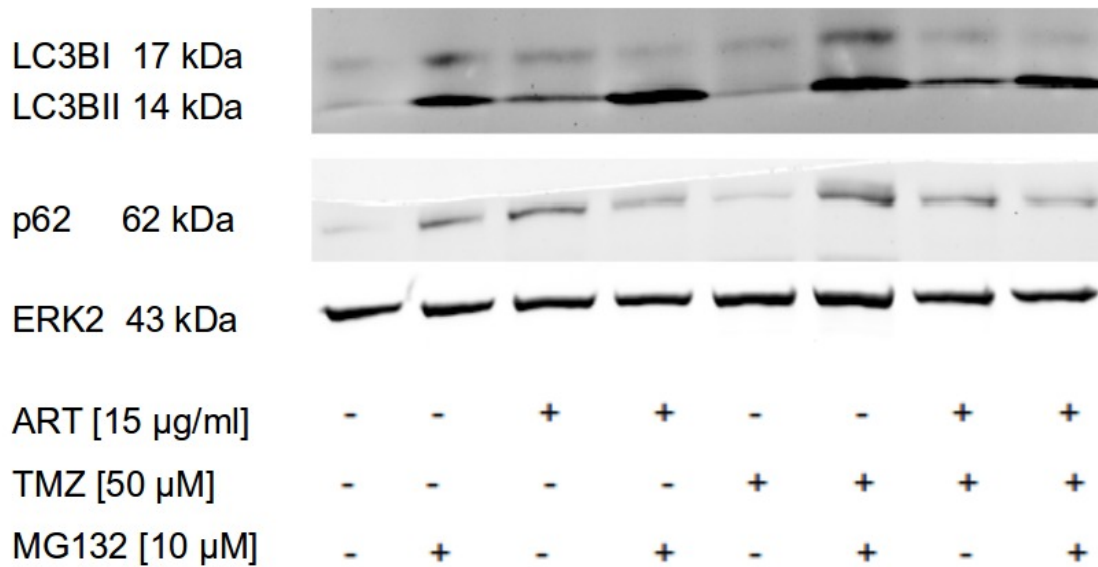


Abbildung 4.28: Untersuchung zum Autophagie-Prozess und zur Proteasom-Aktivität innerhalb des neuen Behandlungsschemas bei der Zelllinie LN-229. Westernblot zur LC3BII und p62 Expressionsanalyse bei der Zelllinie LN-229 innerhalb des neuen Behandlungsschemas 144 Stunden nach TMZ-Zugabe in Abhängigkeit von der Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG132. Als Ladekontrolle diente das Protein ERK2.

Vergleich der Proteinmenge mit und ohne Proteasom-Aktivität in den Zellen ermöglicht. In Abb. 4.28 ist ein repräsentativer Westernblot gezeigt. Als Ladekontrolle diente das Protein ERK2.

Im Expressionsprofil des LC3BII Proteins wurde deutlich, dass das Proteasom sowohl in der unbehandelten Kontrolle als auch nach den Behandlungen aktiv war. Nach den Einzelbehandlungen von ART und TMZ wurde mehr LC3BII exprimiert und somit auch mehr vom Proteasom wieder abgebaut, was durch die stärkeren Banden nach Inhibition dargelegt ist. Nach der Kombinationsbehandlung von ART und TMZ zeigte sich das Proteasom trotz intensivster Expression von LC3BII in den Zellen nicht so aktiv wie in den Einzelbehandlungen, da die Bande eher geringer ausfiel als in den

Einzelbehandlungen. Das Proteasom war am Abbau von LC3BII beteiligt, aber in der Kombinationsbehandlung nicht mehr als in den anderen Zellen.

Das p62 Expressionsprofil zeigte in Bezug auf die Proteasomaktivität Unterschiede in den Behandlungsarten. In der unbehandelten Kontrolle war nur eine geringe Expression von p62 zu sehen. Nach Behandlung mit dem Proteasom Inhibitor MG132 zeigte sich eine leichte Akkumulation von p62. Nach der Einzelbehandlung von ART war eine gesteigerte Expression von p62 zu beobachten, die in Kombination mit dem Proteasom-Inhibitor deutlich abnimmt. Das umgekehrte Bild zeigte sich nach Einzelbehandlung von TMZ. Hier war die p62 Expression nur minimal stärker als in der unbehandelten Kontrolle. In Kombination mit dem Proteasom-Inhibitor stieg die Menge von p62 an. In der Kombinationsbehandlung mit ART und TMZ war, analog zu der Einzelbehandlung mit ART, eine gesteigerte Expression von p62 zu beobachten, die in Kombination mit dem Proteasom-Inhibitor wieder deutlich abnahm.

4.2.1.22 Durchflusszytometrische Untersuchungen zum Autophagie-Prozess nach Behandlung von TMZ und ART

Um den Autophagie-Prozess nach Behandlung mit TMZ und ART an lebenden Zellen zu untersuchen, wurden zwei zytometrische Verfahren genutzt. Zum einen wurde der fluoreszierende Farbstoff Monodansylcadaverine (MDC) genutzt, der vorzugsweise in den autophagischen Vakuolen akkumuliert. Diese Akkumulation wird durch eine Kombination von Ionenfallen und spezifischen Wechselwirkungen mit Membranlipiden ermöglicht. Aufgrund dessen ist eine spezifische Färbung reiner autophagischer Vesikel nicht möglich, da Lysosomen oftmals mitgefärbt werden.

Daher wurde zusätzlich auf das Autophagie-Detektions Kit CytoID® zurückgegriffen, das durch einen neuartigen fluoreszierenden Farbstoff autophagische Vakuolen markiert und die Diskriminierung von Lysosomen ermöglicht. Die Zelllinien wurden nach dem neuen Behandlungsschema mit ART und TMZ behandelt. Zur Analyse des Autophagie-Prozesses wurde das Behandlungsschema wie in Kapitel 4.2.1.20 mit dem

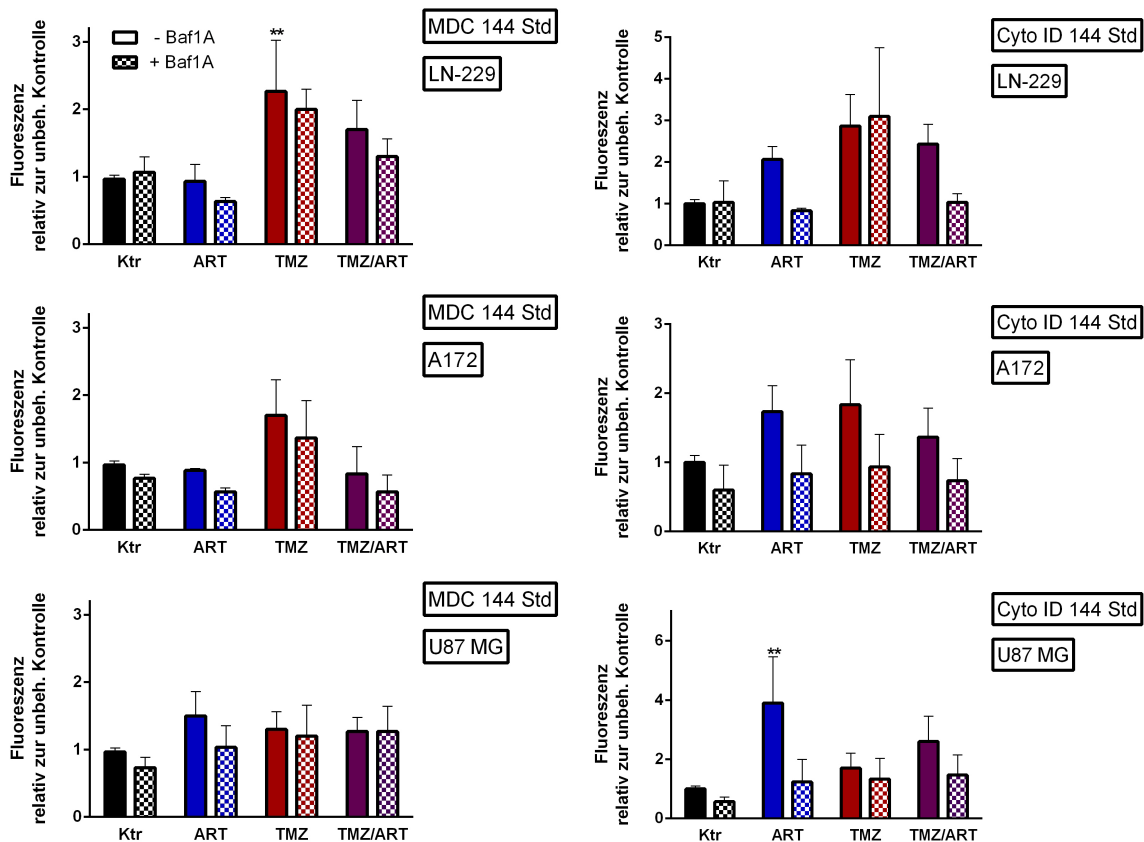


Abbildung 4.29: Untersuchung zum Autophagie-Prozess (MDC und CytoID) innerhalb des neuen Behandlungsschemas. Durchflusszytometrie-Analyse mittels der Fluoreszenzfarbstoffe Monodansylsadaverin (linke Spalte) und CytoID (rechte Spalte) bei den Zelllinien LN-229 (oben), A172 (Mitte) und U87 MG (unten) innerhalb des neuen Behandlungsschemas 144 Stunden nach TMZ-Zugabe in Abhängigkeit von der Zugabe des Autophagie-Inhibitors Bafilomycin. Die Fluoreszenzinduktion ist relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt.

Autophagie-Inhibitor Bafilomycin (späte Inhibition des Prozesses) kombiniert. Hundertvierundvierzig Stunden nach TMZ-Behandlung wurden die Zellen gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Ergebnisse sind als Balkendiagramme in Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenz relativ zur unbehandelten Kontrolle in Abb. 4.29 zusammengestellt.

Die Zelllinien LN-229 und A172 zeigten nach beiden Verfahren tendenziell ähnliche Ergebnisse. Die höchste Intensität der Fluoreszenz war nach Einzelbehandlung von TMZ zu messen. Bei der Zelllinie LN-229 war abgesehen von der unbehandelten Kontrolle die Intensität der Fluoreszenz nach Einzelbehandlung von ART am geringsten, gefolgt von der Kombinationsbehandlung von ART und TMZ. Die Zelllinie A172 wich bei der CytoID-Messung etwas von der Tendenz ab, da hier die Fluoreszenz-Induktion nach Einzelbehandlung von ART höher ausfiel als in der MDC-Messung oder in der Zelllinie LN-229. Bei der Zelllinie U87 MG war die höchste Intensität der Fluoreszenz nach Einzelbehandlung von ART zu beobachten. Dann unterschieden sich die Ergebnisprofile der MDC-Messung und CytoID-Messung voneinander. Bei der MDC-Messung war die Intensität der Fluoreszenz nach Einzelbehandlung von TMZ und nach Kombinationsbehandlung von ART und TMZ in etwa gleich hoch. Bei der CytoID-Messung fiel die Intensität der Fluoreszenz nach Einzelbehandlung von TMZ geringer aus als nach Kombinationsbehandlung von ART und TMZ. Die Intensität der Fluoreszenz nach Bafilomycin-Behandlung war bis auf zwei Fälle, wo sie marginal höher anstieg, geringer als in den Zellen ohne Bafilomycin-Behandlung. Diese beiden Ausnahmefälle kamen in der Zelllinie LN-229 vor, und zwar in der MDC-Messung bei der unbehandelten Kontrolle und in der CytoID-Messung nach Einzelbehandlung mit TMZ.

4.2.1.23 Untersuchung zum Autophagie-Prozess und Zelltod mittels verschiedener Inhibitoren

Zur Untersuchung einer gegenseitigen Einflussnahme von Autophagie und induzierten Zelltod innerhalb des neuen Behandlungsschemas und zur generellen Verstärkung der Hypothese, nach der die Autophagie im Wirkungsprozess der Kombinationsbehandlung beteiligt ist, wurden Inhibitoren des Autophagie-Prozesses, der Apoptose und Nekrose eingesetzt und deren Einflussnahme auf die Prozesse untersucht.

Zur direkten Unterbindung des gesamten Autophagie-Prozesses wurde der Autophagie-Inhibitor 3-Methyladenin (3MA) verwendet, der die Autophagosombildung unterbindet. Es ist ein Inhibitor der Phosphatidylinosit-3-Kinase (PI3K), die eine wichtige Rolle in vielen biologischen Prozessen spielt, einschließlich der Steuerung der Aktivierung von mTOR, einem Schlüsselregulator der Autophagie [Wu und Hu (2010)]. Bei einer Beteiligung des Überlebensmechanismus Autophagie sollte bei einer Inhibition zu Beginn des Prozesses die Induktion des Zelltods zunehmen. Dieser Inhibitor wurde mit dem neuen Behandlungsschema kombiniert. Hundertvierundvierzig Stunden nach TMZ-Behandlung wurden die Zellen mittels Annexin/PI-Färbung und Durchflusszytometer in Bezug auf den induzierten Zelltod analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 4.30 dargestellt.

In einer weiteren Untersuchung wurde das neue Behandlungsschema mit den Inhibitoren Nekrostatin (zur Inhibition des Nekrosoms – Nekroseweg) und ZVADfmk (zur Inhibition der Kaspasen – Apoptoseweg) kombiniert. Hundertvierundvierzig Stunden nach TMZ-Behandlung wurden die Zellen mittels CytoID-Färbung und Durchflusszytometer in Bezug auf die Autophagie analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 4.31 dargestellt.

Zu allen drei Endzeitpunkten der Untersuchung steigerte die Zugabe des Autophagie-Inhibitors 3MA deutlich den induzierten Zelltod bei der Zelllinie LN-229, besonders in der Kombination mit TMZ. Die Induktion des Zelltods nahm über die Zeit stetig zu, der Unterschied in der Induktion des Zelltods zwischen dem neuen Behandlungsschema

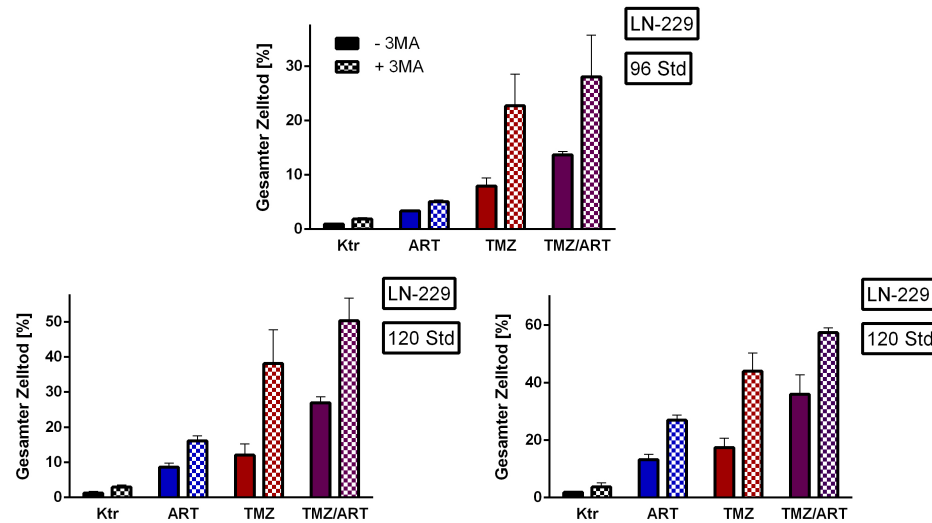


Abbildung 4.30: Untersuchung zum Autophagie-Prozess und Zelltod mittels früher Inhibition innerhalb des neuen Behandlungsschemas. Zelltodanalyse bei der Zelllinie LN-229 innerhalb des neuen Behandlungsschemas nach 96 Stunden (oben), nach 120 Stunden (unten links) und nach 144 Stunden (unten rechts) nach TMZ-Zugabe in Abhängigkeit von der Zugabe des frühen Autophagie-Inhibitors 3-Methyladenin.

mit und ohne Autophagie-Inhibitor fiel mit der Zeit stetig ab.

Die Behandlung mit dem Nekrose-Inhibitor Nekrostatin zeigte wenig Wirkung auf das neue Behandlungsschema in Bezug auf die Autophagie-Induktion. Bei der Zelllinie LN-229 konnte ebenso kaum eine Wirkung auf die Autophagie-Induktion im Rahmen des neuen Behandlungsschemas während der Behandlung mit dem Apoptose-Inhibitor ZVADfmk festgestellt werden. Bei den beiden anderen Zelllinien war eine starke Wirkung in der Kombinationsbehandlung von ART und TMZ von dem Apoptose-Inhibitor zu beobachten, ebenso bei der Zelllinie A172 nach Einzelbehandlung von ART. Durch die Zugabe des Apoptose-Inhibitors ZVADfmk wurde die Intensität der Fluoreszenz bei der Autophagie-Messung signifikant gesteigert.

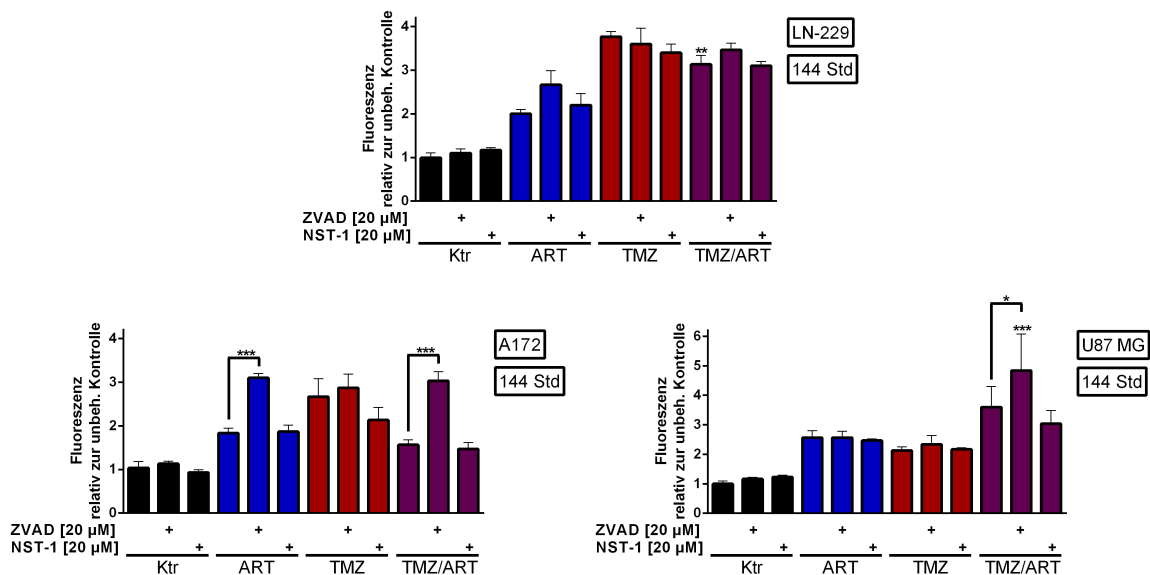


Abbildung 4.31: Untersuchung zum Autophagie-Prozess und Zelltod mittels Inhibition des Apoptose- und Nekrose-Signalwegs innerhalb des neuen Behandlungsschemas. Durchflusszytometrie-Analyse mittels des Fluoreszenzfarbstoffs *CytoID* bei den Zelllinien LN-229 (oben), A172 (unten links) und U87MG (unten rechts) innerhalb des neuen Behandlungsschemas 144 Stunden nach TMZ-Zugabe in Abhängigkeit von der Zugabe des Kaspase-Inhibitors ZVADfmk und Nekrostatin. Die Fluoreszenzinduktion ist relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt.

4.2.1.24 Zellzyklusanalyse nach der Behandlung von ART und TMZ

Um den Einfluss des etablierten Behandlungsschemas auf den Zellzyklus zu studieren, wurde erneut auf die Analyse des DNA-Gehalts der Zellen mittels PI-Färbung am Durchflusszytometer zurückgegriffen. Dabei wurde die SubG1-Fraktion (tote Zellen) gesondert dargestellt, um ausschließlich den Zyklus der lebenden Zellen zu untersuchen. Die Ergebnisse sind als Balkendiagramme für die Zelllinie LN-229 in Abb. 4.32 gezeigt, für die Zelllinie A172 in Abb. 4.33 und für die Zelllinie U87MG in Abb. 4.34.

Desweiteren wurde auch hier das Expressionsprofil von den beiden Proteinen pChk1 und pChk2 untersucht. Angepasst an das neue Behandlungsschema wurden die Zellen

84 Stunden nach TMZ-Behandlung geerntet und die Proteine isoliert. Für die Behandlungen mit ART wurden zwei Zeitpunkte gewählt. Als erster Zeitpunkt wurde ART 72 Stunden nach TMZ-Behandlung zugegeben (12-Stundenwert von ART), als zweiter die Zugabe von ART 78 Stunden nach TMZ-Behandlung (sechs-Stundenwert von ART). Für die Zelllinien LN-229 und U87 MG sind die Ergebnisse in Abb. 4.35 gezeigt, für die Zelllinie A172 konnten die Expressionen von Check-Proteinen trotz analoger Bearbeitung mit den anderen Zelllinien nicht detektiert werden. Die Ursache dafür lies sich nicht feststellen.

Bei der Zelllinie LN-229 lag der SubG1-Anteil in der unbehandelten Kontrolle über die Zeit von 72 Stunden bis 144 Stunden bei etwa 5 %. Mit der Dauer einer Behandlung stieg der Anteil an. Nach Einzelbehandlung von ART erhöhte sich der Anteil nach 24 Stunden (96-Stundenwert) auf 20 % und innerhalb von 48 Stunden um weitere 5 %. Nach Einzelbehandlung von TMZ stieg der Anteil nach 72 Stunden (72-Stundenwert) auf 12 % an und erst nach weiteren 72 Stunden um weitere 8 %. In der Kombinationsbehandlung war ein stetiger Anstieg des Anteils an SubG1-Zellen zu beobachten. Nach 144 Stunden lag der Anteil bei etwa 35 %.

In der Zellzyklusanalyse zeigten die Zellen über die Zeit je nach Behandlung ein verändertes Profil im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Nach ART-Behandlung blieb der Anteil der Zellen der G2- und G1-Phase etwa gleich groß im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle, bei der die Zellen in der G1-Phase stetig anstiegen und der Anteil der Zellen in der G2-Phase kontinuierlich geringer wurde. Zweiundsiebzig Stunden nach der Einzelbehandlung von TMZ befanden sich die Zellen in einem ausgeprägten G2-Block, dieser Block wurde über die Zeit geringer und durch eine tetraploide Phase aufgefüllt, in der sich nach 144 Stunden über 25 % der Zellen befanden. In der Kombinationsbehandlung zeigte sich dieses Bild wesentlich abgeschwächt und nach 144 Stunden befanden sich nur etwa 10 % der Zellen in einer tetraploiden Phase. Zudem stieg der Anteil der Zellen in der G1-Phase über den beobachteten Zeitraum leicht an.

Das Expressionsprofil der Proteine pChk1 und pChk2 zeigte die größte Veränderung im

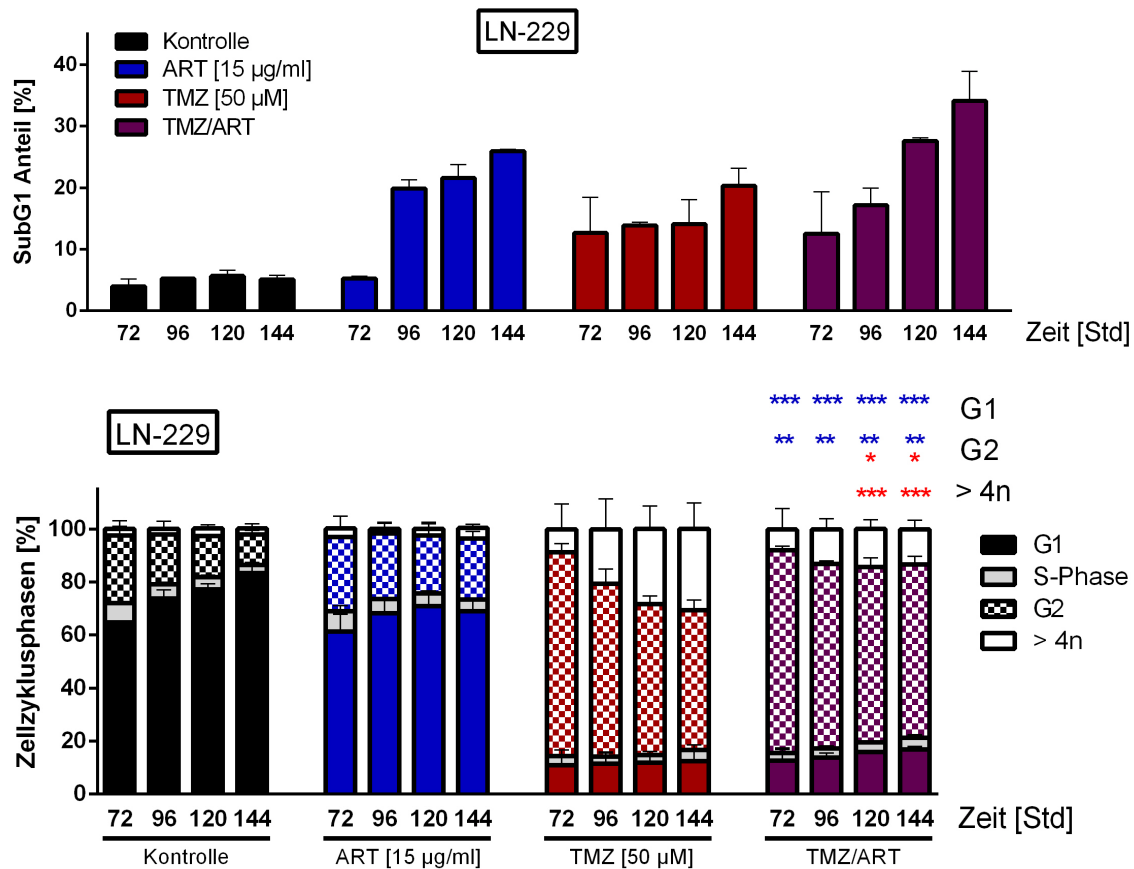


Abbildung 4.32: Apoptose- und Zellzyklusanalysen der Zelllinie LN-229 nach ART- und TMZ-Behandlung nach dem neuen Behandlungsschema. Apoptoseanalyse als SubG1 Anteil (oben) und Zellzyklusanalysen ohne SubG1 Anteil (unten) der Zelllinie LN-229 von 72 Stunden bis 144 Stunden nach Einzelbehandlung von ART und TMZ und nach Kombinationsbehandlung. Die Signifikanzen zur Kombinationsbehandlung sind für ART (blau) und TMZ (rot) getrennt für die Phasen G1, G2 und >4n dargestellt. Unterschiede in den S-Phasen sind nicht signifikant.

Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach Einzelbehandlung von TMZ. Das Protein pChk1 wurde über vierfach höher exprimiert und das Protein pChk2 wurde über dreifach höher exprimiert nach Einzelbehandlung von TMZ. Nach Kombinationsbehandlung war die Expression von pChk2 noch über zweifach höher als in der unbehandelten Kontrolle.

Bei der unbehandelten Kontrolle der Zelllinie A172 lag der Anteil an Zellen in SubG1 bei etwa 5% über die gesamte Zeit. In den Behandlungen stieg der Anteil über die Zeit stetig an, am stärksten in der Kombinationsbehandlung bis über 50%. Bei der Einzelbehandlung von ART blieb der Anteil unter 30% und bei TMZ unter 40%.

Das Zellzyklusprofil der unbehandelten Kontrolle war über die beobachtete Zeit sehr stabil. Über 70% der Zellen befanden sich in der G1-Phase, 2-5% der Zellen in der S-Phase und etwa 25% in der G2-Phase. Nach Einzelbehandlung von ART stieg der Anteil der G1-Phase leicht an, der Anteil der G2-Phase fiel leicht ab. Die Einzelbehandlung von TMZ führte nach 72 Stunden zu einem ausgeprägten G2-Block, etwa 70% der Zellen befanden sich in der G2-Phase. Ab 96 Stunden schrumpfte der Anteil der Zellen in der G2-Phase und es trat die tetraploide Phase ein. Nach 144 Stunden nahm die tetraploide Phase etwa 45% ein, die G2-Phase dann auch nur noch etwa 45%. Durch die Kombinationsbehandlung von TMZ und ART war das Anreichern der Zellen in der tetraploiden Phase geringer, nach 144 Stunden waren nur etwa 10% der Zellen in dieser Phase und noch über 70% der Zellen in der G2-Phase. Leider konnten, trotz wiederholten Versuchen mit gesteigerten Proteinnengen, keine auswertbaren Signale für die Proteine pChk1 und pChk2 detektiert werden.

Bei der Zelllinie U87MG war der SubG1-Anteil in der unbehandelten Kontrolle mit etwa 10% höher als in den anderen beiden Zelllinien. Die Einzelbehandlung von ART zeigte nur wenig Auswirkungen auf die SubG1-Fraktion, nach 120 Stunden erreichte diese den Höhepunkt von 15%. Die SubG1-Fraktion nach der TMZ-Einzelbehandlung nahm stetig zu, nach 144 Stunden hatte diese ihren Höhepunkt bei etwa 28%. In der Kombinationsbehandlung schwankte die SubG1-Fraktion zwischen 20% nach 96 Stun-

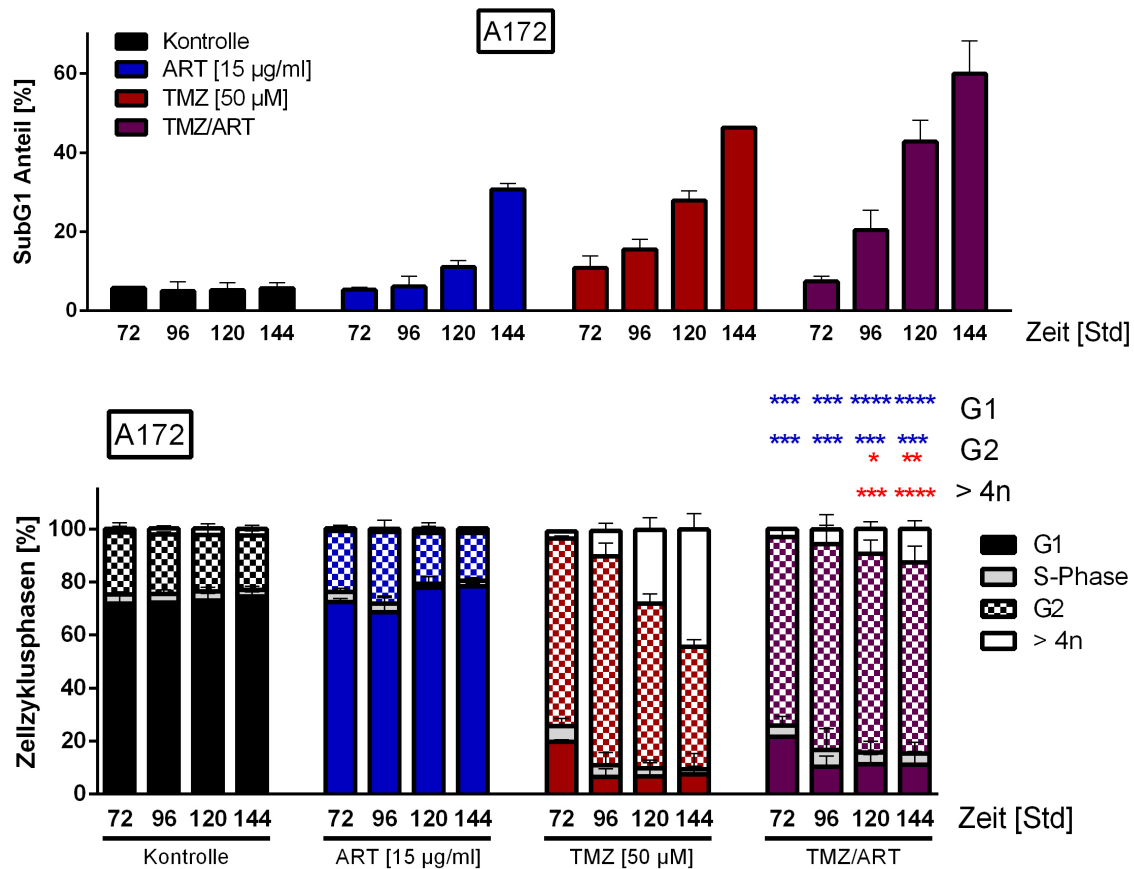


Abbildung 4.33: Apoptose- und Zellzyklusanalysen der Zelllinie A172 nach ART- und TMZ-Behandlung nach dem neuen Behandlungsschema. Apoptoseanalyse als SubG1 Anteil (oben) und Zellzyklusanalysen ohne SubG1 Anteil (unten) der Zelllinie A172 von 72 Stunden bis 144 Stunden nach Einzelbehandlung von ART und TMZ und nach Kombinationsbehandlung. Die Signifikanzen zur Kombinationsbehandlung sind für ART (blau) und TMZ (rot) getrennt für die Phasen G1, G2 und >4n dargestellt. Unterschiede in den S-Phasen sind nicht signifikant.

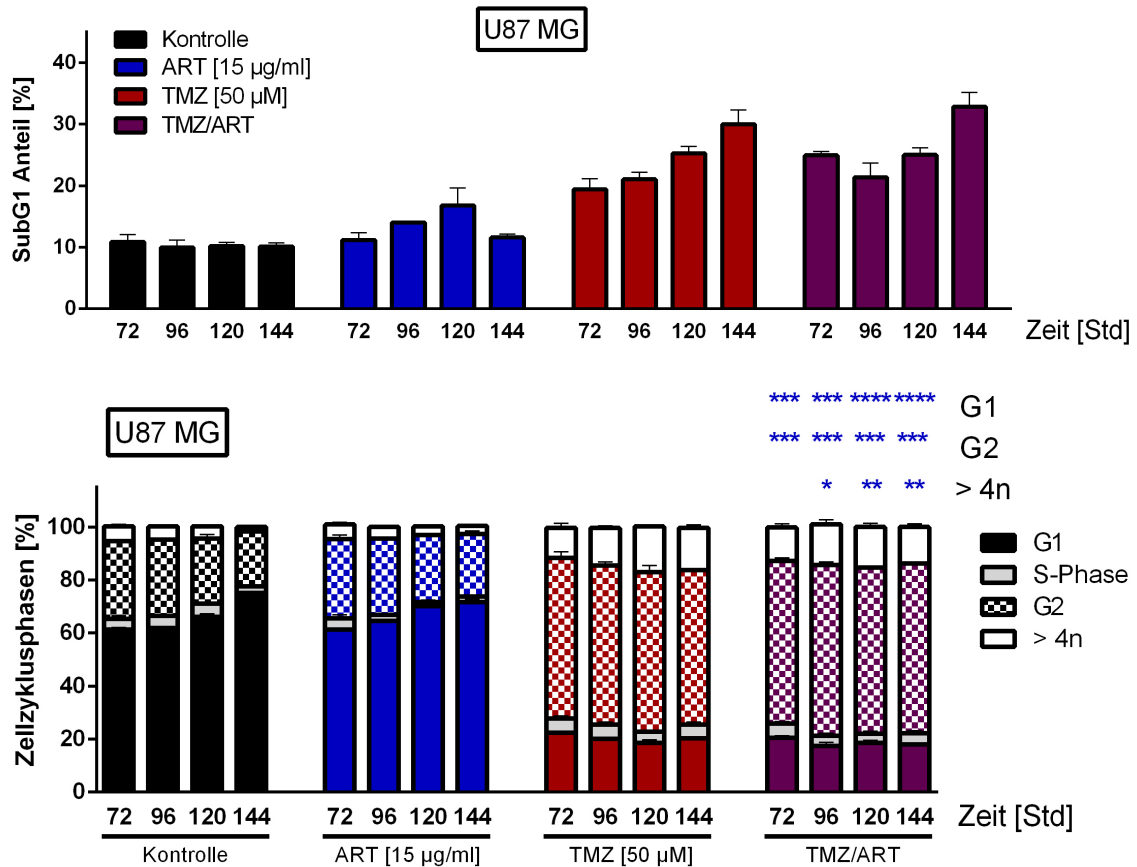


Abbildung 4.34: Apoptose- und Zellzyklusanalysen der Zelllinie U87 MG nach ART- und TMZ-Behandlung nach dem neuen Behandlungsschema. Apoptoseanalyse als SubG1 Anteil (oben) und Zellzyklusanalysen ohne SubG1 Anteil (unten) der Zelllinie U87 MG von 72 Stunden bis 144 Stunden nach Einzelbehandlung von ART und TMZ und nach Kombinationsbehandlung. Die Signifikanzen zur Kombinationsbehandlung sind für ART (blau) und TMZ (rot) getrennt für die Phasen G1, G2 und >4n dargestellt. Unterschiede in den S-Phasen sind nicht signifikant.

den und etwa 30 % nach 144 Stunden.

Die mit ART behandelten Zellen zeigten in etwa das gleiche Profil wie die unbehandelte Kontrolle. Sie hatten einen Anteil von über 60 % der Zellen in der G1-Phase und einen Anteil von 30 % in der G2-Phase, der über die Zeit auf etwa 20 % schrumpfte. Beide zeigten einen kleinen Anteil an einer tetraploiden Phase und auch der S-Phase, der in der unbehandelten Kontrolle etwas größer und stabiler über die Zeit blieb. Nach der Einzelbehandlung von TMZ zeigte sich wie in den anderen beiden Zelllinien ein deutlicher G2-Block mit etwa 60 % der Zellen. Der Unterschied zu den anderen Zellen bestand in dem über die Zeit geringeren Anteil der tetraploiden Phase, der zwischen 10 % und 15 % schwankte. In der Kombinationsbehandlung war dieser Anteil nur geringfügig kleiner mit etwa 10 % bis 12 %.

Die Expressionsprofile der Proteine pChk1 und pChk2 zeigten deutliche Unterschiede zueinander. Bei pChk1 war die stärkste Expression des Proteins in der Kombinationsbehandlung sechs Stunden nach ART-Zugabe. Nach weiteren sechs Stunden war diese schon wieder niedriger, mit einem Wert von etwa drei war sie sogar geringer als nach

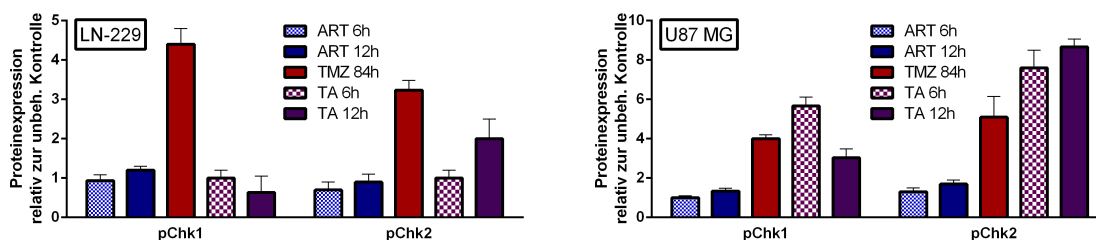


Abbildung 4.35: Zellzyklusanalysen der Zelllinien LN-229 und U87 MG nach ART- und TMZ-Behandlung nach dem neuen Behandlungsschema mittels Proteinexpression. Zellzyklusanalysen mittels Proteinexpression von pChk1 und pChk2 der Zelllinien LN-229 (links) und U87 MG (rechts) sechs und 12 Stunden nach ART-Behandlung. Die Proteinexpression ist relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt, TA entspricht der Kombinationsbehandlung mit TMZ und ART nach dem neuem Behandlungsschema.

TMZ-Einzelbehandlung. Das Protein pChk1 wurde über vierfach höher exprimiert und das Protein pChk2 wurde über fünffach höher exprimiert nach TMZ-Einzelbehandlung. Die höchste Expression von pChk2 wurde in der Kombinationsbehandlung erreicht. Sechs Stunden nach ART-Behandlung war sie über siebenfach höher als in der unbehandelten Kontrolle und nach weiteren sechs Stunden war sie auf über achtfach gestiegen.

4.2.1.25 Untersuchung zum Autophagie-Verlauf und Aktivierung der Kaspasen

Da die Endpunktanalysen nach 144 Stunden nur begrenzt den Ablauf eines Prozesses widerspiegeln, wurden die Prozesse mit Zeitpunkt der ART-Zugabe im Abstand von 24 Stunden bis zum Endpunkt von 144 Stunden analysiert. Um die Wirkung auf den Autophagie-Prozess und parallel auf die Aktivierung der Kaspasen im zeitlichen Verlauf des neuen Behandlungsschemas zu untersuchen, wurden die fluoreszierenden Farbstoffe CytoID, MDC und Magic Red für das Kathepsin B und die Kaspasen 3 und 7 verwendet. Die Induktion der Farbstoffe wurde mittels Durchflusszytometrie zu den Zeitpunkten 72, 96, 120 und 144 Stunden nach TMZ-Zugabe analysiert. Die mittleren Intensitäten relativ zur unbehandelten Kontrolle sind in den Abbildungen 4.36 für die Zelllinie LN-229, 4.37 für die Zelllinie A172 und 4.38 für die Zelllinie U87 MG dargestellt. Die Fluoreszenzfarbstoffe sind in der Reihenfolge CytoID (1. Reihe), Monodansylsaccharin (2. Reihe), Kathepsin B (3. Reihe) und Kaspasen 3 und 7 (4. Reihe) aufgeführt.

Das CytoID-Profil der Zelllinie LN-229 spiegelte sich in der MDC-Messung wider. Nach Einzelbehandlung von ART stieg die Intensität der Fluoreszenz langsam an. Dem gegenüber war ein starker Anstieg der Intensität der Fluoreszenz bei Einzelbehandlung mit TMZ zu beobachten. Auch in der Kombinationsbehandlung stieg die Intensität der Fluoreszenz zunächst an, fiel dann aber immer weiter ab. Besonders in der MDC-Messung wurde der Unterschied der Einzelbehandlungen und deren Kombination deutlich. Während die Intensität der Fluoreszenz bei den Einzelbehandlungen immer weiter

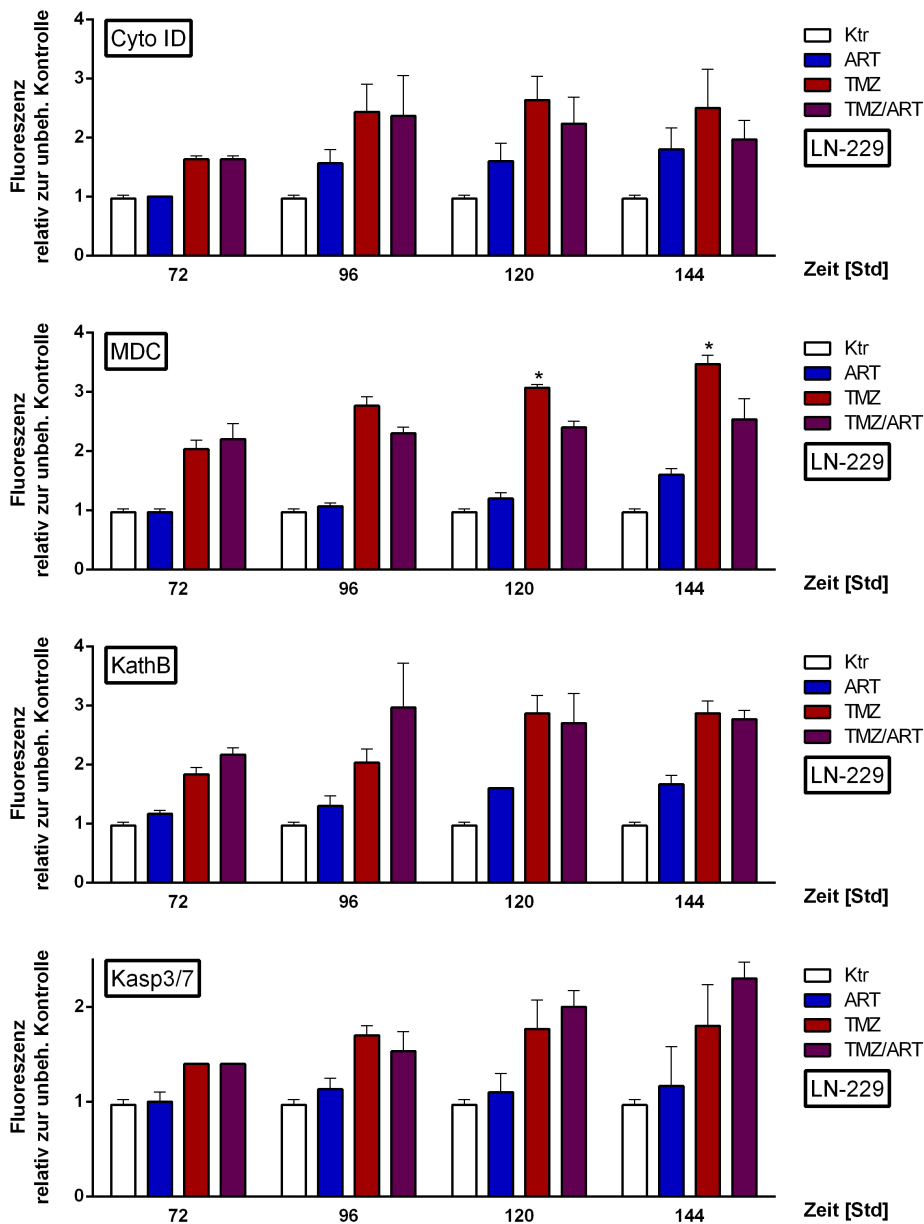


Abbildung 4.36: Untersuchung zum Autophagie-Verlauf bei der Zelllinie LN-229 innerhalb des neuen Behandlungsschemas. Durchflusszytometrie-Analyse bei der Zelllinie LN-229 mittels der Fluoreszenzfarbstoffe CytoID (1. Reihe), Monodansylsaccharin (2. Reihe), Kathepsin B (3. Reihe) und Kaspasen 3 und 7 (4. Reihe) bei der Zelllinie LN-229 innerhalb des neuen Behandlungsschemas in Abhängigkeit der Zeit 72 bis 144 Stunden nach TMZ-Zugabe. Die Fluoreszenzinduktion ist relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt.

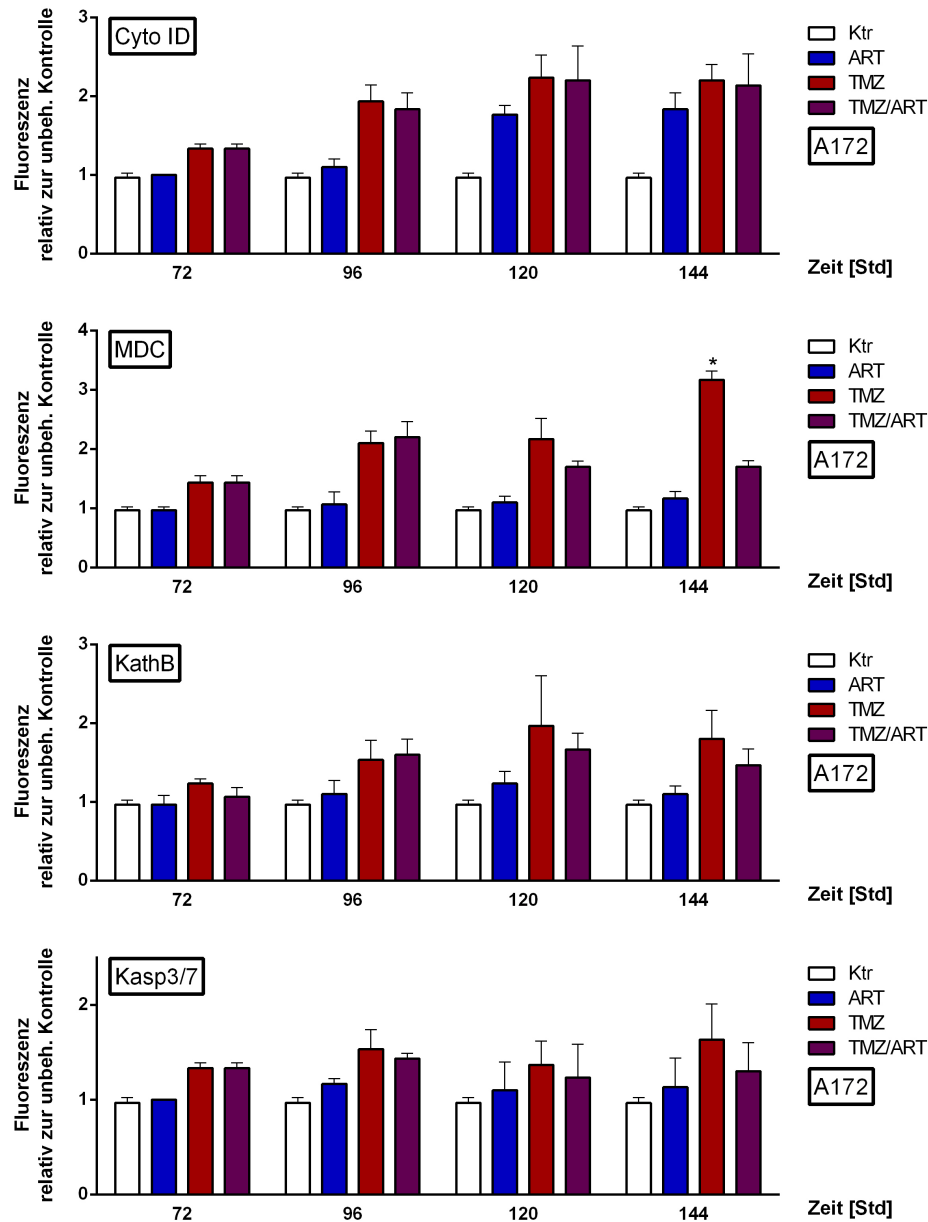


Abbildung 4.37: Untersuchung zum Autophagie-Verlauf bei der Zelllinie A172 innerhalb des neuen Behandlungsschemas. Durchflusszytometrie-Analyse bei der Zelllinie A172 mittels der Fluoreszenzfarbstoffe CytoID (1. Reihe), Monodansylsaccharin (2. Reihe), Kathepsin B (3. Reihe) und Kaspasen 3 und 7 (4. Reihe) bei der Zelllinie A172 innerhalb des neuen Behandlungsschemas in Abhängigkeit der Zeit 72 bis 144 Stunden nach TMZ-Zugabe. Die Fluoreszenzinduktion ist relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt.

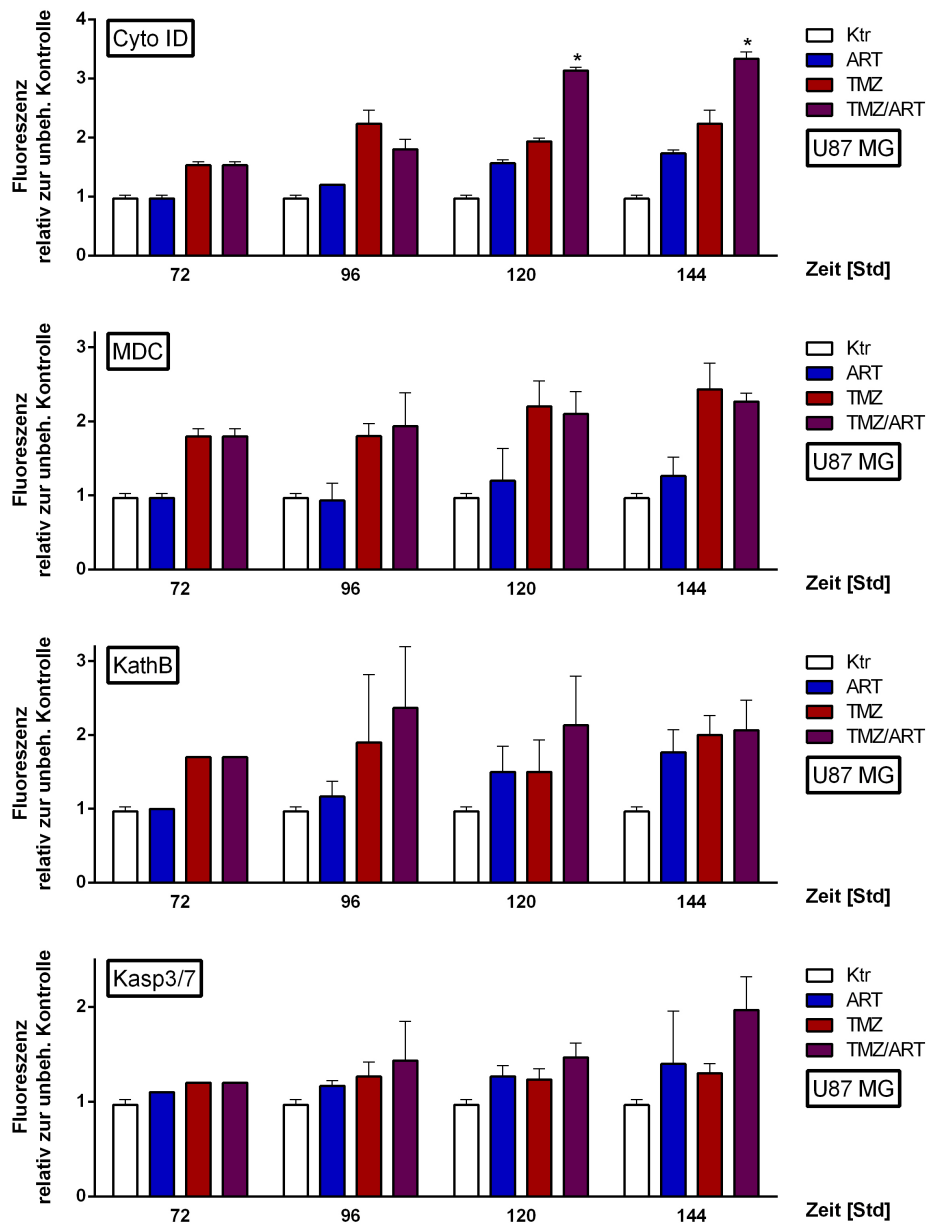


Abbildung 4.38: Untersuchung zum Autophagie-Verlauf bei der Zelllinie U87 MG innerhalb des neuen Behandlungsschemas. Durchflusszytometrie-Analyse bei der Zelllinie U87 MG mittels der Fluoreszenzfarbstoffe CytoID (1. Reihe), Monodansylsaccharin (2. Reihe), Kathepsin B (3. Reihe) und Kaspasen 3 und 7 (4. Reihe) bei der Zelllinie U87 MG innerhalb des neuen Behandlungsschemas in Abhängigkeit der Zeit 72 bis 144 Stunden nach TMZ-Zugabe. Die Fluoreszenzinduktion ist relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt.

anstieg, sank diese in der Kombinationsbehandlung ab 96 Stunden kontinuierlich ab.

Das Kathepsin-Profil und das Kaspase-Profil waren unterschiedlich und wichen auch von den anderen beiden Profilen ab. Im Kathepsin-Profil stieg die Intensität der Fluoreszenz nach Einzelbehandlung von ART stetig langsam an. Die Intensität der Fluoreszenz nach TMZ-Einzelbehandlung stieg bis zu 120 Stunden stark an und blieb dann konstant auf einen Wert von etwa drei stehen. In der Kombinationsbehandlung erhöhte sich die Intensität der Fluoreszenz deutlich bis 96 Stunden, ab da sank sie wieder leicht ab.

Das Kaspase-Profil zeigte im Vergleich zu den anderen Profilen die geringsten Abweichungen zu der unbehandelten Kontrolle. Mit einer Intensitätssteigerung auf einen Wert knapp über zwei war dies die höchste Intensität in diesem Profil. Nach ART-Einzelbehandlung nahm die Intensität der Fluoreszenz nur minimal zu, nach TMZ-Einzelbehandlung stieg die Intensität der Fluoreszenz stetig bis zu einem Wert von zwei an. Auch in der Kombinationbehandlung erhöhte sich die Intensität der Fluoreszenz stetig. Allerdings geschah dies bis zum 96 Stundenwert langsamer als bei TMZ-Einzelbehandlung, danach stärker als bei TMZ-Einzelbehandlung bis zu einem Wert über zwei.

Bei der Zelllinie A172 waren die Autophagie-Profile (CytoID- und MDC-Messung) von der Tendenz ähnlich zueinander und zu denen der Zelllinie LN-229. Auch die anderen beiden Profile (Kathepsin- und Kaspase-Messung) zeigten die gleichen Tendenzen. Nach Einzelbehandlung von ART stieg die Intensität der Fluoreszenz langsam an, wohingegen nach Einzelbehandlung von TMZ die Intensität der Fluoreszenz stark zunahm. Auch in der Kombinationsbehandlung ist eine Erhöhung der Intensität der Fluoreszenz zu beobachten, diese fiel dann aber immer weiter ab. Besonders in der MDC-Messung wurde der Unterschied der Einzelbehandlungen und der Kombination deutlich. Während die Intensität der Fluoreszenz bei den Einzelbehandlungen immer weiter anstieg, sank diese in der Kombinationsbehandlung ab 120 Stunden kontinuierlich ab.

Die Zelllinie U87MG zeigte in drei Profilen ein deutlich anderes Bild, nur die MDC-Messung offenbarte eine ähnliche Tendenz wie die Zelllinie A172. Die drei abweichenden Profile ergaben ein Bild, in dem die Intensitäten der Fluoreszenz immer weiter anstiegen, auch die der Kombinationsbehandlung, ganz im Gegensatz zu den Profilen der Zelllinie A172.

4.2.1.26 Untersuchung der Autophagosomen, Lysosomen und Mitochondrien

Die Ergebnisse der Autophagie-Untersuchungen zeigten, dass die Autophagie im Wirkungsmechanismus der Kombinationsbehandlung von TMZ und ART involviert war und die Autophagie nach ART und TMZ induziert aber am Ende des Prozesses gestört wurde. Diese Resultate führten zu weiteren Hypothesen. Die erste Hypothese besagt, dass die Lysosomen durch die hohe ROS Induktion beeinträchtigt wurden und somit die Fusion der Autophagosomen und Lysosomen zu den Autolysosomen unterbunden wurde. Zur Untersuchung der Wirkung auf die Autophagosomen und Lysosomen in Bezug auf die Behandlungen innerhalb des neuen Behandlungsschemas wurden die Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten fixiert und mit spezifischen Markern markiert. Anschließend wurden sie mit fluoreszierenden Antikörpern gekoppelt und mittels des Fluoreszenzmikroskops untersucht. Als spezifischer Marker für die Autophagosomen wurde das Protein LC3B und für die Lysosomen das Protein Lamp2 gewählt, das in der Membran der Lysosomen lokalisiert ist. Mittels des Fluoreszenzmikroskops wurden Bilder der Zelllinie LN-229 96 Stunden, 120 Stunden und 144 Stunden nach TMZ-Behandlung für die unbehandelte Kontrolle, für die Einzelbehandlung von ART und TMZ und für die Kombinationsbehandlung von ART und TMZ aufgenommen. Ein repräsentatives Bild aus jeder Serie ist in Abb. 4.39 dargestellt.

Die Autophagosomen (LC3B-Foci) sind hier in grün dargestellt und nur nach Einzelbehandlung von ART bei den Zeitwerten von 96 Stunden und 120 Stunden deutlich zu erkennen. Zu anderen Zeiten und unter anderen Behandlungen war eine Färbung

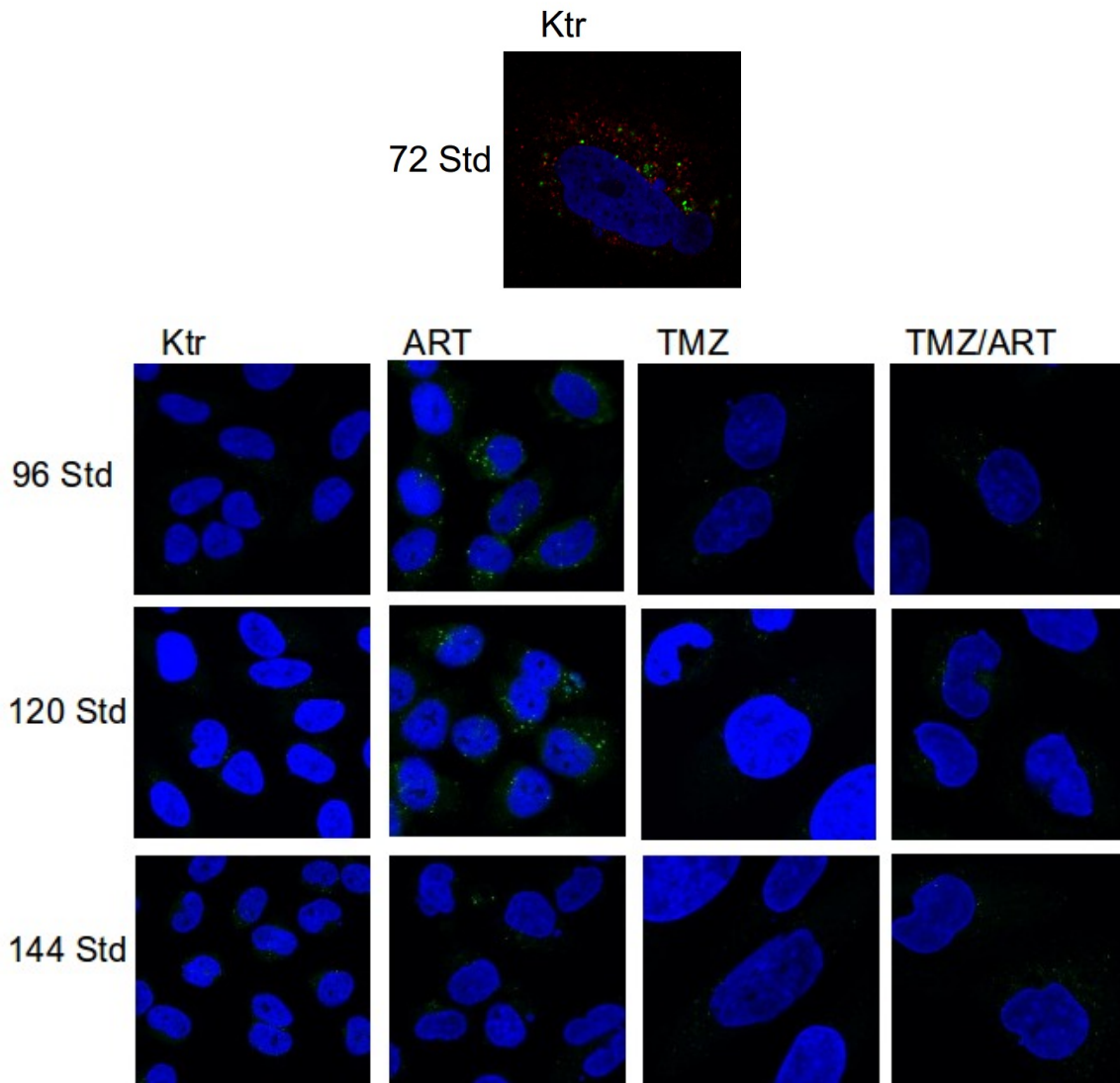


Abbildung 4.39: Untersuchung der Lysosomen und Autophagosomen der Zelllinie LN-229 innerhalb des neuen Behandlungsschemas. Immunfluoreszenz-Mikroskopie mittels LAMP2-Antikörper (Lysosomen in rot) und LC3B-Antikörper (Autophagosomen als grüne Foci) in fixierten Zellen der Zelllinie LN-229 innerhalb des neuen Behandlungsschemas von 96 bis 144 Stunden nach TMZ-Behandlung. Die Bilder sind mit einer 63-fachen Vergrößerung aufgenommen und die Zellkerne sind in blau dargestellt. Als Positiv-Kontrolle der Doppelfärbung diente die unbehandelte Kontrolle der Zelllinie LN-229 72 Stunden nach TMZ-Behandlung.

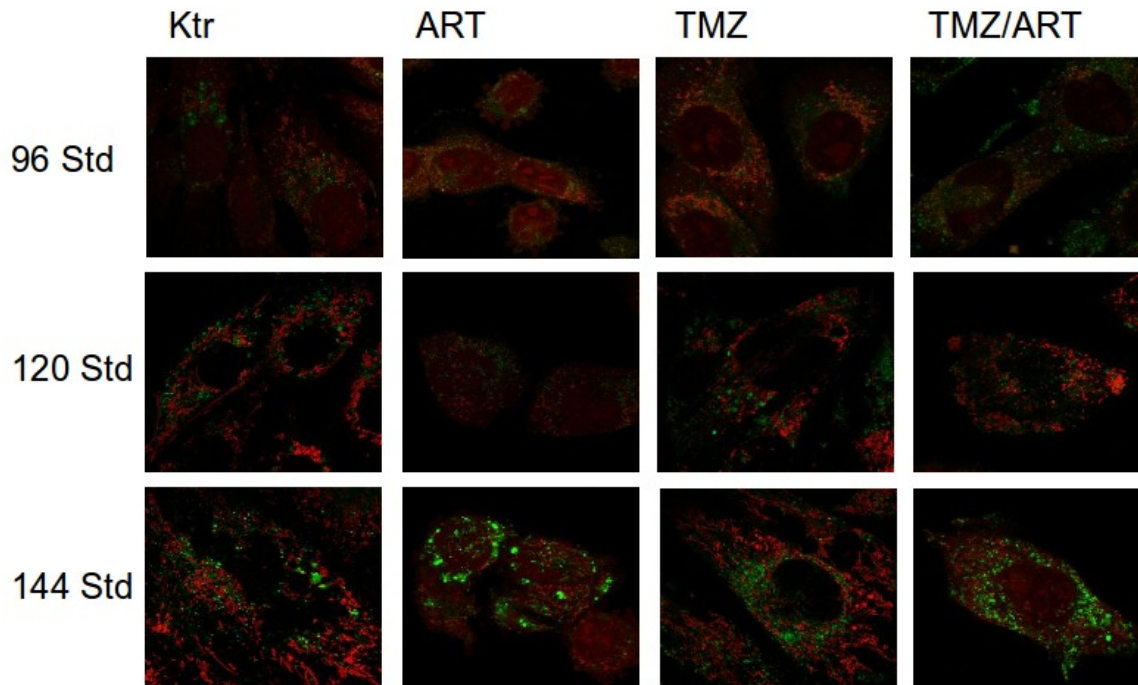


Abbildung 4.40: Lebenduntersuchung der Lysosomen und Mitochondrien der Zelllinie LN-229 innerhalb des neuen Behandlungsschemas. *Fluoreszenz-Mikroskopie mittels Lysotracker (Lysosomen in grün) und Mitotracker (Mitochondrien in rot) der Zelllinie LN-229 innerhalb des neuen Behandlungsschemas von 96 bis 144 Stunden nach TMZ-Behandlung. Die Bilder sind mit einer 63-fachen Vergrößerung aufgenommen.*

der Autophagosomen nicht deutlich zu beobachten. Das Protein Lamp2 der Lysosomen (hier in rot dargestellt) war in keiner der behandelten Zellen zu erkennen, nur in den Kontrollen unter 96 Stunden waren deutliche Signale beider Marker-Proteine zu sehen.

Zur weiteren Untersuchung der Lysosomen und Mitochondrien auf die Behandlungen innerhalb des neuen Behandlungsschemas wurden die fluoreszierenden Farbstoffe Lysotracker und Mitotracker verwendet. Mittels des Fluoreszenzmikroskops wurden auch hier Bilder der Zelllinie LN-229 96 Stunden, 120 Stunden und 144 Stunden nach TMZ-Behandlung für die unbehandelte Kontrolle, für die Einzelbehandlung mit ART und TMZ und für die Kombinationsbehandlung mit ART und TMZ erstellt. In Abb. 4.40

ist ein repräsentatives Bild aus jeder Serie gezeigt.

Die Lysosomen sind in grün dargestellt und selbst nach 144 Stunden in der Doppelbehandlung waren sie deutlich zu sehen und wiesen keine Unterschiede zu den Lysosomen der einzelbehandelten Zellen auf. Zuvor durchgeführte Westernblots mit Lamp2 nach 144 Std noch nach simultaner Behandlung zeigen ebenfalls keinen Unterschied in der Expression von Lamp2 zu den unbehandelten Kontrollen und den Einzelbehandlungen. Nach ART-Behandlungen war eine Veränderung der Mitochondrien zu erkennen. Sie zeigten nicht mehr die typische perlenschnurartige Struktur innerhalb einer stressfreien Zelle. Zudem war auch hier an den Zellen wieder die Größenzunahme nach TMZ-Gabe zu beobachten.

4.2.1.27 Untersuchung des Zelltods und des Autophagie-Prozesses in Abhängigkeit einer frühen Autophagie-Induktion

Eine zweite Hypothese im Rahmen der Einflussnahme der Autophagie auf den Gesamtprozess, der die Steigerung des Zelltods bedingt, führte zur Annahme, dass der Autophagieprozess überlastet war. Allein durch die frühzeitige Induktion der Autophagie und anschließender Zugabe von ART wurde der hohe Zelltod bedingt. Um zu untersuchen, ob eine alleinige frühe Induktion der Autophagie vor Behandlung mit ART die Induktion des Zelltods beeinflusst, wurden zwei verschiedene Wirkstoffe genutzt, die die Autophagie induzieren können. Zum einen wurde das bekannte und oft als Positivkontrolle verwendete Rapamycin verwendet, zum anderen wurde Ammoniak zur Autophagie-Induktion genutzt. Die Behandlung erfolgte nach dem neuen Behandlungsschema, statt TMZ-Behandlung wurden die anderen beiden Autophagie-Induktoren verwendet. Hundertvierundvierzig Stunden nach Behandlung mit den Induktoren wurden die Zellen geerntet und für zwei parallele Analysen mit dem Durchflusszytometer gefärbt. Zum einen wurde mittels Annexin/PI-Färbung der Zelltod und zum anderen mittels CytoID-Färbung die Autophagie-Induktion gemessen. Die Ergebnisse für die drei Zelllinien sind in Abb. 4.41 zusammengestellt.

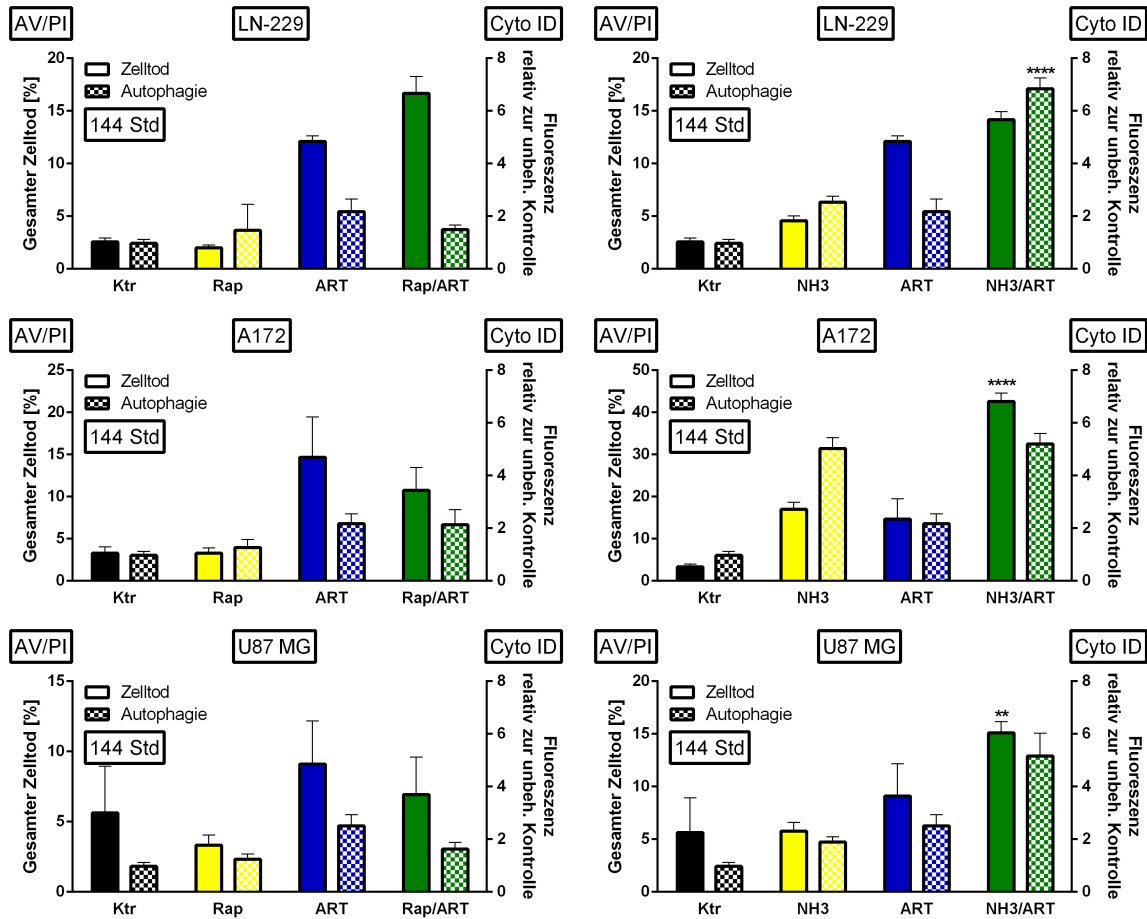


Abbildung 4.41: Analyse von Zelltod und Autophagie der Zelllinien in Abhängigkeit der Autophagie-Induktion. Zelltod- und Autophagie-Analyse mittels Durchflusszytometrie der Zelllinien LN-229 (oben), A172 (Mitte) und U87 MG (unten) 144 Stunden nach TMZ-Behandlung mit und ohne Vorbehandlungen von Rapamycin (linke Spalte) und Ammoniak (rechte Spalte). Die Fluoreszenzinduktion (CytoID) ist relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt (rechte Skalierung).

Der Autophagie-Induktor Rapamycin erwies sich in diesen drei Zelllinien als kein wirkungsvoller Induktor der Autophagie. In der Zelllinie LN-229 wurde durch die Kombinationsbehandlung der Zelltod etwas gesteigert, die Autophagie-Induktion von Rapamycin blieb aber auch hier gering.

Im Gegensatz dazu zeigte sich Ammoniak als wesentlich besserer Autophagie-Induktor, besonders in der Zelllinie A172. Hier manifestierte sich auch die Kombination als starker Induktor des Zelltodes, ebenso in der Zelllinie U87 MG. Bei der Zelllinie LN-229 war die Steigerung des Zelltodes durch die Kombinationsbehandlung eher gering, aber die Autophagie-Induktion höher als in den anderen beiden Zelllinien.

4.2.1.28 Untersuchung der Seneszenz im zeitlichen Verlauf

Die Ergebnisse der Zellzyklusanalysen und die Einflussnahme des Überlebensmechanismus Autophagie auf den Zelltod deuten auf einen weiteren Mechanismus der Zellen, die Seneszenz. Da die Autophagie in engem Bezug zur Seneszenz steht [Knizhnik u. a. (2013); Kuilman u. a. (2010)], entwickelte sich die Hypothese, dass nicht nur die Autophagie als Überlebensmechanismus der Zellen gestört ist, sondern sich die Behandlung mit ART auch auf die Seneszenz auswirkt. Zur Messung der Induktion der Seneszenz in den Zellen wurden sie nach neuem Behandlungsschema behandelt und anschließend vor der Ernte mit Bafilomycin behandelt, um im Inneren der Zelle für ein saures Milieu (pH 6) zu sorgen. In diesem Milieu ist die Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase (SABG) wirksam und spaltet ihre Substrate. Zur Bestimmung der SABG-Aktivität wurde ein synthetisches Substrat verwendet, das nach Spaltung durch die SABG fluoresziert. Dieses Substrat ist 5-Dodecanoylamino fluorescein Di- β -D-Galactopyranoside (C_{12} FDG) und wurde nach Bafilomycin-Behandlung zu den Zellen gegeben. Die Fluoreszenz wurde mittels Durchflusszytometer gemessen, die Intensitäten werden relativ zur unbehandelten Kontrolle angegeben. Die Ergebnisse für die Werte 96, 120 und 144 Stunden sind in Abb. 4.42 dargestellt.

Die Zelllinien LN-229 und A172 zeigten sehr ähnliche Induktions-Profile, die Zelllinie

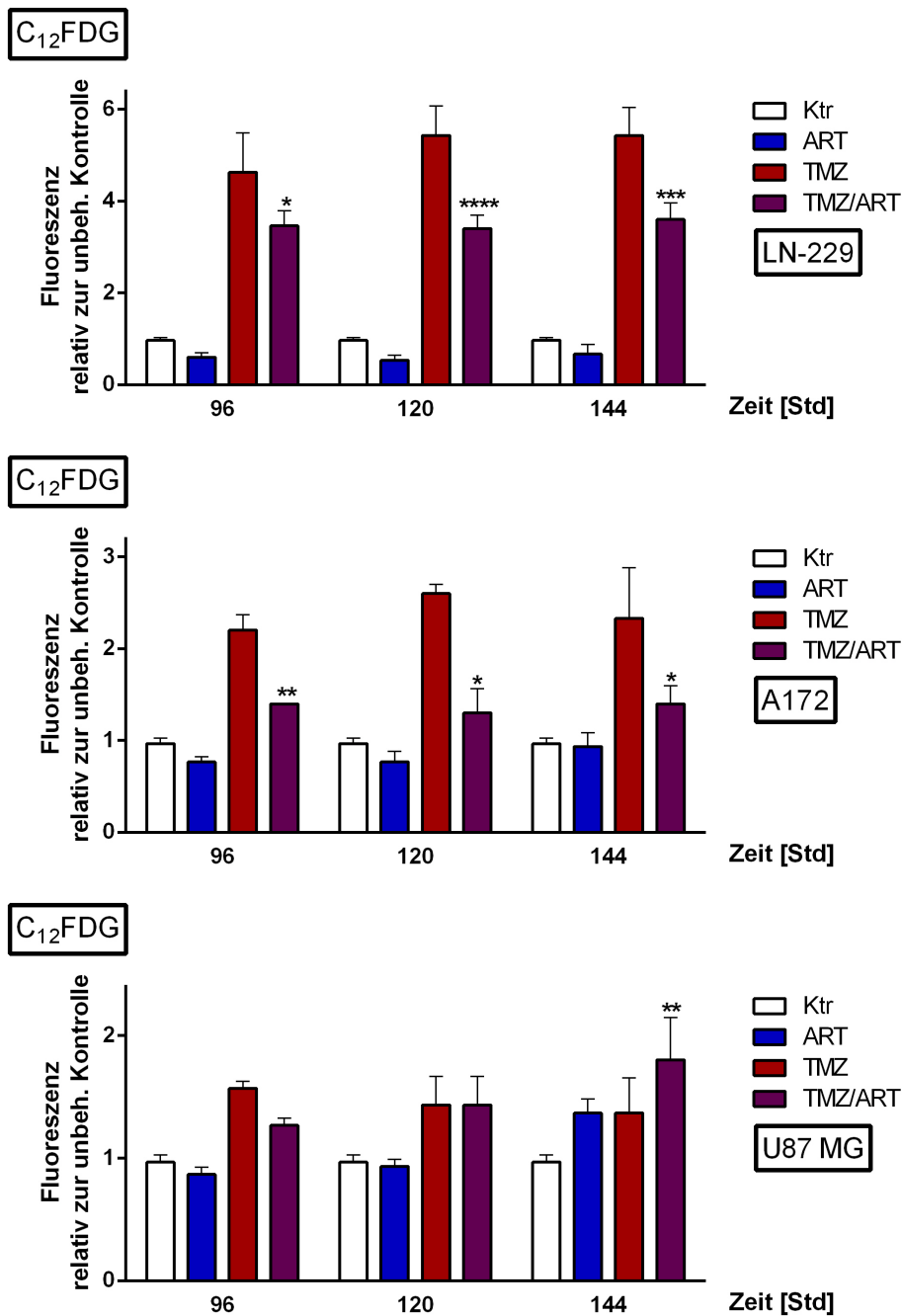


Abbildung 4.42: Untersuchung zum Seneszenz-Verlauf (C₁₂FDG). Durchflusszytometrie-Analyse mittels des Fluoreszenzfarbstoffs 5-Dodecanoylamino fluorescein Di-β-D-Galactopyranoside bei den Zelllinien LN-229 (oben), A172 (Mitte) und U87MG (unten) von 96 bis 144 Stunden nach TMZ-Zugabe. Die Fluoreszenzinduktion ist relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt.

U87MG wich von diesen ab. Zudem war die Induktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle deutlich geringer als in den anderen beiden Zelllinien. Bei den Zelllinien LN-229 und A172 lag die Induktion der Seneszenz nach ART-Behandlung leicht unter der der unbehandelten Kontrollen. Nach TMZ-Behandlung nahm die Induktion über die Zeit stark zu, bei der Zelllinie LN-229 lag der Wert fünffach über dem der unbehandelten Kontrolle und bei der Zelllinie A172 lag der Wert 2,5-fach über dem der unbehandelten Kontrolle. In der Kombinationsbehandlung war die Induktion der Seneszenz deutlich geringer.

Bei der Zelllinie U87MG lag die Induktion der Seneszenz nur bis zu einem Zeitpunkt von 120 Stunden unter der der unbehandelten Kontrolle. Dann stieg sie auf den Level der TMZ-Behandlung an, der recht konstant bei einem Wert von 1,5 lag. Die Induktion nach Kombinationsbehandlung lag bei 96 Stunden noch unter dem der TMZ-Einzelbehandlung, nach 120 Stunden waren beide Werte gleich auf. Dann stieg die Induktion der Seneszenz nach der Kombinationsbehandlung weiter an und überstieg die der Einzelbehandlung von TMZ bei einen Wert von etwa 1,8.

4.2.2 **Bestrahlung und Artesunat**

Das simultane und das neue zeitlich versetzte Behandlungsschema für die Kombination von Temozolomid und Artesunat wurde anschließend auf die Kombination von Bestrahlung und Artesunat übertragen. Zunächst wurde die Proliferation und die Induktion des Zelltods nach Bestrahlung und Behandlung von Artesunat untersucht. Anschließend wurde der Einfluss der Behandlungen auf den Zellzyklus und den Autophagie-Prozess der Zellen analysiert.

4.2.2.1 Untersuchung der zellulären Sensitivität nach Behandlung mit IR und ART

Zur Bestimmung der Sensitivität der Zelllinien gegenüber IR und ART wurden dosisabhängige Kolonieassays mit allen drei Zelllinien durchgeführt, die die Proliferation und das Überleben der Zellen widerspiegeln. Die Ergebnisse der Kolonieassays sind in Abb. 4.43 zusammengestellt. Anschließend wurden verschiedene Behandlungsschemata auf die Zelllinie LN-229 übertragen und in Abhängigkeit des induzierten Zelltods analysiert. Die Ergebnisse der zytometrischen Messungen sind in Abb. 4.44 dargestellt.

Nach Bestrahlung der Zellen (siehe Abb. 4.43) zeigte sich die Zelllinie A172 am sensitivsten, sowohl im direkten Vergleich mit den anderen Zelllinien (oben links) als auch in der Kombination mit ART (unten links). Die anderen beiden Zelllinien zeigten nach Bestrahlung eine ähnliche aber etwas schwächere Sensitivität. In der Kombination mit ART zeigte sich die Zelllinie LN-229 sensitiver als die Zelllinie U87 MG. Mit ansteigender Konzentration von ART und Erhöhung der Bestrahlung nahm die Sensitivität der Zelllinie LN-229 weiter zu. Bei der Zelllinie U87 MG stieg die Sensitivität mit Erhöhung der ART-Behandlung und der Bestrahlung zu Beginn an. Bei einer Dosis über 3 Gy wechselte das Verhalten der Zellen und die Zellen mit der höchsten Konzentration von ART zeigten sich am resistentesten. Dennoch stieg die Sensitivität der Zellen mit zunehmender Bestrahlung weiter an.

In den Zelltodanalysen der Zelllinie LN-229 (vergleiche Abb. 4.44) zeigte sich schon nach 48 Stunden und einer geringen Strahlendosis von 5 Gy eine effektivere Induktion des Zelltods nach dem neuen Behandlungsschema (oben rechts) als nach simultaner Behandlung mit ART und Strahlung (oben links). Hundertvierundvierzig Stunden nach der Bestrahlung und der doppelten Strahlendosis zeigte sich dieses Bild noch deutlicher und über 60 % der Zellen starben nach der Kombinationsbehandlung (unten).

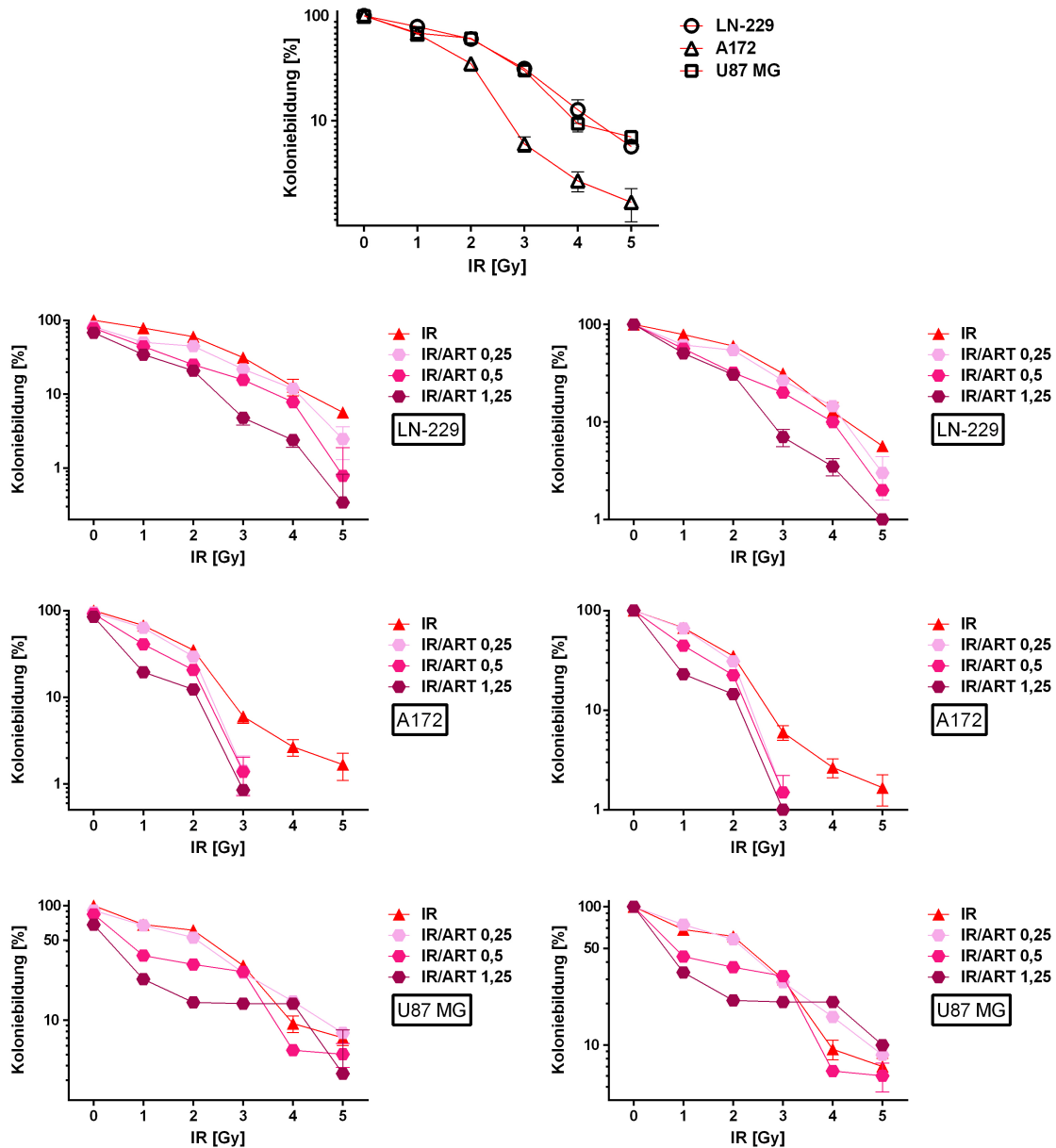


Abbildung 4.43: Zytotoxische Wirkung der Kombinationsbehandlung von IR und ART auf Glioblastomzellen. Kolonien ausgesäter Zellen der Zelllinien nach Bestrahlung in Abhängigkeit aufsteigender Dosen (oben). Überlebensanteil ausgesäter Zellkolonien von LN-229 (2.Reihe), A172 (3.Reihe) und U87 MG (4.Reihe) nach Bestrahlung in Abhängigkeit der Zugabe von ART 72 Stunden nach Bestrahlung mit aufsteigenden Konzentrationen von ART (linke Spalte) und nach Normierung der aufsteigenden Konzentrationen von ART (rechts).

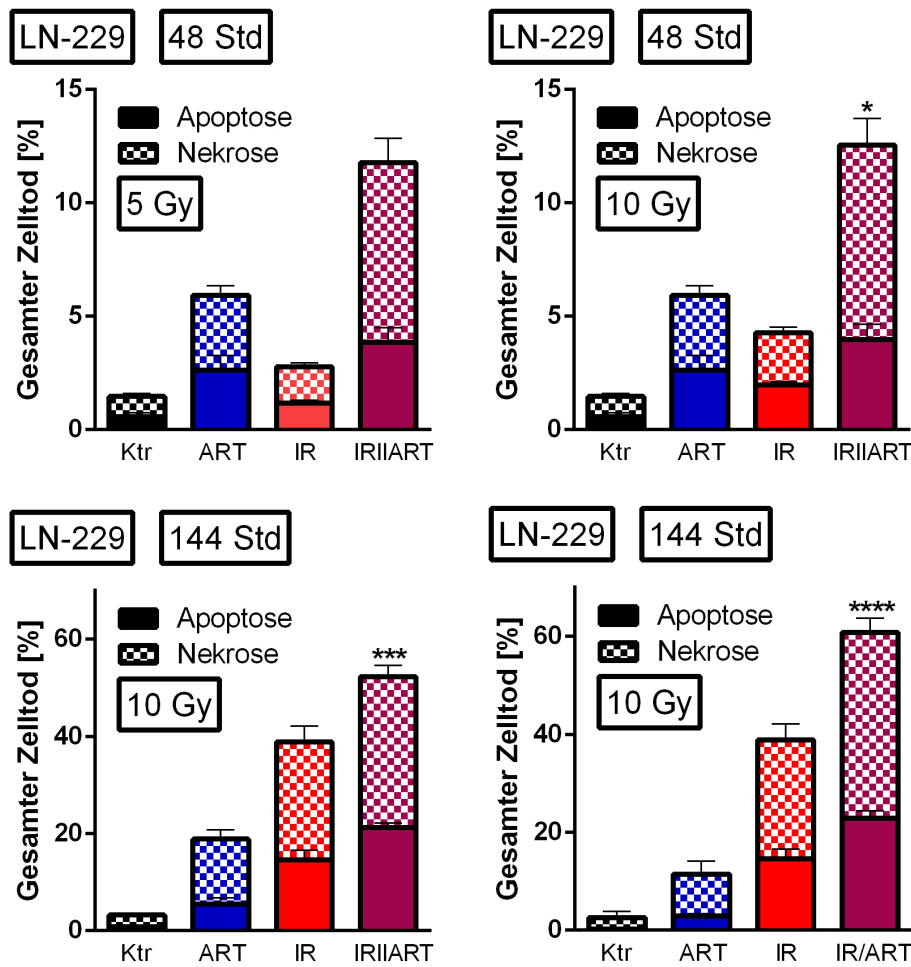


Abbildung 4.44: Gegenüberstellung des Gesamtzelltods verschiedener Behandlungsschemata bei der Zelllinie LN-229. Zelltodanalysen verschiedener Behandlungsschemata bei der Zelllinie LN-229 mittels Durchflusszytometrie: unbehandelte Zellen (schwarz), mit ART behandelte Zellen (blau), bestrahlte Zellen (rot) und Kombinationsbehandlung (violett). Gesamtzelltod nach Einzel- und Kombinationsbehandlung von IR und ART 48 Stunden nach simultaner Zugabe mit 5 Gy Bestrahlung (oben links) und 10 Gy Bestrahlung (oben rechts). Gesamtzelltod nach Einzel- und Kombinationsbehandlung von 10 Gy Bestrahlung und ART-Behandlung 144 Stunden nach simultaner Zugabe von ART (unten links) und Zugabe von ART 72 Stunden nach Bestrahlung (neues Behandlungsschema, unten rechts).

4.2.2.2 Morphologische Untersuchung der Zelllinie LN-229 nach Einzelbehandlung mit ART und IR und Kombination von ART und IR innerhalb des neuen Behandlungsschemas

Um einen weiteren Eindruck der Wirkung der Kombinationsbehandlung auf die Zellen zu bekommen, wurde die Zelllinie LN-229 144 Stunden nach Behandlung unter dem Mikroskop beobachtet. Repräsentative Bilder sind in Abb. 4.45 zusammengestellt.

Die Zellen der unbehandelten Kontrolle und nach der Einzelbehandlung von ART verhielten sich wie bei dem in Kapitel 4.2.1.18 beschriebenen Versuch. Nach Einzelbehandlung von ART verkürzten sich die Ausläufer der Zellen, sodass diese kantiger erschienen. Zudem nahm die Granularität der Zellen stark zu. Nach der Bestrahlung nahmen die Zellen an Größe zu, zeigten sich stark abgeflacht und auch hier nahm die Granularität zu. In der Kombinationsbehandlung ähnelte die zelluläre Veränderung überwiegend den nur mit ART behandelten Zellen. Die Zellen waren nicht so stark abgeflacht und vergrößerten sich auch nicht wie nach IR-Einzelbehandlung. Aber auch hier nahm die Granularität stark zu und die Zellen verkürzten ihre Ausläufer und wirkten somit in ihrer Form ebenfalls kantiger. Die vielen Vesikel in den Zellen waren nach Kombinationsbehandlung besonders deutlich zu erkennen. Die Zelldichte und Zellzahl der Zellen nahm in der Kombinationsbehandlung stark ab.

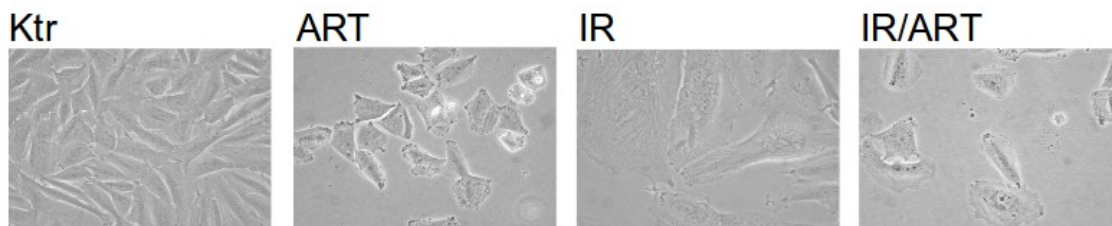


Abbildung 4.45: Morphologie der Zelllinie LN-229 nach ART-Behandlung und Bestrahlung. Lebendaufnahmen der Zelllinie LN-229 in 32-facher Vergrößerung 144 Stunden nach Einzelbehandlung von ART und Bestrahlung und nach Kombinationsbehandlung folgend dem neuen Behandlungsschema.

4.2.2.3 Zellzyklusanalyse der Zelllinie LN-229 nach Einzelbehandlung von ART und IR und in Kombination

Um den Zelltod und die Auswirkungen auf den Zellzyklus näher zu untersuchen, wurde der Zellzyklus im zeitlichen Verlauf von 72 Stunden bis 144 Stunden nach Bestrahlung mit simultaner ART-Zugabe und innerhalb des neuen Behandlungsschemas untersucht. In beiden Behandlungsschemata wurde die Strahlendosis von 10 Gy gewählt. Für die Untersuchung wurde der DNA-Gehalt mittels PI-Färbung am Durchflusszytometer analysiert. Um ausschließlich den Zyklus der lebenden Zellen zu untersuchen, wurden die SubG1-Fractionen (tote Zellen) gesondert dargestellt. Die Ergebnisse sind als Balkendiagramme in Abb. 4.46 für die simultane Behandlung mit IR und ART und in Abb. 4.47 für die zeitversetzte Behandlung mit IR und ART nach dem neuen Behandlungsschema dargestellt. Für beide Abbildungen sind oben jeweils die SubG1-Daten gezeigt und unten die Zellzyklusphasen zusammengestellt.

Mit der Dauer der Behandlungen stieg der Anteil der toten Zellen (SubG1-Anteil) weiter an, die höchsten Werte wurden nach der Kombinationsbehandlung erreicht. In den Zellzyklusanalysen waren deutlich die gleichen Profile in der unbehandelten Kontrolle und nach Bestrahlung zu erkennen. Nach Gabe von Artesunat und in der Kombinationsbehandlung unterschieden sich die Profile der verschiedenen Behandlungsschemata voneinander.

In der unbehandelten Kontrolle stieg der Anteil an Zellen in der G1-Phase über die Zeit leicht an, während die Anteile der Zellen in der G2-Phase und der S-Phase leicht absanken. Nach der Bestrahlung war die G1-Phase deutlich geringer als in der unbehandelten Kontrolle, aber konstant über die Zeit. Ebenfalls annähernd konstant war die G2-Phase mit etwa 20 %, die S-Phase nahm über die Zeit leicht ab. Der größte Anteil der Zellen befand sich mit bis zu 60 % in der tetraploiden Phase.

Bei simultaner Gabe von ART (zeitgleich zur Bestrahlung) zeigte sich ein leichter G2-Block von etwa 30 %, der über die Zeit konstant erhalten blieb. Die S-Phase und die tetraploide Phase fielen mit unter 10 % sehr gering aus. Die G1-Phase fiel etwas

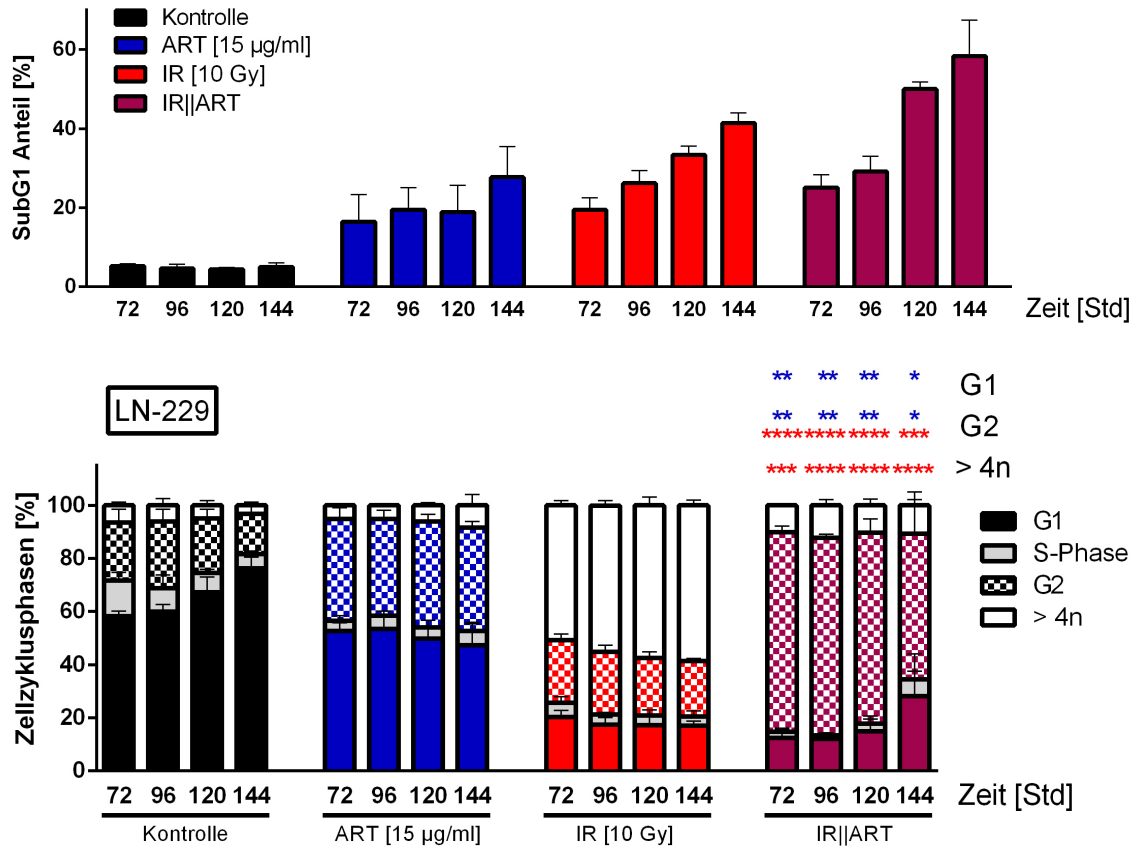


Abbildung 4.46: Apoptose- und Zellzyklusanalysen der Zelllinie LN-229 nach ART-Behandlung und Bestrahlung nach simultanem Behandlungsschema. Apoptoseanalyse als SubG1 Anteil (oben) und Zellzyklusanalysen ohne SubG1-Anteil (unten) der Zelllinie LN-229 von 72 Stunden bis 144 Stunden nach Einzelbehandlung von ART und Bestrahlung und nach Kombinationsbehandlung. Die Signifikanzen zur Kombinationsbehandlung sind für ART (blau) und IR (rot) getrennt für die Phasen G1, G2 und $>4n$ dargestellt. Unterschiede in den S-Phasen sind nicht signifikant.

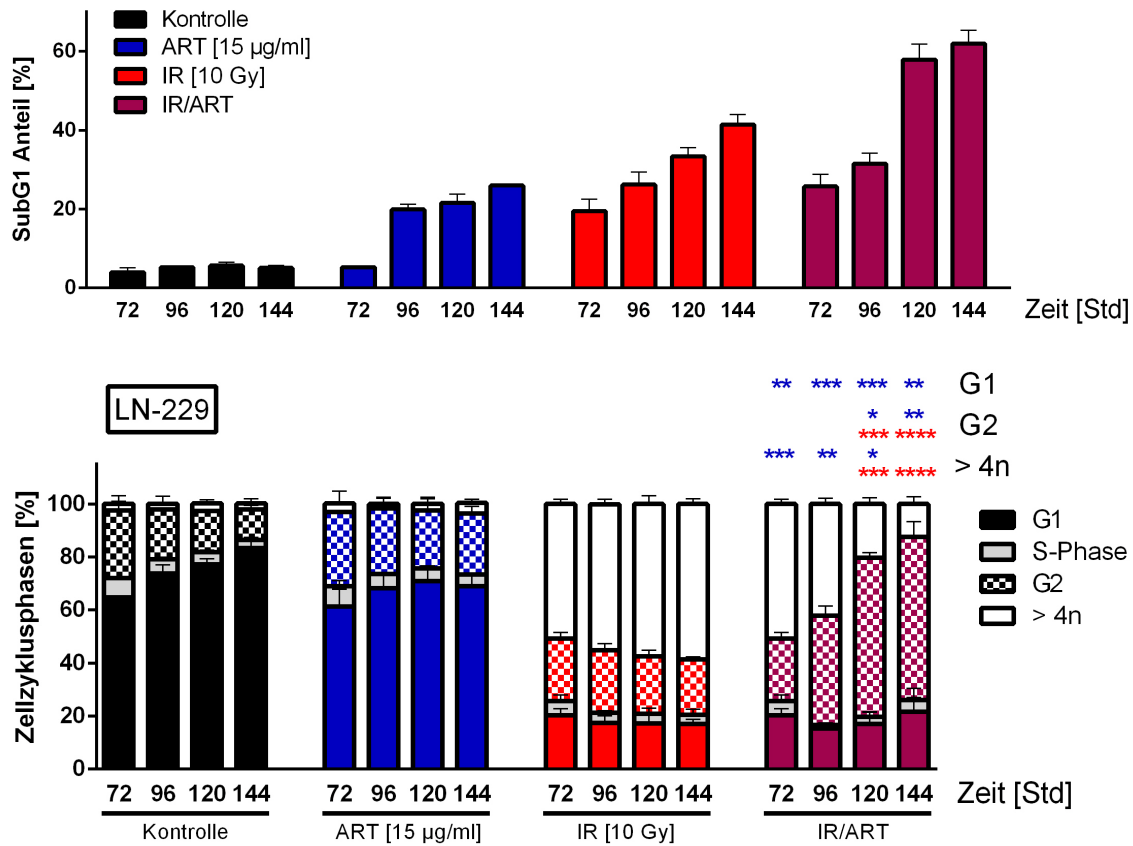


Abbildung 4.47: Apoptose- und Zellzyklusanalysen der Zelllinie LN-229 nach ART-Behandlung und Bestrahlung nach dem neuen Behandlungsschema. Apoptoseanalyse als SubG1 Anteil (oben) und Zellzyklusanalysen ohne SubG1-Anteil (unten) der Zelllinie LN-229 von 72 Stunden bis 144 Stunden nach Einzelbehandlung von ART und Bestrahlung und nach Kombinationsbehandlung nach neuem Behandlungsschema. Die Signifikanzen zur Kombinationsbehandlung sind für ART (blau) und IR (rot) getrennt für die Phasen G1, G2 und >4n dargestellt. Unterschiede in den S-Phasen sind nicht signifikant.

geringer als in der unbehandelten Kontrolle aus und blieb über die Zeit recht konstant. In der simultanen Kombinationsbehandlung war nach 72 Stunden mit etwa 75 % ein deutlicher G2-Block entstanden, der über die Zeit nur gering abfiel. Zudem war eine stärkere tetraploide Phase zu erkennen als in der unbehandelten Kontrolle oder nach Einzelbehandlung von ART. Eine deutliche S-Phase und eine etwas größere G1-Phase war nur nach 144 Stunden zu erkennen.

Innerhalb des neuen Behandlungsschemas war nach Einzelgabe von ART ein geringerer G2-Block zu erkennen als im simultanen Behandlungsschema. In der Kombinationsbehandlung war zunächst ein deutlicher Unterschied der Phasenanteile in Bezug auf die Behandlungsschemata zu erkennen. Der deutliche G2-Block in der Kombinationsbehandlung mit simultaner ART-Gabe war zu Beginn noch sehr gering und stieg mit der Zeit an. Die am Anfang sehr starke tetraploide Phase fiel über die Zeit ab. Nach 144 Stunden sahen die Phasenprofile in der Kombinationsbehandlung nach simultaner Gabe und nach dem neuen Behandlungsschema sehr ähnlich aus.

4.2.2.4 Untersuchungen zum Autophagie-Prozess nach Behandlung von IR und ART

Zur Untersuchung des Autophagie-Prozesses nach Bestrahlung und Behandlung von ART innerhalb des neuen Behandlungsschemas wurden die Zellen 144 Stunden nach Bestrahlung mit und ohne Bafilomycin-Behandlung geerntet und anschließend die Proteine isoliert. Wie zuvor in der Untersuchung des Autophagie-Prozesses nach Behandlung von TMZ und ART (siehe Kapitel 4.2.1.20) wurde auch hier die LC3BII-Expression analysiert. Als Ladekontrolle diente das ERK2 Protein. Ein repräsentativer Westernblot ist in Abb. 4.48 dargestellt.

Nach Einzelbehandlung mit ART zeigte die Zelllinie LN-229 eine gesteigerte Expression von LC3BII, aber mit dem Inhibitor Bafilomycin zusammen war die Ansammlung an LC3BII in den Zellen geringer. Bei der Bestrahlung zeigte sich eine minimale LC3BII-Bande. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, in der ohne Bafilomycin keine Bande

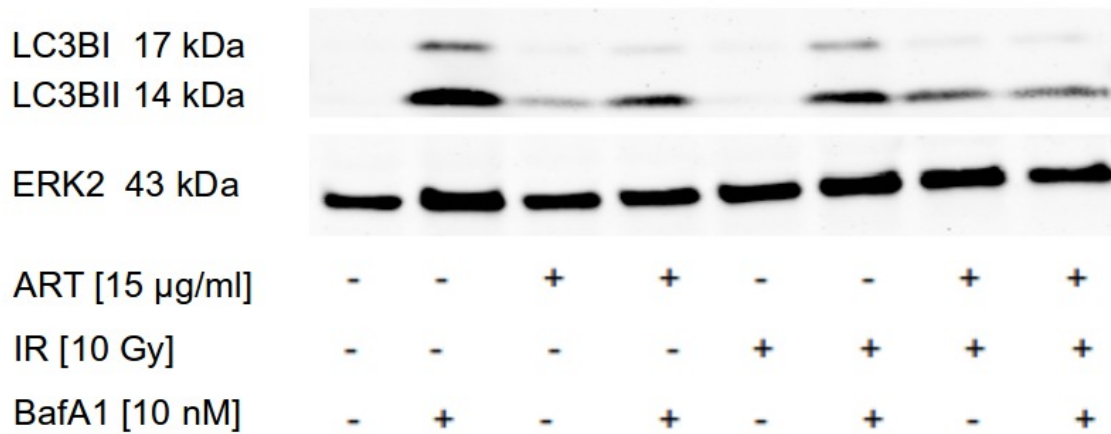


Abbildung 4.48: Untersuchung zum Autophagie-Prozess (LC3BII) innerhalb des neuen Behandlungsschemas von ART und IR. *Westernblot zur LC3BII-Expressionsanalyse bei der Zelllinie LN-229 nach neuem Behandlungsschema 144 Stunden nach Bestrahlung ohne und mit Bafilomycin. Als Ladekontrolle diente das Protein ERK2.*

zu erkennen war, entsprach dies einer leichten Zunahme. Nach Behandlung mit Bafilomycin war eine deutliche Bande zu beobachten, die wesentlich geringer als in der Kontrolle ausfiel.

Nach Kombinationsbehandlung von ART und Bestrahlung war die LC3BII-Expression deutlich gesteigert gegenüber der unbehandelten Kontrolle und den Einzelbehandlungen. Wurde diese Behandlung noch mit dem Inhibitor Bafilomycin kombiniert, beobachtete man eine etwa gleich starke Bande wie ohne Inhibitor. Somit zeigte sich hier eine deutlich geringere Akkumulation von LC3BII als in den nur mit Bafilomycin behandelten Zellen.

4.3 In vivo-Experimente

Zur Studie der Wirksamkeit der Kombinationsbehandlung von TMZ und ART *in vivo* wurde zunächst mit einem *subkutanen* Tumormausmodell begonnen. Da von den verwendeten Zelllinien nur die Zelllinie U87MG in dieser Studie unter der Haut tumorgen war, wurden diese Versuche nur mit dieser Zelllinie durchgeführt. Dabei wurde das Tumorwachstum gemessen und analysiert. Anschließend wurde ein weiterer *in vivo*-Versuch durchgeführt. Dabei wurde die Hauptzelllinie LN-229 verwendet und direkt in das Gehirn der Mäuse injiziert (*intrakraniell*). Während des Versuchsverlaufs wurde das Verhalten und das Überleben der Mäuse während der Behandlung analysiert. Zur weiteren Überwachung der Tiere und des Tumorwachstums wurden während des Versuchs MRT-Untersuchungen der Tiere durchgeführt. Nach Beendigung der Versuche wurden die Tumore bzw. die Gehirne der Mäuse histologisch untersucht und ggf. zusammen mit den MRT-Bildern ausgewertet.

4.3.1 Subkutanes Tumormodell der Maus

Das *subkutane* Experiment wurde drei Mal mit mindestens fünf Tieren pro Gruppe unabhängig voneinander wiederholt. Nachdem die Tumore unter der Haut angewachsen waren, wurden die Tiere so in Gruppen eingeteilt, dass das Gesamtvolumen der Tumore pro Gruppe möglichst gleich groß war. Danach wurde mit der Behandlung nach dem im Kapitel 4.3.1.1 beschriebenen Schema begonnen.

Alle zwei Tage wurde das Tumolvolumen und das Gewicht der Tiere bestimmt. Bei zu hohem Gewichtsverlust, zu großem oder offenem Tumor wurden die Tiere terminiert. In den folgenden Abschnitten wird das Behandlungsschema und die Ergebnisse der Experimente und Untersuchungen dargestellt.

4.3.1.1 Behandlungsschema des *subkutanen* Mausmodells

Die *subkutane* Injektion der Zellen erfolgte auf beiden Flanken einer Maus. Nach erreichtem Mindestvolumen der Tumore von $100\ \mu\text{l}$ ($100\ \text{mm}^3$) wurde durch die einmalige *interperitoneale* TMZ-Gabe von 100 mg pro kg Mausgewicht mit der Behandlung der Mäuse begonnen (Tag 0). Ab dem Folgetag wurde das ART *oral* über das Trinkwasser mit einer Konzentration von 1 mg pro ml gegeben (Tag 1). Jeden zweiten Tag wurde das Trinkvolumen der Tiere gemessen und das Trinkwasser frisch angesetzt. Ab der TMZ-Gabe wurde jeden zweiten Tag das Gewicht und das Tumolvolumen der Mäuse gemessen und dokumentiert. Das Behandlungsschema ist in Abb. 4.49 dargestellt.

4.3.1.2 Untersuchung der Tiere und Tumore im *subkutanen* Mausmodell

Um die Wirkung der Kombinationsbehandlung von ART und TMZ im *in vivo*-Experiment zu untersuchen, wurden die Tumorumfänge aus den mit der Schieblehre erfassten Daten berechnet. Die Mittelwerte aller Tumore einer Gruppe sind in Abhängigkeit der Zeit oben in Abb. 4.50 zusammengestellt. Darunter befinden sich repräsentative Bilder von den Flanken der Tiere mit den Tumoren bei Versuchsende am Tag 12. Desweiteren wurde das Körpergewicht der Mäuse überwacht und dokumentiert, um das Wohlbefinden der Tiere zu gewährleisten und Nebenwirkungen zu kontrollieren. Die Gewichtskurven sind in Abb. 4.51 dargestellt.

Das Tumolvolumen der Tiere ohne Behandlung (Kontrolle) und mit ART-Behandlung nahm über die gesamte Zeitspanne zu. Bei den Tumoren der Mäuse mit ART-Behandlung kam es am Tag vier zu einer Wachstumspause, daher lag die Wachstumskurve unter der Kurve der Kontrolltiere. Das Tumolvolumen der Tiere mit TMZ-Behandlung nahm nur minimal zu und am Tag 12 nahm dieses Volumen sogar leicht ab. Während der Kombinationsbehandlung von TMZ und ART kam es zur kontinuierlichen Reduktion des Tumorumfanges. Am Tag 12 waren bei einigen Tieren keine Tumore mehr zu messen.

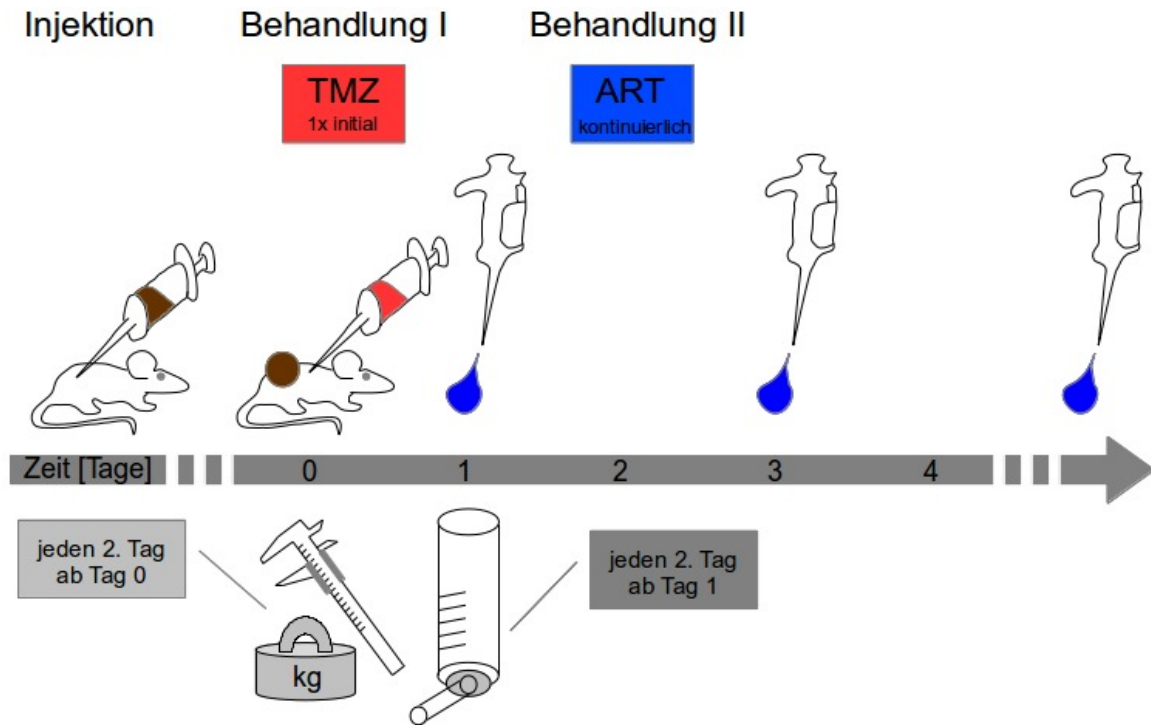


Abbildung 4.49: Behandlungsschema der *subkutanen in vivo*-Mausmodelle. Die subkutane Injektion erfolgte auf beiden Flanken einer Maus. Bei einem Mindestvolumen von 100 μ l wurde mit der einmaligen interperitonealen TMZ-Gabe mit dem Versuch begonnen (Tag 0). Ab dem Folgetag wurde ART oral über das Trinkwasser gegeben (Tag 1). Jeden zweiten Tag wurde das Trinkvolumen gemessen und das Trinkwasser neu angesetzt. Ab der TMZ-Gabe wurde jeden zweiten Tag das Gewicht und das Tumorumfang der Mäuse gemessen und dokumentiert.

Bei der Kontrollgruppe nahm das Körpergewicht der Tiere ab Tag vier stark zu. In den anderen Gruppen sank zunächst das Körpergewicht in den ersten vier bis sechs Tagen, dann stieg dieses in der TMZ-Gruppe und der TMZ/ART-Gruppe wieder stark an und erreichte am Tag 12 wieder das Gewicht der Mäuse aus der Kontrollgruppe. Das Körpergewicht der Mäuse aus der ART-Gruppe blieb ab Tag sechs unter denen der anderen Gruppen. Bei dieser Darstellung ist zu beachten, dass das Gewicht des Tumors mit im Körpergewicht inbegriffen ist. Das heißt besonders für die Mäuse der

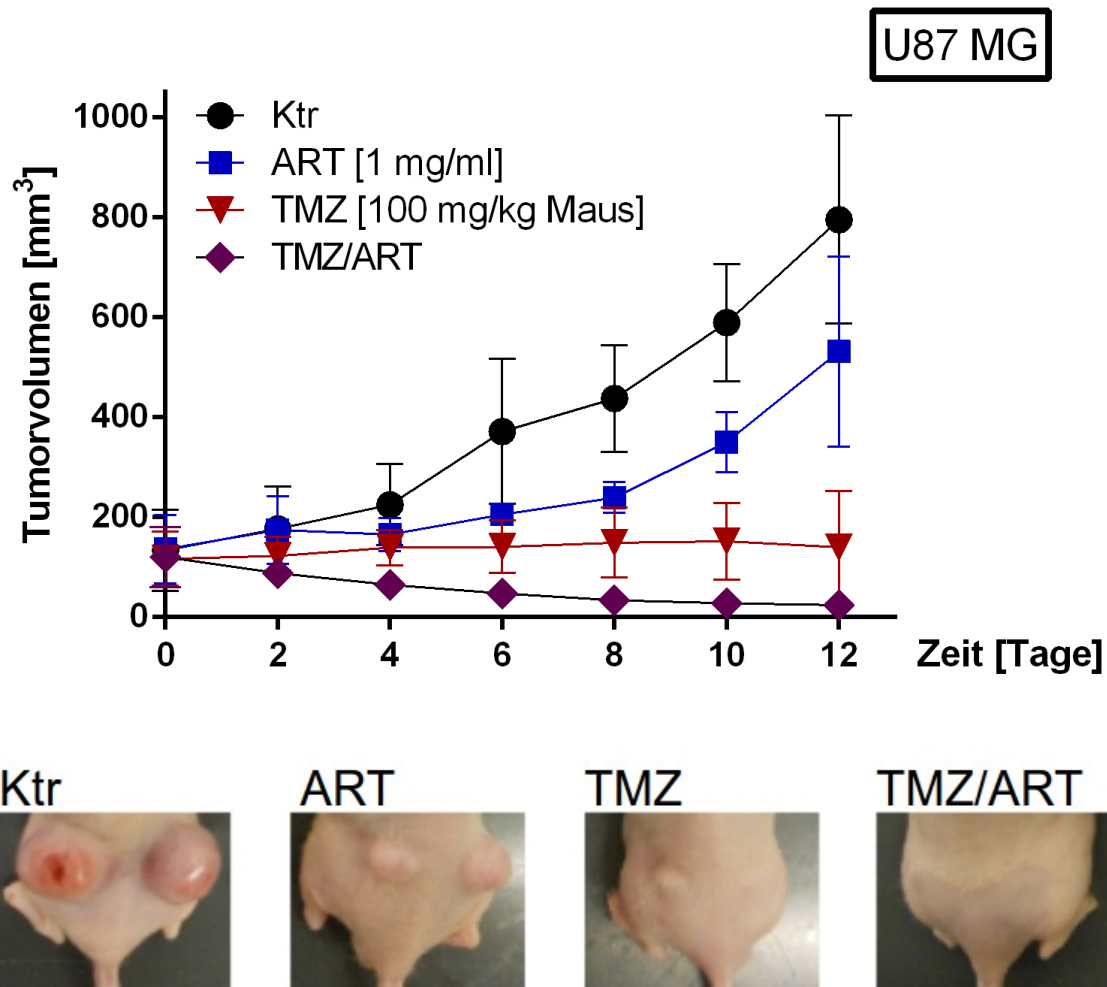


Abbildung 4.50: Auswertung des *subkutanen in vivo*-Versuchs mit der Zelllinie U87 MG. Auswertung von drei unabhängigen Tierversuchen nach zuvor beschriebenen Versuchsschema mit der Zelllinie U87 MG. Die Mittelwerte der Tumorumfänge sind in Abhängigkeit der Zeit dargestellt (oben). Repräsentative Bilder von den Flanken der Tiere mit den Tumoren bei Versuchsende am Tag 12 (unten).

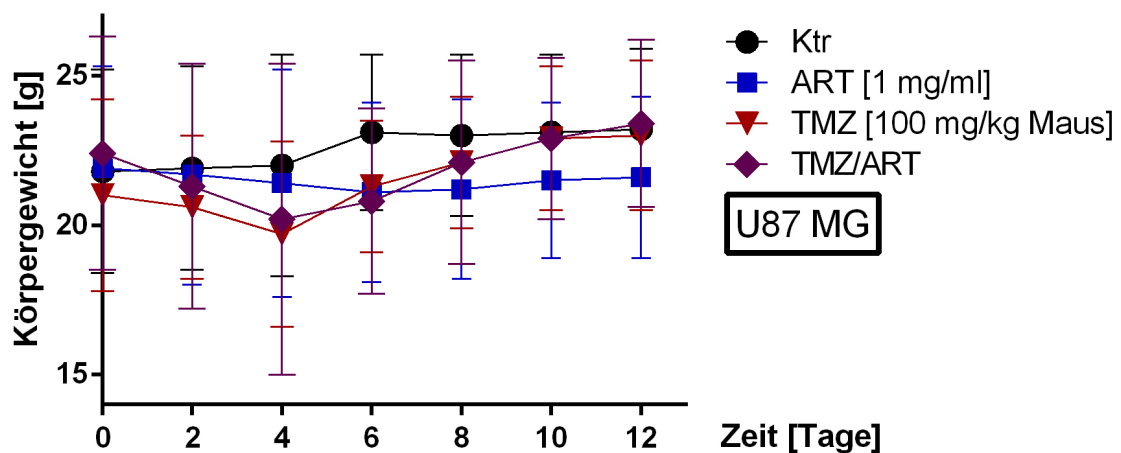


Abbildung 4.51: Gewichtskontrolle für den *subkutanen in vivo*-Versuch mit der Zelllinie U87 MG. Auswertung von drei unabhängigen Tierversuchen nach zuvor beschriebenem Versuchsschema mit der Zelllinie U87 MG. Die Mittelwerte der Körpergewichte der Mäuse sind in Abhängigkeit der Zeit dargestellt.

ART-Gruppe, dass das Körpergewicht über die Zeit weiter abnahm, während das Tumolvolumen stieg.

4.3.1.3 Histologische und immunhistologische Untersuchung der Tumore aus dem *subkutanen* Mausmodell

Um die Tumore und die Wirkung der Behandlung auf die Tumore genauer untersuchen zu können, wurden die Tumore in Parafin eingebettet und histologisch untersucht. Als morphologische Übersichtsfärbung wurden einzelne Schnitte des Tumors mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung versehen. Um die humanen Glioblastomzellen von dem Gewebe der Maus unter der Haut zu unterscheiden, wurden einzelne Schnitte mit dem humanen neuronalen Marker Nestin markiert.

Zur näheren Untersuchung der Wirkung von den Behandlungen auf das Tumorgewebe wurden einzelne Schnitte mit dem LC3-Antikörper (LC3) markiert und andere mit dem

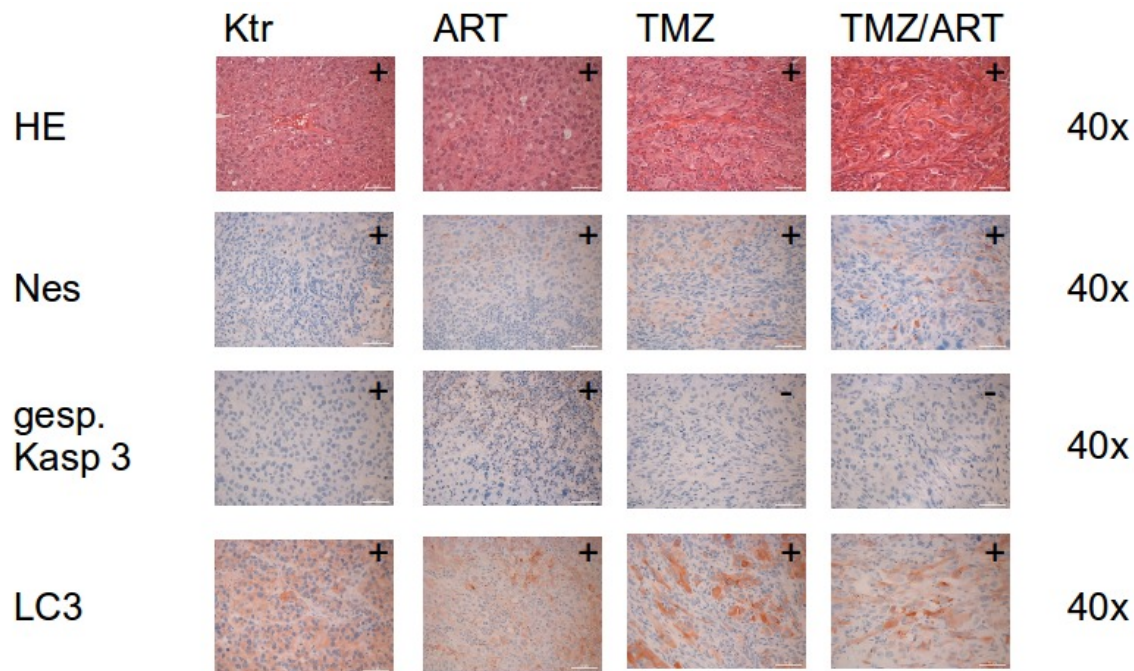


Abbildung 4.52: Histologische Auswertung des *subkutanen in vivo*-Versuchs mit der Zelllinie U87 MG. *Repräsentative Bilder histologischer Tumorschnitte aus dem subkutanen in vivo-Versuch mit der Zelllinie U87 MG mit einer 40-fachen Vergrößerung. Gegenübergestellt sind Schnitte von links nach rechts aus der unbehandelten Kontrollgruppe, der mit ART behandelten Gruppe, der mit TMZ behandelten Gruppe und aus der Kombinationsgruppe mit folgenden Färbungen: Hämatoxylin-Eosin-Färbung (1. Reihe: HE), Nestin-Färbung (2. Reihe: Nes), gespaltene Form der Kaspase 3-Färbung (3. Reihe: gesp. Kasp 3) und LC3-Färbung (4. Reihe: LC3). Schnitte mit positiver Färbung sind mit einem Plus (+) und negative Schnitte mit einem Minus (-) gekennzeichnet.*

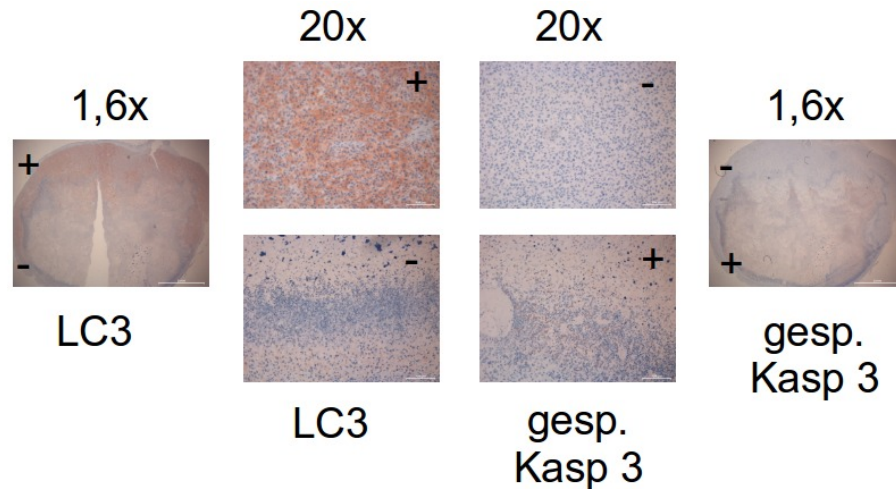


Abbildung 4.53: Histologische Beobachtung in dem *subkutanen in vivo*-Versuch mit der Zelllinie U87 MG. *Repräsentative Bilder histologischer Tumorschnitte aus dem subkutanen in vivo-Versuch mit der Zelllinie U87 MG mit 1,6-facher Vergrößerung für die Übersichtsbilder und mit einer 20-fachen Vergrößerung für die Detailansichten. Gegenübergestellt sind Folgeschnitte von einem Tumorpräparat mit LC3-Färbung (links: LC3) und gespaltene Form der Kaspase 3-Färbung (rechts: gesp. Kasp 3). Schnitte mit positiver Färbung sind mit einem Plus (+) und negative Schnitte mit einem Minus (-) gekennzeichnet. In den Übersichtsbildern (1,6x) sind positive und negative Bereiche des Tumor entsprechend gekennzeichnet.*

Antikörper gegen die gespaltene Form der Kaspase 3 (gesp. Kasp 3).

Zunächst wurden die fertigen Präparate auf eine positive Färbung hin untersucht. Die repräsentativen mikroskopischen Aufnahmen mit einer 40-fachen Vergrößerung sind in Abb. 4.52 dargestellt und bei positiver Färbung mit einem Plus (+) versehen, wenn keine positiven Bereiche zu beobachten waren, ist das Bild mit einem Minus (-) versehen. Die HE-Färbung, die immunhistologische Färbung für Nestin und für LC3 waren in allen drei Behandlungsgruppen und in der unbehandelten Gruppe positiv. Bei der immunhistologischen Färbung für die gespaltene Form der Kaspase 3 waren nur in der unbehandelten Kontrollgruppe und der Gruppe mit ART-Behandlung positive Berei-

che zu beobachten. Nach TMZ-Einzelbehandlung und in der Kombinationsbehandlung konnten keine positiven Bereiche ausgemacht werden.

Weiterhin konnte in den Präparaten mit LC3-Färbung und Kaspase-Färbung eine besondere Gegebenheit beobachtet werden. Die repräsentativen mikroskopischen Aufnahmen mit einer 40-fachen Vergrößerung sind in Abb. 4.53 dargestellt. Hier sind die Bilder mit positiver Färbung ebenfalls mit einem Plus (+) versehen, und wenn keine positiven Bereiche zu beobachten waren, wurden das Bild mit einem Minus (-) versehen. In den 1,6-fach vergrößerten Übersichtsbildern der Tumore (außen) ist besonders deutlich zu erkennen, dass in den Teilen des Tumors, in denen die LC3-Färbung positiv ausfiel, die Kaspase-Färbung negativ ausfiel und umgekehrt. Zur Verdeutlichung wurden weiter Aufnahmen mit 20-facher Vergrößerung aus diesen Bereichen genommen, die hier in der Mitte der Abbildung zusammengestellt sind.

4.3.2 Intrakranielles Tumormodell der Maus

Die *intrakranielle* Untersuchung wurde einmal mit mindestens sieben Tieren pro Gruppe bei Therapiebeginn durchgeführt. Die Zellen wurden direkt in das Gehirn der Mäuse injiziert. Jede Woche wurden einige Tiere im MRT mittels einer dazu eigens entwickelten ‘sterilen Barriere-Box’ auf das beginnende Tumorwachstum hin untersucht. Nachdem die Tumore im Gehirn herangewachsen waren, wurde mit der Behandlung nach einem festgelegten Schema (siehe Kapitel 4.3.2.1) begonnen. Zudem wurde jede Woche das Gewicht der Tiere bestimmt und alle zwei Wochen einige Tiere unter Narkose im MRT mit Hilfe des Kontrastmittels untersucht.

Bei zu hohem Gewichtsverlust oder neurologischen Ausfällen wurden die Tiere terminiert. In den folgenden Abschnitten werden das Behandlungsschema und die Ergebnisse der Untersuchungen dargestellt.

4.3.2.1 Behandlungsschema des *intrakraniellen* Mausmodells

Die *intrakranielle* Injektion der Zelllinie LN-229 erfolgte direkt ins Gehirn der Maus. Zur Überprüfung des Tumorwachstums wurden einzelne Tiere mit Hilfe des MRTs untersucht. Drei Wochen nach Injektion wurde der erste Behandlungszyklus mit der ersten *interperitonealen* TMZ-Gabe und der Gabe von ART mittels Schlundsonde begonnen (Woche 0). Mit Woche 0 wurden TMZ (5 mg/kg Körpergewicht) und ART (100 mg/kg Körpergewicht) fünf Tage pro Woche verabreicht. Die TMZ-Behandlung erfolgte sechs Wochen lang, während die ART-Gabe mittels Schlundsonde oral fünf Tage pro Woche bis einschließlich der neunten Woche erfolgte. Dann wurde die ART-Gabe auf drei mal pro Woche bis zum Versuchsende (52 Wochen nach Zellinjektion) reduziert. Zur Gewichtskontrolle wurden die Tiere jede Woche einmal gewogen. Um das Tumorwachstum zu überwachen, wurden die Tiere in unregelmäßigen Abständen im MRT gescannt. Zur Beobachtung der Vitalität der Tiere wurden diese mindestens fünfmal pro Woche kontrolliert, bei ersten neurologischen Auffälligkeiten zweimal täglich.

4.3.2.2 Untersuchung zum Überleben der Tiere im *intrakraniellen* Mausmodell

Die Überlebenszeit umspannt die Zeit von Beginn der Behandlung bis zum Tod der Tiere. Wenn die Tiere neurologische Ausfälle zeigten oder zu stark in ihrer Lebensqualität eingeschränkt waren, wurden diese terminiert. Ebenso wurde das Gewicht kontrolliert und bei zu starkem Gewichtsverlust wurden die Tiere auch terminiert. Die Gewichtskurven sind unten in Abb. 4.55 dargestellt. In manchen Fällen trat der Tod spontan und unerwartet ein. Die Überlebenszeiten wurden dokumentiert und ausgewertet. In Tabelle 4.2 sind die Überlebenszeiten der einzelnen Tiere und die berechneten Mediane zusammengestellt. Die prozentuale Lebensspanne der Tiere ist in einem Graphen in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen. Die Kurven für die vier Gruppen sind oben in Abb. 4.55 dargestellt.

Die Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe und der nur mit ART behandelten Grup-

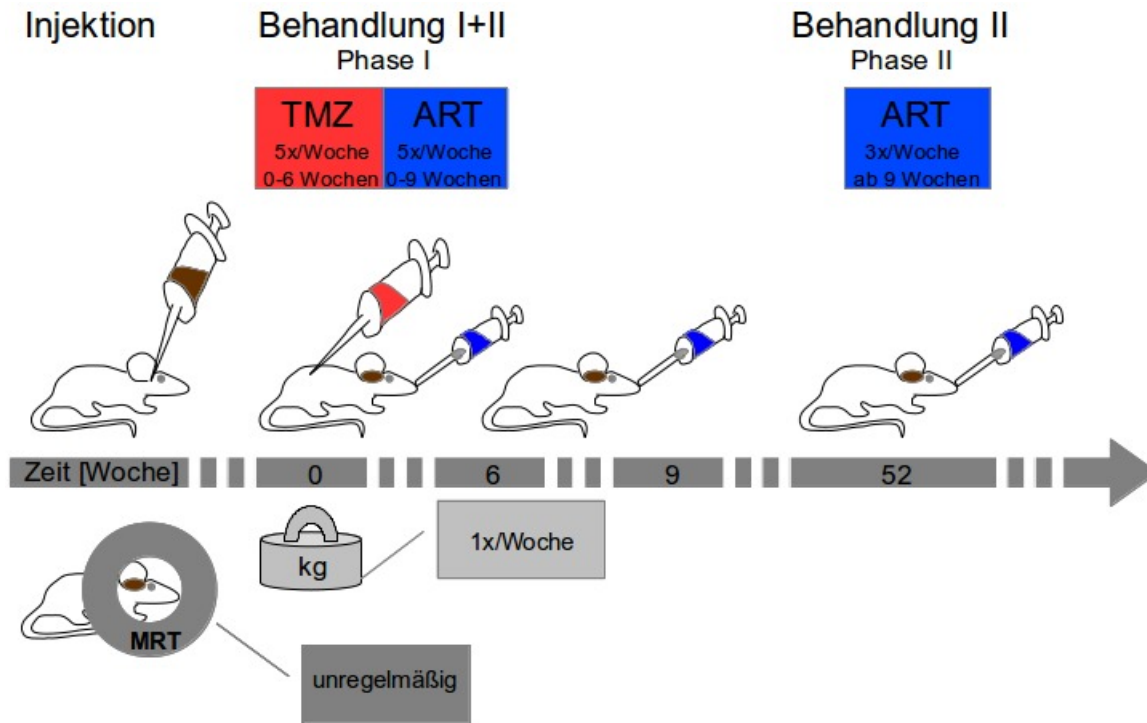


Abbildung 4.54: Behandlungsschema des *intrakraniellen in vivo*-Mausmodells. Die intrakranielle Injektion erfolgte direkt ins Gehirn der Maus. Nach drei Wochen wurde der Versuch mit der ersten interperitonealen TMZ-Gabe begonnen (Woche 0). Mit Woche 0 wurden TMZ und ART fünf Tage pro Woche verabreicht. Die TMZ-Behandlung erfolgte sechs Wochen lang. Die ART-Gabe erfolgte mittels einer Sonde oral fünf Tage pro Woche bis einschließlich der neunten Woche, dann erfolgte die ART-Gabe nur drei mal pro Woche bis zum Versuchsende. Zur Gewichtskontrolle wurden die Tiere jede Woche einmal gewogen. Zur Kontrolle des Tumorwachstums wurden die Tiere in unregelmäßigen Abständen im MRT gescannt.

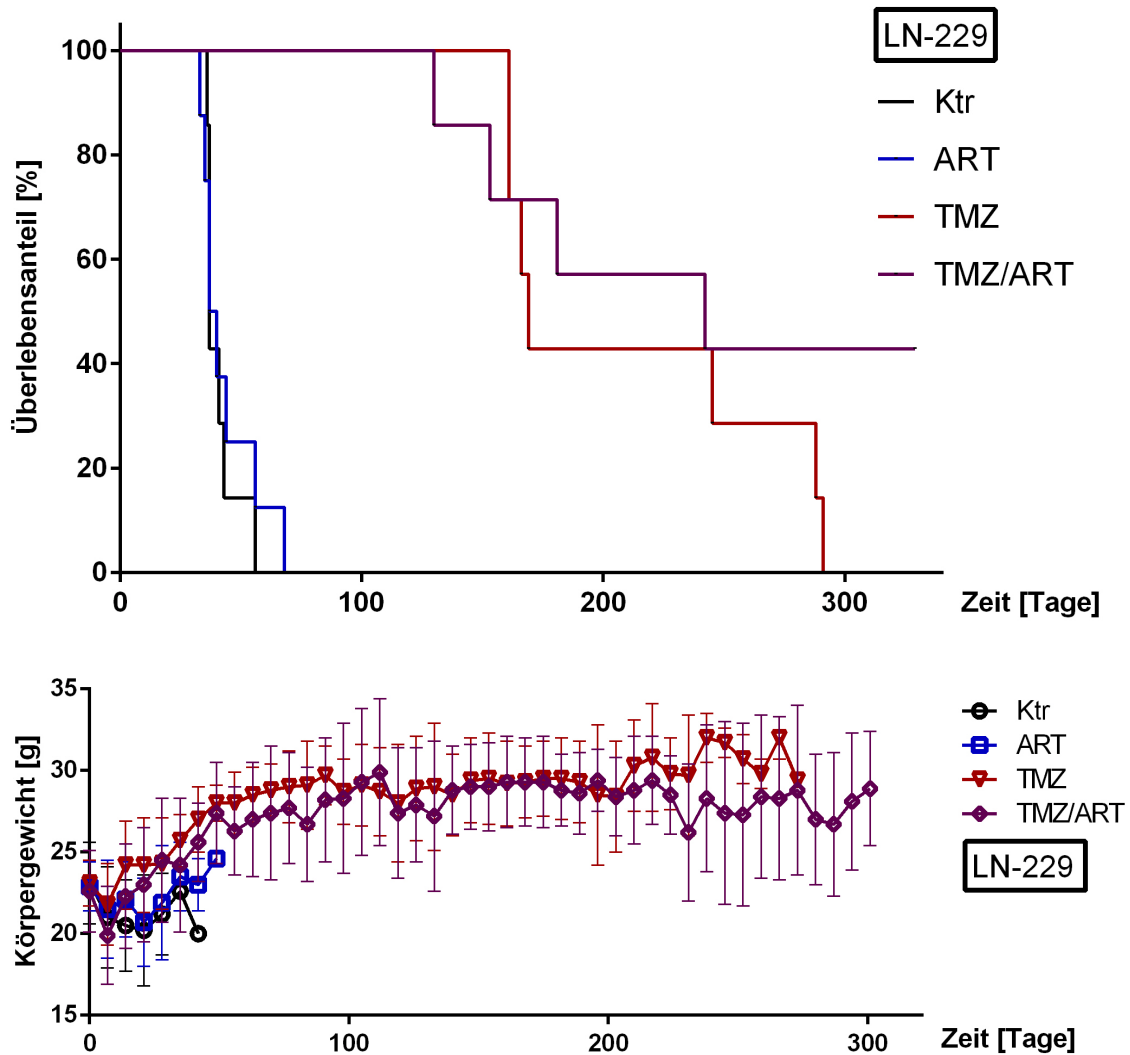


Abbildung 4.55: Auswertung des *intrakraniellen in vivo*-Versuchs mit der Zelllinie LN-229. Auswertung des *intrakraniellen in vivo*-Versuchs mit der Zelllinie LN-229 nach zuvor beschriebenen Versuchsschema. Das Überleben der Tiere ist in einer Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit der Zeit dargestellt (oben). Nach 329 Tagen (Überlebenszeit) ist der Versuch beendet. Drei Tiere aus der Kombinationsgruppe leben noch. Zur Auswertung der Gewichtskontrolle sind die Mittelwerte innerhalb einer Gruppe gegen die Zeit aufgetragen (unten).

	Ktr	ART	TMZ	TMZ/ART
Überleben der einzelnen Tiere in Tagen	37	37	291	329
	37	35	169	181
	37	40	245	130
	43	44	288	329
	56	56	161	242
	41	68	166	153
	36	37	161	329
	–	33	–	–
Median der Überlebenszeiten in Tagen	37	38,5	169	242

Tabelle 4.2: Zusammenstellung der Überlebenszeiten der einzelnen Tiere und der Mediane der Lebensspanne innerhalb der Gruppen.

pe starben innerhalb der ersten zwei bzw. ersten drei Monate von Versuchsbeginn an. Mit TMZ-Behandlung starben die ersten Tiere mit 161 Tagen erst nach fünf Monaten. Die Tiere, die nur mit TMZ behandelt wurden, starben alle innerhalb von zehn Monaten. Über vierzig Prozent der Tiere aus der Gruppe mit Kombinationsbehandlung lebten bis zum Versuchsende (Tag der finalen Termination: 329 Tage nach Versuchsbeginn). Im Vergleich zur Gruppe der mit Temozolomid allein behandelten Tiere war die Lebensdauer der Tiere aus der Kombinationsgruppe über 40% höher.

Das Gewicht der Tiere nahm über die ersten drei Monate des Versuchs zu. Die Tiere wurden mit etwa 22 g operiert. In der ersten Woche nach Operation verloren die meisten Tiere an Gewicht, das sie in den nächsten Wochen kompensierten. Anschließend übertrafen die Tiere sogar ihr Startgewicht. Mit wenigen Schwankungen hielten die Tiere konstant ein Gewicht von etwa 27 g bis zum siebten Monat. Dann veränderte sich das Gewicht der Tiere in den noch überlebenden Gruppen unterschiedlich. Das

Gewicht der Tiere in der TMZ-Gruppe nahm durchschnittlich bis zu 30 g zu, das Gewicht der Tiere in der Kombinationsgruppe reduzierte sich im Durchschnitt um etwa 1-2 g.

4.3.2.3 **Histologische Untersuchung der Gehirne aus dem *intrakraniellen* Mausmodell**

Zur Bestätigung und Kontrolle, dass die gestorbenen und terminierten Tiere an den Folgen des injizierten Hirntumors gestorben sind, wurden die Tiere seziert und nach anderen auffälligen organischen Schäden untersucht. Zudem wurden die Lymphknoten zum Ausschluss einer beteiligten Infektion untersucht. Dann wurde das Gehirn der Tiere freipräpariert und in Paraformaldehyd bis zur anschließenden Einbettung in Parafin fixiert. Aus jeder Gruppe der Tiere wurden zudem Teile des Gehirns in Stickstoffschockgefroren und auch Zellkulturen angelegt, um spätere Untersuchungen zu ermöglichen.

Für die histologischen Untersuchungen wurden wie im *subkutanen* Mausversuch (siehe Abschnitt 4.3.1.3) die Parafinschnitte der Gehirne gefärbt. Als morphologische Übersichtsfärbung wurden einzelne Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung versehen. Um die humanen Glioblastomzellen von dem Gewebe der Maus zu unterscheiden, wurden einzelne Schnitte mit dem humanen neuronalen Marker Nestin markiert. Zur näheren Untersuchung der Wirkung von den Behandlungen auf die Glioblastomzellen wurden auch hier einzelne Schnitte mit dem LC3-Antikörper markiert und andere mit dem Antikörper der gespaltenen Form der Kaspase 3. Für jede Behandlungsgruppe und für jede Färbung wurden repräsentative Bilder zusammengestellt, die in Abb. 4.56 gezeigt sind.

Zunächst wurden auch hier die fertigen Präparate auf eine positive Färbung hin untersucht. Bei positiver Färbung wurden die Bilder mit einem Plus (+) versehen, wenn keine positiven Bereiche zu beobachten war, wurde das Bild mit einem Minus (-) gekennzeichnet. Hier wurden in allen untersuchten Präparaten und Färbungen positive Stellen im Gehirn gefunden. Die Schnittebenen und Bereiche des Gehirns zu einer po-

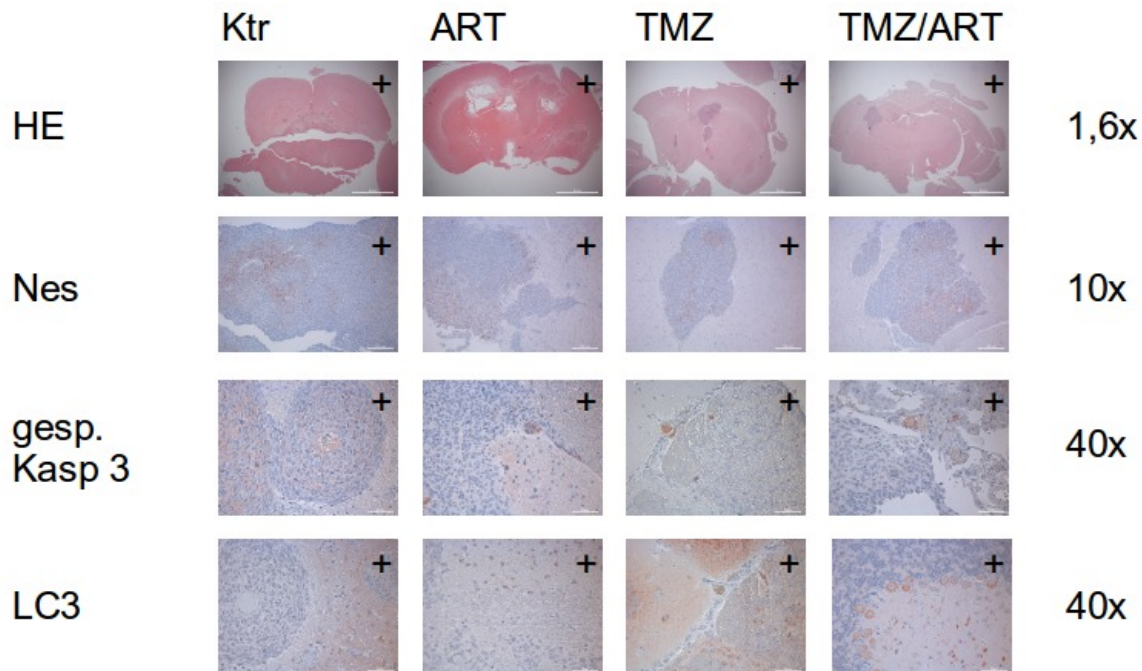


Abbildung 4.56: Histologische Auswertung des intrakraniellen *in vivo*-Versuchs mit der Zelllinie LN-229. Repräsentative Bilder histologischer Gehirnschnitte des intrakraniellen *in vivo*-Versuchs mit der Zelllinie LN-229. Gegenübergestellt sind Schnitte von links nach rechts aus der unbehandelten Kontrollgruppe, der mit ART behandelten Gruppe, der mit TMZ behandelten Gruppe und aus der Kombinationsgruppe mit folgenden Färbungen: Hämatoxylin-Eosin-Färbung als Übersichtsbild mit einer 1,6-fachen Vergrößerung (1. Reihe), Nestin-Färbung in 10-facher Vergrößerung (2. Reihe), gespaltene Form der Kaspase 3-Färbung (3. Reihe) und LC3-Färbung (4. Reihe) als Detailbilder in 40-facher Vergrößerung. Schnitte mit positiver Färbung sind mit einem Plus (+) gekennzeichnet.

sitiven Färbung variieren in den Präparaten sehr stark. So konnten Glioblastomzellen sowohl direkt am Injektionskanal als auch weit in den peripheren Bereichen des Gehirns lokalisiert werden. Zudem variierte die Akkumulationsintensität der Glioblastomzellen ebenfalls sehr stark. So konnten Tumore ausgemacht werden, die nur wenige Zellen an verschiedenen Stellen des Gehirns beinhalteten, oder auch solche, die fast die Hälfte des Gehirns ausmachten. Dieses ist deutlich in der 1,6-fachen Vergrößerung der HE-Färbung der Kontrollgruppe zu erkennen, bei denen der gesamte untere Bereich (dunkel gefärbt) von Glioblastomzellen eingenommen wird. Mit einer 20-fachen Vergrößerung ist besonders gut zu erkennen, dass, obwohl alle Tumore positive Bereiche der Nestin-Färbung aufzeigen (braune Färbung), diese sehr unhomogen im Tumorgewebe (meist dunkelblau) verteilt sind. In den mit LC3-Antikörper markierten Präparaten und in den mit Kaspase 3-Antikörpern markierten Präparaten ließen sich unter 40-facher Vergrößerung immer Bereiche mit positiv gefärbten Glioblastomzellen finden. Die Lokalisation und die Intensität der Färbungen wiesen keine weiteren Besonderheiten unter den Behandlungsgruppen oder den einzelnen Präparaten auf.

4.3.2.4 Gegenüberstellung der histologischen Untersuchung und der MRT-Untersuchungen aus dem *intrakraniellen* Mausmodell

Zur Validierung der MRT-Untersuchungen wurden die Bilder mit den entsprechenden histologischen Präparaten verglichen. Für die MRT-Untersuchungen wurde den Mäusen vorab ein Kontrastmittel verabreicht, das durch Aufhebung der Blut-Hirn-Schranke, z.B. durch einen invasiven Tumor, sich im gesamten Gehirn verteilen kann. Da die Tumorzellen aber einen gesteigerten Stoffwechsel haben, sammelt sich das Kontrastmittel besonders in diesen Bereichen an. Ist das MRT-Bild T1 gewichtet, erscheint das Kontrastmittel heller als das umliegende Gewebe. Wenn das MRT-Bild T2 gewichtet ist, erscheint der Tumor dunkler als das umliegende Gewebe. Für jede Behandlungsgruppe der Tiere wurden im Folgenden repräsentative Bilder zusammengestellt (siehe Abb 4.57 bis 4.60).

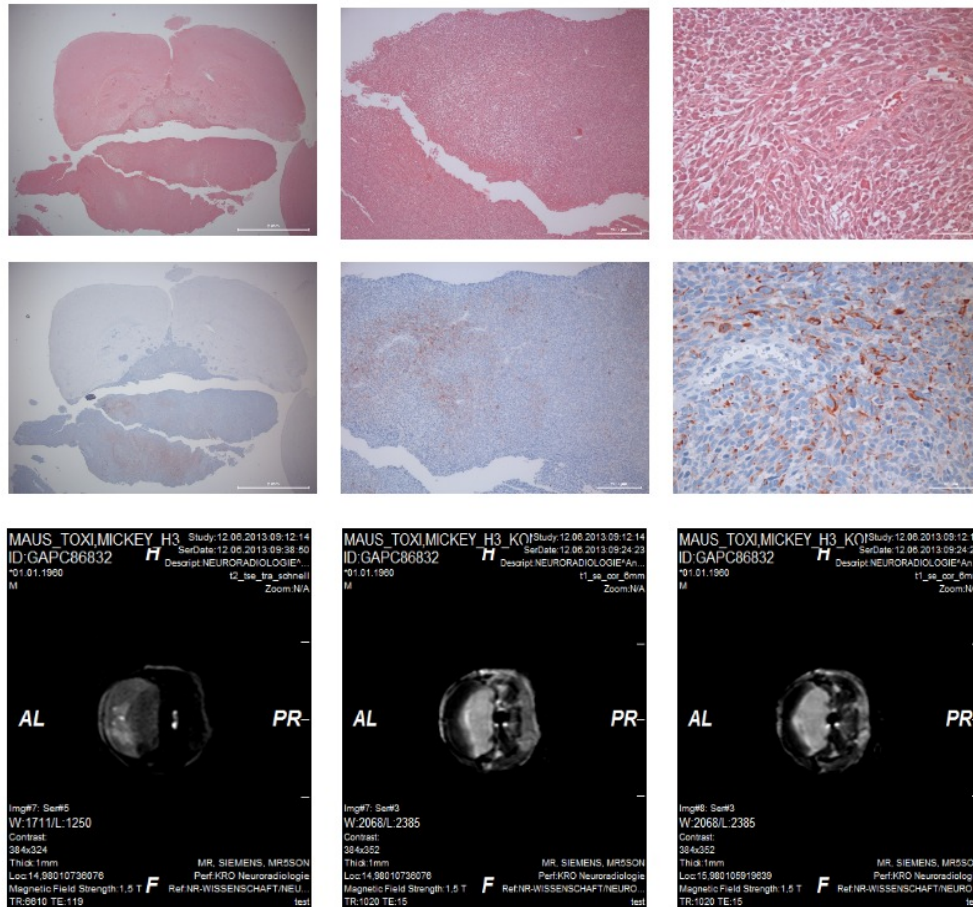


Abbildung 4.57: Gegenüberstellung der histologischen Schnitte des *intra-*
kraniellen in vivo-Versuchs mit der Zelllinie LN-229 und der MRT-Bilder
 einer Kontrolle. Repräsentative Bilder histologischer Gehirnschnitte des *intra-*
kraniellen in vivo-Versuchs mit der Zelllinie LN-229. Gegenübergestellt sind Schnitte aus
 der unbehandelten Kontrollgruppe mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung (obere Reihe) und
 Nestin-Färbung (mittlere Reihe) als Übersichtsbilder mit einer 1,6-fachen Vergrößerung
 (links), in 10-facher Vergrößerung (Mitte) und als Detailbilder in 40-facher Vergröße-
 rung (rechts). Entsprechende MRT-Bilder sind in der unteren Reihe aufgeführt. Das
 linke Bild ist T2 gewichtet, der Tumor erscheint dunkler als umliegendes Gewebe. Die
 anderen beiden Bilder sind T1 gewichtet, sodass der Tumor mit Kontrastmittel ange-
 reichert heller erscheint.

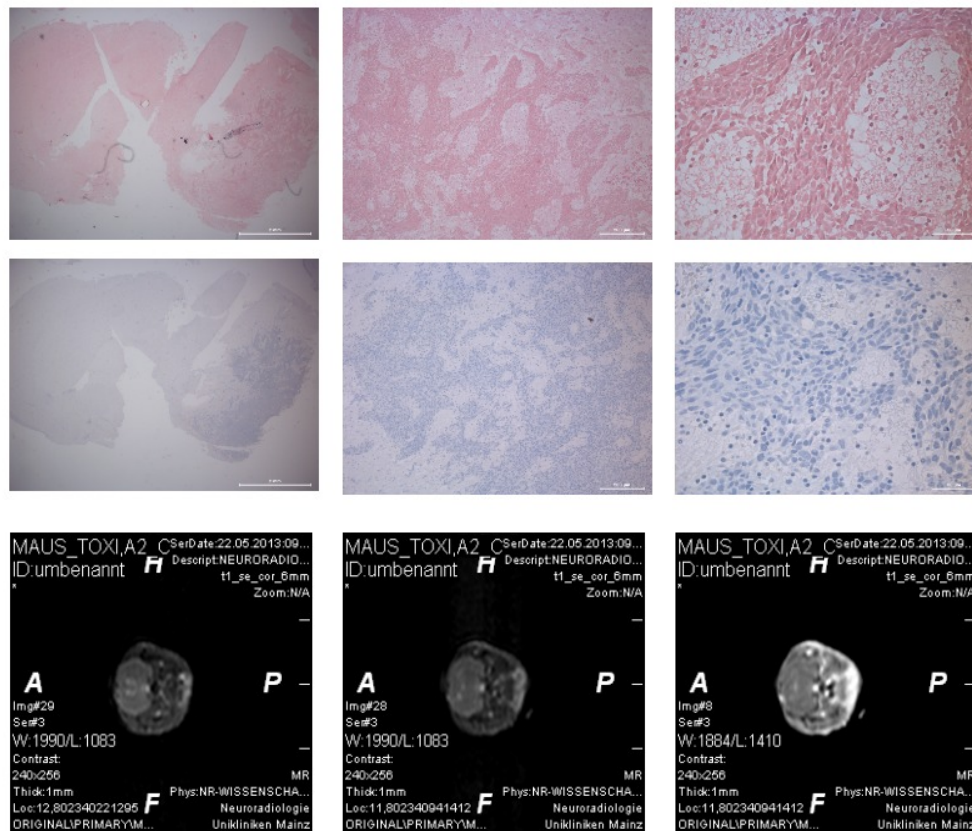


Abbildung 4.58: Gegenüberstellung der histologischen Schnitte des *intra-*kraniellen *in vivo*-Versuchs mit der Zelllinie LN-229 und der MRT-Bilder einer mit ART behandelten Maus. Repräsentative Bilder histologischer Gehirnschnitte des intrakraniellen *in vivo*-Versuchs mit der Zelllinie LN-229. Gegenübergestellt sind Schnitte aus der mit ART behandelten Gruppe mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung (obere Reihe) und Nestin-Färbung (mittlere Reihe) als Übersichtsbilder mit einer 1,6-fachen Vergrößerung (links), in 10-facher Vergrößerung (Mitte) und als Detailbilder in 40-facher Vergrößerung (rechts). Entsprechende MRT-Bilder sind in der unteren Reihe aufgeführt. Die MRT-Bilder sind T1 gewichtet, sodass der Tumor mit Kontrastmittel angereichert heller erscheint.

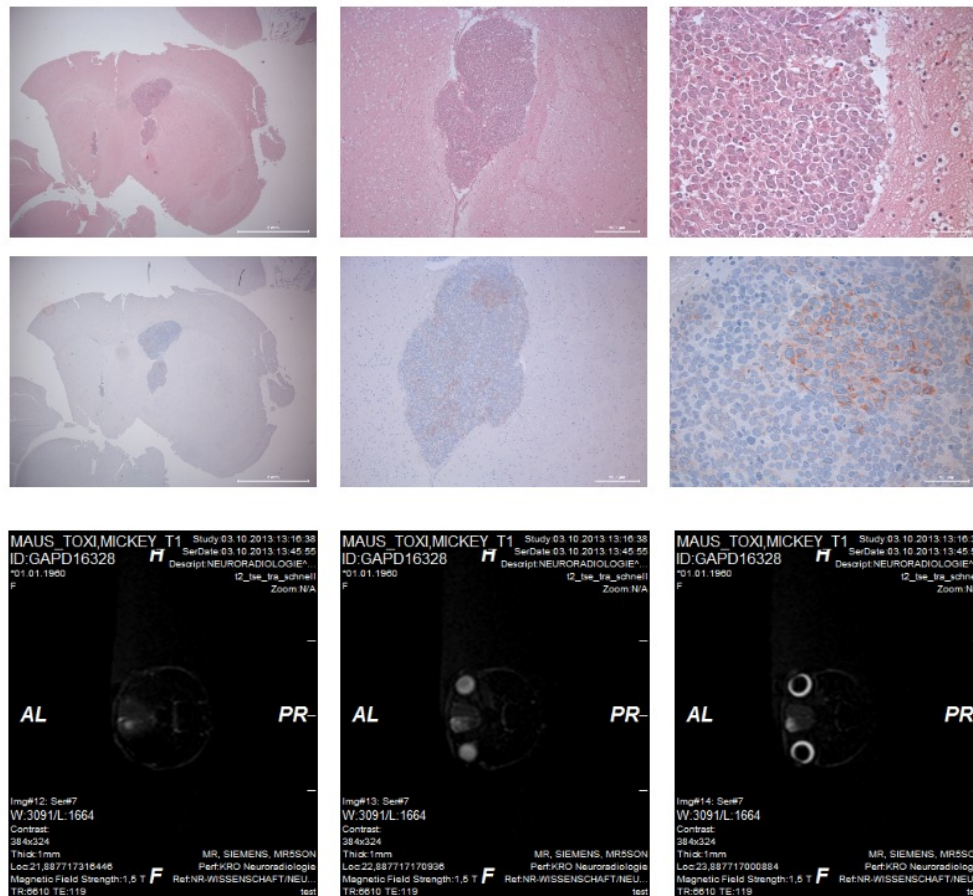


Abbildung 4.59: Gegenüberstellung der histologischen Schnitte des *intrakraniellen in vivo*-Versuchs mit der Zelllinie LN-229 und der MRT-Bilder einer mit TMZ behandelten Maus. *Repräsentative Bilder histologischer Gehirnschnitte des intrakraniellen in vivo*-Versuchs mit der Zelllinie LN-229. Gegenübergestellt sind Schnitte aus der mit TMZ behandelten Gruppe mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung (obere Reihe) und Nestin-Färbung (mittlere Reihe) als Übersichtsbilder mit einer 1,6-fachen Vergrößerung (links), in 10-facher Vergrößerung (Mitte) und als Detailbilder in 40-facher Vergrößerung (rechts). Entsprechende MRT-Bilder sind in der unteren Reihe aufgeführt. Die MRT-Bilder sind T2 gewichtet, der Tumor erscheint dunkler und Flüssigkeiten heller als das umliegende Gewebe.

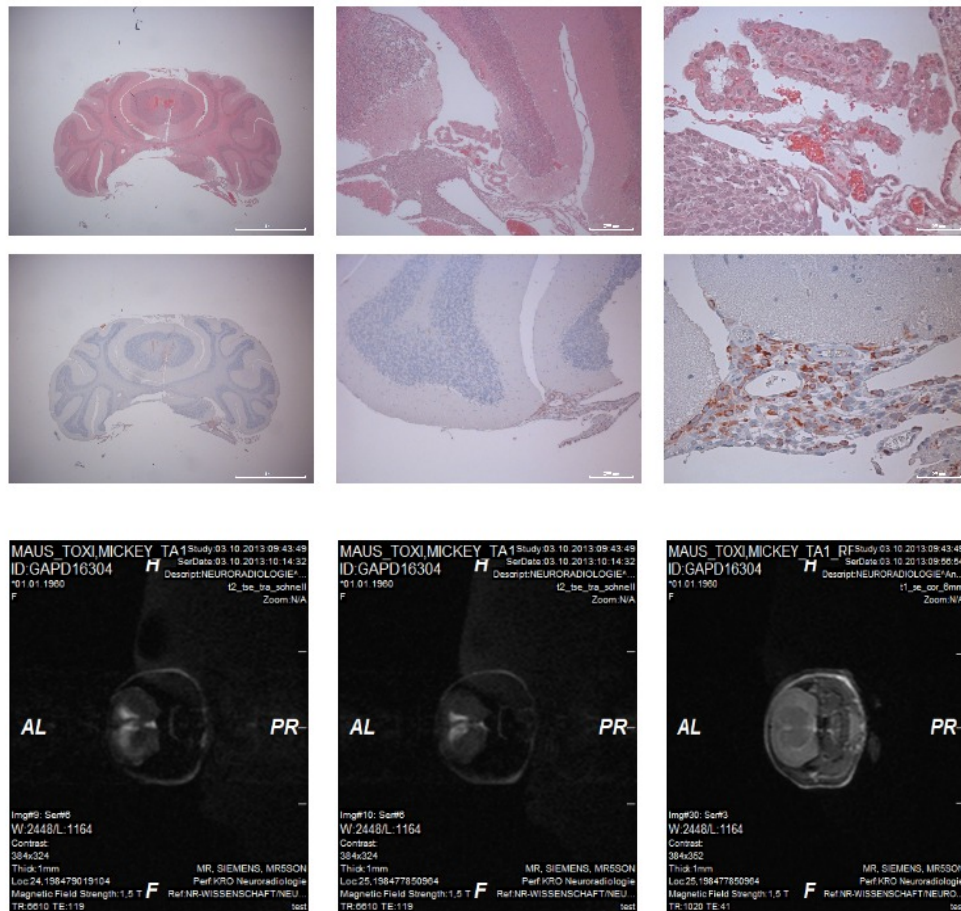


Abbildung 4.60: Gegenüberstellung der histologischen Schnitte des *intra-*
kraniellen in vivo-Versuchs mit der Zelllinie LN-229 und der MRT-Bilder einer Maus aus der Kombinationsgruppe. *Repräsentative Bilder histologischer Gehirnschnitte des intrakraniellen in vivo*-Versuchs mit der Zelllinie LN-229. Gegenübergestellt sind Schnitte aus der Gruppe mit Kombinationsbehandlung mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung (obere Reihe) und Nestin-Färbung (mittlere Reihe) als Übersichtsbilder mit einer 1,6-fachen Vergrößerung (1. Spalte), in 10-facher Vergrößerung (2. Spalte) und als Detailbilder in 40-facher Vergrößerung (3. Spalte). Entsprechende MRT-Bilder sind in der unteren Reihe aufgeführt. Die ersten beiden Bilder sind T2 gewichtet, sodass der Tumor mit Kontrastmittel angereichert dunkler erscheint als umliegendes Gewebe und Flüssigkeiten heller. Das dritte Bild ist T1 gewichtet, der Tumor erscheint heller als umliegendes Gewebe.

In der ersten Reihe sind die Übersichtsbilder mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung dargestellt und in der zweiten Reihe die Bilder der Nestin-Färbung jeweils mit einer 1,6-fachen Vergrößerung (1. Spalte), in 10-facher Vergrößerung (2. Spalte) und als Detailbilder in 40-facher Vergrößerung (3. Spalte). Die entsprechenden MRT-Bilder sind in der unteren Reihe aufgeführt.

Die repräsentativen Bilder für die Mäuse aus der Kontrollgruppe sind in Abb. 4.57 zusammengestellt. Die histologischen Bilder zeigen deutlich die enormen Ausmaße des Tumors (dunkel gefärbt) im Gehir der Maus. Der Tumor umfasst die gesamte untere Hälfte des Gehirns, der sich während der Präparation nur schwer aus dem Schädel auslösen ließ und sich vom oberen Bereich des Gehirns ablöste. Das erste Bild der MRT-Untersuchung (links) ist T2 gewichtet, der Tumor erscheint dunkler als umliegendes Gewebe. Die anderen beiden Bilder sind T1 gewichtet, sodass der Tumor mit Kontrastmittel angereichert heller erscheint. Die MRT-Bilder zeigen die gleichen Ausmaße und Lokalisation des Tumors wie die Bilder der histologischen Untersuchung.

Die repräsentativen Bilder für die Mäuse aus der mit ART behandelten Gruppe sind in Abb. 4.58 zusammengestellt. Die histologischen Bilder zeigen auf der rechten Seite des Gehirns das Tumorgewebe (dunkel gefärbt). Mit steigender Vergrößerung wird das inhomogene Gewebe deutlich, das immer wieder von Zellen des normalen Gewebes unterbrochen wird. Die Bilder der MRT-Untersuchung sind hier alle T1 gewichtet, sodass der Tumor mit Kontrastmittel angereichert heller erscheint. Die ersten beiden MRT-Bilder zeigen nur schwach eine Aufhellung im rechten äußeren Bereich des Gehirns (hier unterer Rand des Gehirns im MRT-Bild). Gehen die Scans weiter in den hinteren Bereich des Gehirns, ist keine Aufhellung in diesem Bereich zu erkennen. Auch hier lassen sich die MRT-Bilder durch die histologischen Bilder bestätigen.

Die repräsentativen Bilder für die Mäuse aus der mit TMZ behandelten Gruppe sind in Abb. 4.59 zusammengestellt. Die histologischen Bilder zeigen auf der rechten oberen Seite des Gehirns das Tumorgewebe (dunkel gefärbt), das sich nach unten kleiner fortsetzt. Mit steigender Vergrößerung wurde die recht einheitliche und klar abzugren-

zende Struktur des Gewebes deutlich. Die hier dargestellten MRT-Bilder sind alle T2 gewichtet, sodass der Tumor dunkler erscheint und Ansammlungen von Flüssigkeiten heller. Die MRT-Bilder der Maus zeigten weit im vorderen Bereich des Gehirns eine Aufhellung, Flüssigkeiten sammelten sich in diesem Bereich an, je weiter nach vorne die Messungen verlagert wurden, desto intensiver wurde die Aufhellung. Ansammlungen von Flüssigkeiten konnten besonders bei Tieren nach TMZ-Behandlungen beobachtet werden. Oft waren die Ventrikel stark vergrößert, auf den histologischen Bildern konnte die Beobachtung bestätigt werden. Häufig waren in den histologischen Bildern die Tumore gerade in diesen Bereichen zu finden. Auch in diesen Schnitten war der Tumor genau in diesem Bereich lokalisiert. Da die MRT-Untersuchungen zeitlich nur sehr begrenzt möglich waren, kam es vor, dass die histologischen Bilder nach Terminierung der Tiere zeitlich sehr weit von den denen der MRT-Untersuchungen lagen. In dieser Zeitspanne konnten die räumlichen Veränderungen des Tumors beachtlich sein. Zeitlich nähere MRT-Bilder zu dieser histologischen Untersuchung bestehen hier nicht. Die T1 gewichteten Bilder konnten zu diesem Zeitpunkt noch keine Kontrastmittelanreicherung zeigen.

Die repräsentativen Bilder für die Mäuse aus der mit der Kombination von ART und TMZ behandelten Gruppe sind in Abb. 4.60 zusammengestellt. Die histologischen Bilder zeigten nur ein sehr kleines und schwach ausgeprägtes Tumorgewebe im hinteren Bereich des Gehirns mittig und weit im unteren Bereich (braun in der Nestin-Färbung). Die beiden ersten dargestellten MRT-Bilder sind T2 gewichtet, sodass das Tumorgewebe dunkler erscheint als das umliegende Gewebe. Eine besonders dunkle Stelle war hier nicht zu erkennen. Dafür sind deutlich die erweiterten und hellerleuchteten Ventrikel zu erkennen, die in den histologischen Präparaten ebenfalls zu erkennen sind. Das dritte MRT-Bild ist T1 gewichtet und das Tumorgewebe ist durch das angereicherte Kontrastmittel heller hervorgehoben. Hier ist eine leichte Aufhellung im unteren Bereich des Gehirns zu erkennen, das die histologischen Untersuchungen bestätigt.

Kapitel 5

Diskussion

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse dieser Studie diskutiert und im Kontext der Erkenntnisse bestehender Veröffentlichungen interpretiert. Nach einer kurzen Einführung wird zunächst auf die induzierte ROS-Bildung von Artesunat eingegangen und den resultierenden Zelltod. Anschließend wird der Einfluss von Artesunat auf die durch die klassischen Therapieformen induzierte Toxizität diskutiert und mit Resultaten anderer Studien aus der Literatur verglichen. Die Wirkung von Artesunat auf die induzierten Zelltod- und Überlebensmechanismen bei Glioblastomzelllinien, wie sie von den klassischen Therapieformen bekannt sind, wird unter Berücksichtigung bestehender Literatur erörtert. Die möglichen Hypothesen, die sich aus den durchgeführten Analysen und den aus der Literatur bekannten Ergebnissen ergeben, werden anschließend schematisch zusammengefasst und dann nacheinander in den verschiedenen Abschnitten diskutiert.

5.1 Überblick über den Stand der Forschung

Die Glioblastome sind zum einen die aggressivste Form von Hirntumoren (Grad WHO-IV) und stellen zum anderen die häufigste Form von Hirntumoren bei erwachsenen Men-

5.2. Einflussnahme von Artesunat auf die klassische Chemotherapie mit Temozolomid und Bestrahlung

schen dar (siehe Kapitel 1.1). Die Zahlen der Neuerkrankungen sind weiter steigend¹. Die palliative Kombinationstherapie bestehend aus Tumorresektion, Bestrahlung und Chemotherapie führt zu einer mittleren Überlebenszeit von nur etwa 15 Monaten nach Erstellung der Diagnose [Stupp u. a. (2005)]. Ein entscheidendes Problem der Tumortherapien ist die Entwicklung von Resistenzmechanismen, die die Effektivität dieser Therapien in den Glioblastomzellen vermindern. Daher ist die Steigerung der Effektivität der bestehenden Therapieformen ein wichtiger Ansatz zur zukünftigen Behandlung von Glioblastomen.

Im Jahr 2001 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Prof. Efferth, dass Artesunat, ein unentbehrlicher Anti-Malaria-Wirkstoff, Krebszellen daran hindern kann, sich weiter zu vermehren [Efferth u. a. (2001)]. Zehn Jahre später wurde gezeigt, dass Artesunat aufgrund entstehender freier Sauerstoffradikale zum einen den intrinsischen Apoptoseweg induzieren und zum anderen oxidative Schäden an der DNA einer humanen Glioblastomzelllinie verursachen kann [Berdelle u. a. (2011)].

In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Artesunat auf die klassischen Therapieformen von Glioblastomen analysiert. Für diese Studien wurden *in vitro*- und *in vivo*-Experimente mit verschiedenen Glioblastomzelllinien durchgeführt.

5.2 Einflussnahme von Artesunat auf die klassische Chemotherapie mit Temozolomid und Bestrahlung

In den *in vitro*-Toxizitätsanalysen zeigten die Zelllinien verschiedene Zelltodcharakteristika gegenüber den einzelnen Behandlungen, die Anteile an Apoptose und Nekrose waren in den Zelllinien sehr unterschiedlich. In der Kombinationsbehandlung mit Artesunat zeigten aber alle drei Zelllinien unabhängig von der Art des Zelltods eine

¹www.krebshilfe.de

gesteigerte Toxizität gegenüber den Einzelbehandlungen. So wiesen die Hauptzelllinie LN-229 und die Zelllinie A172 eine mehr als additive Toxizität auf, ein Hinweis auf einen bestehenden Synergismus in der Wirkungsweise von ART und TMZ. In der Kombination ART und Bestrahlung zeigte die Zelllinie LN-229 ebenfalls eine mehr als additive Zunahme des Zelltods.

Ein wichtiger Bestandteil dieser Studien war die Entdeckung der Zellzahlabhängigkeit bei ART-Behandlungen und folglich die Beachtung der korrekten Zellzahlen bei der Aussaat. Desweiteren waren die niedrigen Konzentrationen der Wirkstoffe der einzelnen Behandlungen relevant. Zusammengenommen ermöglichte dies die Etablierung des korrekten Behandlungsschemas. Die simultane Behandlung mit Artesunat zeigte gänzlich andere Ergebnisse als die hier effektive zeitversetzte Kombinationsbehandlung, bei der Artesunat 72 Stunden nach der TMZ-Behandlung oder Bestrahlung gegeben wurde. Bei einer Vorbehandlung mit Artesunat kam es bei der Zelllinie LN-229 nicht zu einer Sensitivierung gegenüber der TMZ-Behandlung, sondern das Artesunat wirkte hier sogar eher protektiv.

In den *in vivo*-Analysen zeigten die Tiere der Gruppe mit Kombinationsbehandlung größere Therapieerfolge im Vergleich zu den Einzelbehandlungen. Bei der Zelllinie U87 MG konnte in den *in vivo*-Experimenten mit der Tumorinduktion unter der Haut eine deutliche Tumorreduktion nach Kombinationsbehandlung gemessen werden. Leider war die Zeitspanne der Versuche mit nur zwei Wochen sehr kurz, weil die meisten Tiere wegen zu großem Gewichtsverlust terminiert werden mussten. Da die Tiere das ART über das Trinkwasser bekamen, führte dieses (möglicherweise aufgrund des bitteren Geschmacks) bei den Tieren zur reduzierten Wasseraufnahme und schließlich auch zur reduzierten Nahrungsaufnahme, womit sich der große Gewichtsverlust der Tiere erklären lässt.

Im Überlebensversuch mit der Zelllinie LN-229, in der die Zellen direkt ins Gehirn injiziert wurden, konnte eine gesteigerte Lebensspanne der Tiere mit Kombinationsbehandlung im Vergleich zu den Einzelbehandlungen beobachtet werden. Zudem wurde

5.3. Wirkungsmechanismen von Artesunat alleine und in den Kombinationstherapien mit Temozolomid und Bestrahlung

durch die Umstellung des ART-Lösungspuffers die Applikation von ART in definierten Volumina über eine Schlundsonde ermöglicht. Nur durch die Entwicklung des neuen Lösungspuffers konnte die erforderliche Menge ART in den sehr geringen Volumina, die über die Schlundsonde verabreicht werden können, gelöst werden. Dadurch wurde die Wasser- und Nahrungsaufnahme nicht so stark beeinträchtigt und das Gewicht der Tiere blieb über mehrere Monate stabil. Zudem konnte die Menge ART genau kontrolliert auf das aktuelle Gewicht jedes einzelnen Tieres angepasst gegeben werden.

Beide Tierversuche zeigten, zum einem durch eine deutliche Tumorregression und zum anderen durch die gesteigerte Überlebenzeit der Tiere, dass die Kombinationsbehandlung mit Artesunat zu einer Sensitivierung gegenüber der Chemotherapie mit Temozolomid führte und somit die Effektivität der Tumorthherapie steigerte.

Die *in vitro*- und *in vivo*-Daten dieser Studie offenbarten Artesunat als einen potentiellen Wirkstoff zur Verbesserung der klassischen Tumorthherapie bei Glioblastompatienten.

5.3 Wirkungsmechanismen von Artesunat alleine und in den Kombinationstherapien mit Temozolomid und Bestrahlung

Die Zelltodanalysen zeigten nicht nur eine mehr als additive Induktion des Zelltods in der Kombinationsbehandlung, sondern diese war zudem unabhängig von den untersuchten Zelltodmechanismen Apoptose und Nekrose. Diese Unabhängigkeit in der Art des Zelltods lässt die Schlussfolgerung zu, dass mindestens ein weiterer Mechanismus vor der Induktion des Zelltods involviert ist. Damit stellte sich die Frage, welche Mechanismen zu dieser erhöhten Sensitivität der Zelllinien gegenüber der zeitversetzten Kombinationsbehandlung führen und die Induktion verschiedener Mechanismen des Zelltods zulassen. In den folgenden Kapiteln werden verschiedene Hypothesen disku-

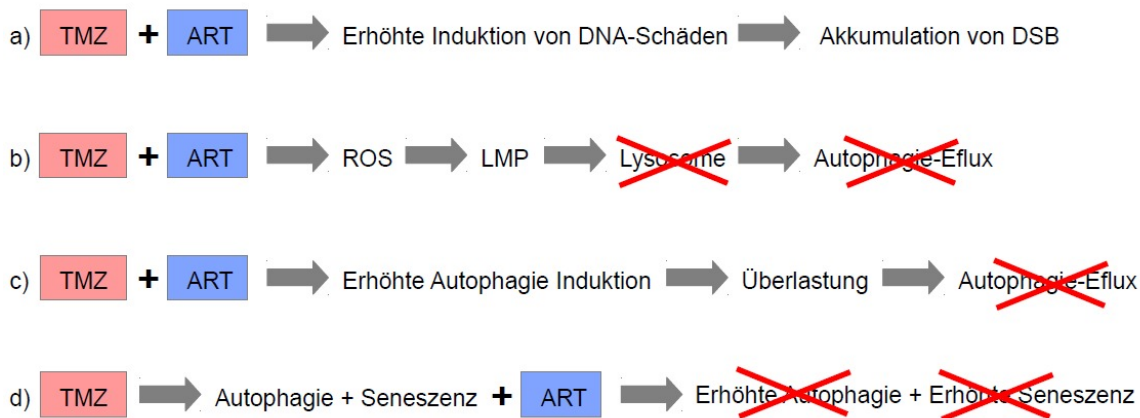


Abbildung 5.1: Hypothesen zu den Wirkungsmechanismen in der Kombinationsbehandlung. Zusammenfassung der Hypothesen zu den Wirkungsmechanismen in der Kombinationsbehandlung, die in dieser Arbeit aufgestellt und bearbeitet wurden. Die Kombinationsbehandlung führt zur erhöhten Induktion des DNA-Schadens und somit zur Akkumulation von DSB (a) oder die starke ROS-Produktion führt zur LMP und somit zur Schädigung der Lysosomen und zur Hemmung des Autophagie-Efflux (b). Die erhöhte (zusätzliche) Autophagie-Induktion führt zur Überlastung der Autophagie und hemmt den Autophagie-Efflux (c) oder die durch TMZ induzierten Überlebensmechanismen Autophagie und Seneszenz werden durch die Zugabe von ART inhibiert (d).

tiert, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, und deren Ergebnisse rekapituliert. Zunächst wird auf den Wirkungsmechanismus von ART selbst eingegangen und die Fragestellungen zur Induktion der Nekrose diskutiert. Anschließend werden die Ergebnisse zur Autophagie, dem Einfluss der Behandlung auf den Zellzyklus und der Seneszenz erörtert. Diese Mechanismen, die zum Überleben der Zellen induziert werden, sind entscheidende Faktoren in der Ausbildung von Resistenzen gegenüber der Tumorthherapie (siehe Kapitel 1.5). Eine kurze schematische Zusammenfassung der aufgestellten Hypothesen, die im Zusammenhang mit der Wirkung von ART auf die Überlebensmechanismen stehen, sind in Abb. 5.1 dargestellt.

5.3.1 Beteiligung des Nekrosoms auf den Wirkungsmechanismus von ART

Früheren Studien zur Folge kann die hohe ROS Induktion direkt zur Induktion von Nekrose, oder auch durch die Aktivität des Nekrosoms erst zur Verstärkung der ROS-Bildung und dann anschließend zum nekrotischen Zelltod führen [Vandenabeele u. a. (2010)]. Da in der Hauptzelllinie LN-229 überwiegend Nekrose induziert wurde, wurden hier zuvor weitere Untersuchungen zur ROS-Bildung und der Beteiligung des Nekrosoms nach ART-Behandlung durchgeführt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten weder einen signifikanten Hinweis auf Beteiligung des Nekrosoms zur ROS-Bildung noch zum induzierten Zelltod nach ART bei den hier gewählten niedrigen Dosen von ART. Signifikante Unterschiede konnten hier nur nach ART-Behandlung bei höheren Dosen gemessen werden. Die Induktion der ROS-Bildung und des Zelltods durch ART zeigten hier keine Abhängigkeit vom Nekrosom. Diese Ergebnisse wurden im weiteren Verlauf der Untersuchungen bestätigt, da es auch nach Inhibition des Nekrosoms in der Kombinationsbehandlung weder zu einer signifikanten Verschiebung in Richtung der Apoptose noch zu einer Veränderung des gesamten Zelltods kam. Der signifikante Unterschied im basalen ROS-Level der einzelnen Zelllinien und die Unterschiede in der Art des induzierten Zelltods konnten somit auch vom genetischen Hintergrund der Zellen herrühren.

Schon im Jahr 2003 konnte gezeigt werden, dass durch Energieverlust der Glioblastomzellen (Zelllinien LN-229 und U87 MG) es bevorzugt zum nekrotischen Zelltod kommt [Steinbach u. a. (2003)]. Der Energieverlust in Form einer ATP-Depletion konnte im Mainzer Institut für Toxikologie in verschiedenen Studien auch nach Behandlung von ART und TMZ nachgewiesen werden [Eich (2011); Berdelle u. a. (2011)]. Eine weitere Möglichkeit ist die Inhibition des Apoptosewegs, zum Beispiel durch die geringe Menge an Kaspase-8 [Han u. a. (2011)], was durchaus für die Zelllinie LN-229 in Frage käme [Heylmann (2011)].

5.3.2 Auswirkungen der induzierten DNA-Schäden durch die Behandlung von ART und TMZ auf die Toxizität der Kombinationsbehandlung

Sowohl TMZ als auch ART induzieren ROS [Yin u. a. (2014); Yang u. a. (2014)] und DNA-Schäden [Kanzawa u. a. (2004); Roos u. a. (2007); Knizhnik u. a. (2013); Li u. a. (2008); Berdelle u. a. (2011)] in den behandelten Zellen, was zu enormen Zellstress führt und den Zelltod induzieren kann. Die Ergebnisse der gängigen Literatur zur Behandlung von Krebszellen mit TMZ und Artesunat führten zu der Hypothese, dass Artesunat zu den durch die Chemotherapie-induzierten DNA-Schäden weitere hinzufügt und die akkumulierenden DNA-Schäden zur gesteigerten Toxizität führen. Daher wurden parallel zu den Toxizitätsanalysen die induzierten DNA-Schäden untersucht. In den hier durchgeführten Studien konnten trotz deutlich niedriger Dosen ebenfalls die induzierten DNA-Schäden durch die Einzelbehandlungen mit Artesunat und Temozolomid bestätigt werden. Allerdings konnte kein Hinweis auf die Bestätigung der Hypothese akkumulierender DNA-Schäden durch die Kombinationsbehandlung von ART und TMZ gefunden werden. Es wurden keine zusätzlichen DNA-Schäden nach Kombinationsbehandlung beobachtet, die die erhöhte Toxizität begründen können.

Natürlich könnten auch hier höhere Dosen zu anderen Ergebnissen führen, aber es ist zu beachten, dass bei der hier gewählten Konzentration und Inkubationszeit von TMZ die Induktion der γ H2AX-Foci pro Zelle nah am zählbaren Limit (Sättigung) lag.

5.3.3 Einfluss von ART und TMZ auf die Induktion und Efflux der Autophagie der Glioblastomzelllinien

Damit blieb die Frage zunächst offen, welche Mechanismen für die mehr als additive Induktion des Zelltods verantwortlich waren. Die morphologischen Untersuchungen und auch der DNA-Reparatur-Assay lieferten einen ersten Hinweis auf die Beteiligung weiterer Mechanismen, die Einfluss auf den Zelltod der Zellen haben könnten. In der

5.3. Wirkungsmechanismen von Artesunat alleine und in den Kombinationstherapien mit Temozolomid und Bestrahlung

Arbeit von Hamacher-Brady legen die Wissenschaftler dar, dass ART bei Brustkrebszellen die Lysosomen schädigt und so den Ablauf der Autophagie unterbricht und über die mitochondriale Membranpermealisation den intrinsischen Apoptoseweg induziert [Hamacher-Brady u. a. (2011)]. Dabei kommt es nicht nur zur Schädigung der Lysosomen und Mitochondrien, sondern auch zur Akkumulation von autophagischen Vesikeln [Hamacher-Brady u. a. (2011)], die in den morphologischen Untersuchungen sichtbar werden. Analoge morphologische Untersuchungen in der hier vorgelegten Studie zeigten die Zellen nach ART-Behandlung stark granuliert, was durch die Akkumulation von Vesikeln im Zytoplasma bedingt wurde. Der DNA-Array und die anschließenden semiquantitativen PCRs zeigten durch die deutlich niedrigere Expression von mTOR einen Hinweis darauf, dass ART einen Einfluss auf die Autophagie haben könnte. Die Granularität und die niedrige Expression von mTOR wurden auch in anderen Arbeiten als Hinweis für Autophagie interpretiert [Zhou u. a. (2013); Nazio und Cecconi (2013)].

Mittels der LC3-Proteinexpression und der Lebendzellanalyse am Durchflusszytometer zeigte sich hier, dass nach ART-Zugabe die Zellen Autophagie induzieren, die mit der Dauer der Inkubation und Höhe der Konzentration zunahm. In der Literatur ist TMZ ein starker Auslöser der Autophagie, doch über die Zeit kann diese wieder abnehmen [Kanzawa u. a. (2004); Knizhnik u. a. (2013)]. Daher wurde von den zuvor gewählten Endpunktanalysen, die zudem nicht einen gesamten Prozess widerspiegeln können, zu den Verlaufsanalysen 72 Stunden bis 144 Stunden nach TMZ-Behandlung gewechselt. Für die ersten Untersuchungen der Autophagie wurde mit der MDC-Messung begonnen, dann wurde das kommerzielle Kit CytoID dazugenommen. Letzteres basiert nur auf der Messung autophagischer Vakuolen und misst die Lysosomen nicht mit, was ein Vorteil gegenüber der MDC-Messung sein kann [Guo u. a. (2015); Porter u. a. (2013); Pandit und Gartel (2011)]. Bei den Zelllinien LN-229 und A172 war ein signifikanter Unterschied im Verlauf der Autophagie zu beobachten. Obwohl ART alleine wie TMZ ebenfalls die Autophagie induzierten, wurde diese in der Kombination

bei diesen beiden Zelllinien inhibiert. Eine Erhöhung des Zelltods durch Inhibition der Autophagie nach TMZ-Behandlung wurde bestätigt [Knizhnik u. a. (2013)].

Die Parallelität der Analysen machte es möglich, die Ergebnisse direkt zu vergleichen und zu diskutieren. Besonders die verschiedenen Autophagie-Messungen, die im direkten Vergleich für sich gleiche Tendenzen zeigten, wiesen im Detail doch Abweichungen auf. Diese Unterschiede könnten durch die Aktivität und den Stress der Lysosomen durch die Behandlung mit ART und TMZ bedingt sein, da die Lysosomen verschieden stark in die Messungen eingingen.

Zur weiteren Analyse der Beteiligung der Lysosomen wurden parallel die Kathepsin B-Messungen durchgeführt, die als Indikatoren von lysosomalen Stress dienen und als Kontrollen intakter Lysosomen mitgeführt wurden. Hier zeigten sich im Gegensatz zur Arbeit von Hamacher-Brady [Hamacher-Brady u. a. (2011)] keine signifikanten Unterschiede. Diese Ergebnisse wurden durch die Experimente mit Lysotracker an lebenden Zellen bestätigt. Die Hypothese, dass ART die Autophagie induziert aber gleichzeitig die Lysosomen durch die hohe ROS-Produktion so schädigt, dass nicht mehr genug funktionelle Einheiten für das Fortlaufen der Autophagie zur Verfügung stehen, konnte unter Verwendung des Lysotrackers und der Untersuchung der freien Kathepsine im Zytosol widerlegt werden. In der Arbeit von Hamacher-Brady ist die Aktivität der freigesetzten Kathepsine Voraussetzung für die mitochondriale Membranpermeabilisierung und der Induktion des intrinsischen Apoptosewegs. Auch das traf in dieser Kombination mit ART nicht zu, bestätigte aber im Gegenzug die anderen Ergebnisse dieser Arbeit, da keine Schädigung der Lysosomen beobachtet bzw. gemessen wurden.

Dass der Ablauf der Autophagie in dieser Studie unabhängig von der Aktivierung der Kaspasen verlief, konnte durch die parallele Analyse der Kaspasen bestärkt werden. Die Untersuchung der Aktivität der Kaspasen 3 und 7 und der Proteinexpression weiterer Kaspasen untermalten die Hypothese, dass ein anderer Mechanismus zur Induktion des Zelltods führte. Obwohl in dem Experiment mit Lysotracker und Mitotracker eine Beeinträchtigung der Mitochondrien zu beobachten war, zeigte sich hier kein signifi-

5.3. Wirkungsmechanismen von Artesunat alleine und in den Kombinationstherapien mit Temozolomid und Bestrahlung

kanter Einfluss auf die Kaspasen wie auch zuvor bei den Kathepsinen. Dafür konnte bei der Zelllinie A172, die einen hohen Anteil apoptotischer Zellen nach Kombinationsbehandlung aufwies, ein signifikanter Anstieg der Autophagie-Induktion gezeigt werden, wenn die Zellen zuvor mit einem Kaspase-Inhibitor behandelt wurden. Dies war ein weiterer Hinweis, dass der hier induzierte Prozess des Zelltods mit dem Prozess der Autophagie zusammenhing, aber der Signalweg ein anderer war als der in der Arbeit von Hamacher-Brady beschriebene. So wurde mit anderen Krebszelllinien (Leberkrebszellen und Gebärmutterhalskrebs) sogar gezeigt, dass ART die Funktion der Lysosomen verstärkt und so zur Induktion des Zelltods in diesen Krebszellen führt [Yang u. a. (2014)].

Da die Behandlungen mit ART und TMZ für sich alleine die Autophagie induzierten, aber in Kombination den Ablauf der Autophagie reduzierten, entstand die Hypothese der Überlastung des Autophagie-Mechanismus. Wenn der Prozess der Autophagie zu stark induziert wird, führt dies zu einer dynamischen Selbstzerstörung der Zellen und schließlich zum Zelltod [Maiuri u. a. (2007)]. Zur Untersuchung der These, dass es auch hier in der Kombinationsbehandlung zu einer zu starken Induktion oder Überlastung der Autophagie kam, wurde ein starker Autophagie-Induktor mit ART kombiniert. Rapamycin eignete sich hier nicht als Induktor der Autophagie, aber Ammoniak zeigte sich besonders in der Zelllinie A172 als potenter Induktor der Autophagie. Die parallele Analyse der Autophagie und des Zelltods bestärkte in keiner der Zelllinien die Hypothese der Autophagieüberlastung. Selbst in der Zelllinie A172, in der die Kombination von Ammoniak und ART zu einer signifikanten Erhöhung des Zelltods führte, zeigte sich aber keine Reduktion der Autophagie im Vergleich zur Einzelbehandlung mit Ammoniak.

So wie die Autophagie selbst als zweischneidiges Messer von Überlebens- bis Zelltodmechanismus, Tumorreduktion bis -progression scharf debattiert wird [Lum u. a. (2005); Mathew u. a. (2007); Chen u. a. (2010)] und selbst auch die bekannten Inhibitoren der Autophagie doppelte Rollen in der Autophagie einnehmen (Inhibitor und Induk-

tor) [Wu und Hu (2010)], blieb auch in dieser Studie Vieles in Bezug auf die Autophagie kontrovers und bedarf weiterer Untersuchungen. Dass Artesunat kein reiner Induktor oder Inhibitor der Autophagie ist, verdeutlichen die Versuche mit den verschiedenen Autophagieinhibitoren. Nach ART-Behandlung zeigte sich in den Zellen eine erhöhte Akkumulation der LC3BII-Proteine, doch in der Kombinationsbehandlung wurde ersichtlich, dass der Eflux der Autophagie gehemmt wurde und somit die Prozessierung dieser Proteine störte. Parallel zur Hemmung des Eflux des Autophagie-Prozesses zeigte sich eine höhere Induktion des Zelltods. Artesunat inhibierte die durch TMZ induzierte Autophagie, jedoch nicht durch eine alleinige Überaktivierung des Autophagieprozesses. Die Lysosomen blieben eher unbeschadet im Gegensatz zu den Mitochondrien, es zeigte sich weder eine gesteigerte Kathepsin- noch Kaspase-Aktivität. Die Bestätigung oder Widerlegung der Hypothese der Überlastung der Autophagie durch ART und TMZ in Kombination bleibt noch offen. Nur in der Zelllinie A172 konnten Hinweise auf eine Überlastung beobachtet werden, aber auch dort war die Überlastung nicht ausreichend für den gesteigerten Zelltod.

So zeigte sich auch in dieser Arbeit, dass das Wirkungsspektrum von Artesunat noch nicht im Detail geklärt ist. Bestätigt werden konnte, dass ART den durch TMZ induzierten Autophagie-Prozess inhibiert und die Inhibition der Autophagie zur Induktion des Zelltods führt. Ferner konnte durch die Ergebnisse mit dem Apoptose-Inhibitor ZVAD [Boya u. a. (2005)] gezeigt werden, dass der Prozess der Autophagie mit dem des induzierten Zelltods im Zusammenhang steht. Inwieweit sich die Prozesse gegenseitig bedingten und ob diese direkt aufeinander wirkten, bleibt noch offen.

5.3.4 Einfluss von ART und TMZ auf den Zellzyklus der Glioblastomzelllinien

Zum einen legten die morphologischen Untersuchungen neben der Autophagie einen weiteren Mechanismus nahe, der einen direkten Einfluss auf die Induktion des Zelltods hat. Nach TMZ-Behandlung konnte bei den Zellen eine starke Abflachung und Granu-

5.3. Wirkungsmechanismen von Artesunat alleine und in den Kombinationstherapien mit Temozolomid und Bestrahlung

lierung beobachtet werden. In der Einzelbehandlung von ART und in der Kombination mit TMZ waren die Zellen nicht mehr abgeflacht, aber noch stark granuliert. Diese durch TMZ-Exposition stark abgeflachten Zellen lieferten einen Hinweis auf eine bestehende Seneszenz. Nach Behandlung mit TMZ wurde dies bereits beschrieben [Filippi-Chiela u. a. (2013); Knizhnik u. a. (2013); Castro u. a. (2015)].

Zum anderen bestärkten die Ergebnisse der Zellzyklusanalysen der behandelten Zellen diese Hypothese. Nach TMZ-Behandlung zeigten alle Zelllinien einen starken G2-Block von etwa 50 % bis 70 %. Mit zunehmender Dauer der TMZ-Behandlung vergrößerte sich zudem der Anteil an polyploiden Zellen ($n > 4$ Phase) von anfänglich maximal 10 % auf über 40 %. Auch wenn der Prozess der Seneszenz bis heute noch einige Fragen aufwirft, ist jedoch genau dieser Faktor, die Zunahme des Anteils polyploider Zellen, ein entscheidendes Merkmal seneszenten Zellen [d'Adda di Fagnana (2008)].

Nach ART-Einzelbehandlung waren nur eine minimale G2-Arretierung und wenige polyploide Zellen (DNA-Gehalt $n > 4$) zu erkennen. Der Vergleich der TMZ behandelten Zellen zu denen mit Kombinationsbehandlung offenbarte bei den Zelllinien LN-229 und A172 eine signifikante Reduktion der Zellen in der $n > 4$ Phase. Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass ART den Überlebensmechanismus Seneszenz, der durch die TMZ-Behandlung induziert wird, inhibiert.

Auch bei den bestrahlten Zellen der Zelllinie LN-229 konnten diese signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Im Gegensatz zur TMZ-Behandlung zeigten sich die Zellen nach der Bestrahlung nur zu 20% in einem G2-Block aber bis zu 50% in der $n > 4$ Phase. Diese Phase wurde über die Dauer der ART-Behandlung in den kombinationsbehandelten Zellen immer geringer. Auch hier bestätigte dies die Hypothese, dass ART den Überlebensmechanismus Seneszenz, der durch die Bestrahlung induziert wird, inhibiert.

5.3.5 Einfluss von ART und TMZ auf die Induktion der Seneszenz der Glioblastomzelllinien

Das Protein p16 ist ein bekannter Marker für die Induktion der Seneszenz [Michaloglou u. a. (2005); Dhomen u. a. (2009); Bascones-Martínez u. a. (2012)]. Da aber keine der verwendeten Zelllinien dieses Protein exprimiert, konnte auf diesen Marker nicht zurückgegriffen werden. Daher wurde der bekannteste Marker der Seneszenz, die Aktivität der SABG [Dimri u. a. (1995); Gorospe und Abdelmohsen (2011); Vizioli u. a. (2011)], genutzt (siehe Kapitel 1.5.3).

Von der Mainzer Arbeitsgruppe ist dargelegt worden, dass die Autophagie der Seneszenz vorausgeht bzw. für die Induktion der Seneszenz Voraussetzung ist [Knizhnik u. a. (2013)]. In dieser Arbeit konnte in den Zelllinien LN-229 und A172 nachgewiesen werden, dass die Autophagie in der Kombinationsbehandlung durch ART in ihrem Ablauf inhibiert wurde. Dies galt sowohl nach TMZ-Behandlung bei den Zelllinien LN-229 und A172 als auch nach Bestrahlung bei der Zelllinie LN-229. Schon einige Jahre zuvor ist gezeigt worden, dass auch bei der Bestrahlung die Autophagie eine entscheidende Rolle spielt [Palumbo u. a. (2012)], die Rolle der Seneszenz jedoch noch ungeklärt ist.

Mittels der Aktivitätsanalyse der SABG konnte in der hier vorliegenden Studie in den Zelllinien LN-229 und A172 die Hypothese zur Seneszenzinhibition durch die ART-Behandlung bestätigt werden. So zeigte sich in der Kombinationsbehandlung eine signifikante Reduktion der SABG-Aktivität gegenüber den allein mit TMZ behandelten Zellen, die eine starke Induktion der SABG-Aktivität zeigten. Nach Einzelbehandlung von ART war die SABG-Aktivität noch geringer als in den unbehandelten Kontrollen. Die Behandlung mit ART zeigte in den beiden Zelllinien eine signifikante Reduktion der Seneszenz, ein wichtiger Resistenzfaktor in der Tumorthherapie, der durch die Tumorbehandlung (Chemotherapie und Bestrahlung) erst induziert wird.

In Abb. 5.2 sind noch einmal die bereits in Abb. 5.1 aufgestellten Hypothesen rekapituliert und mit den Ergebnissen und Erkenntnissen dieser Arbeit erweitert worden.

5.3. Wirkungsmechanismen von Artesunat alleine und in den Kombinationstherapien mit Temozolomid und Bestrahlung

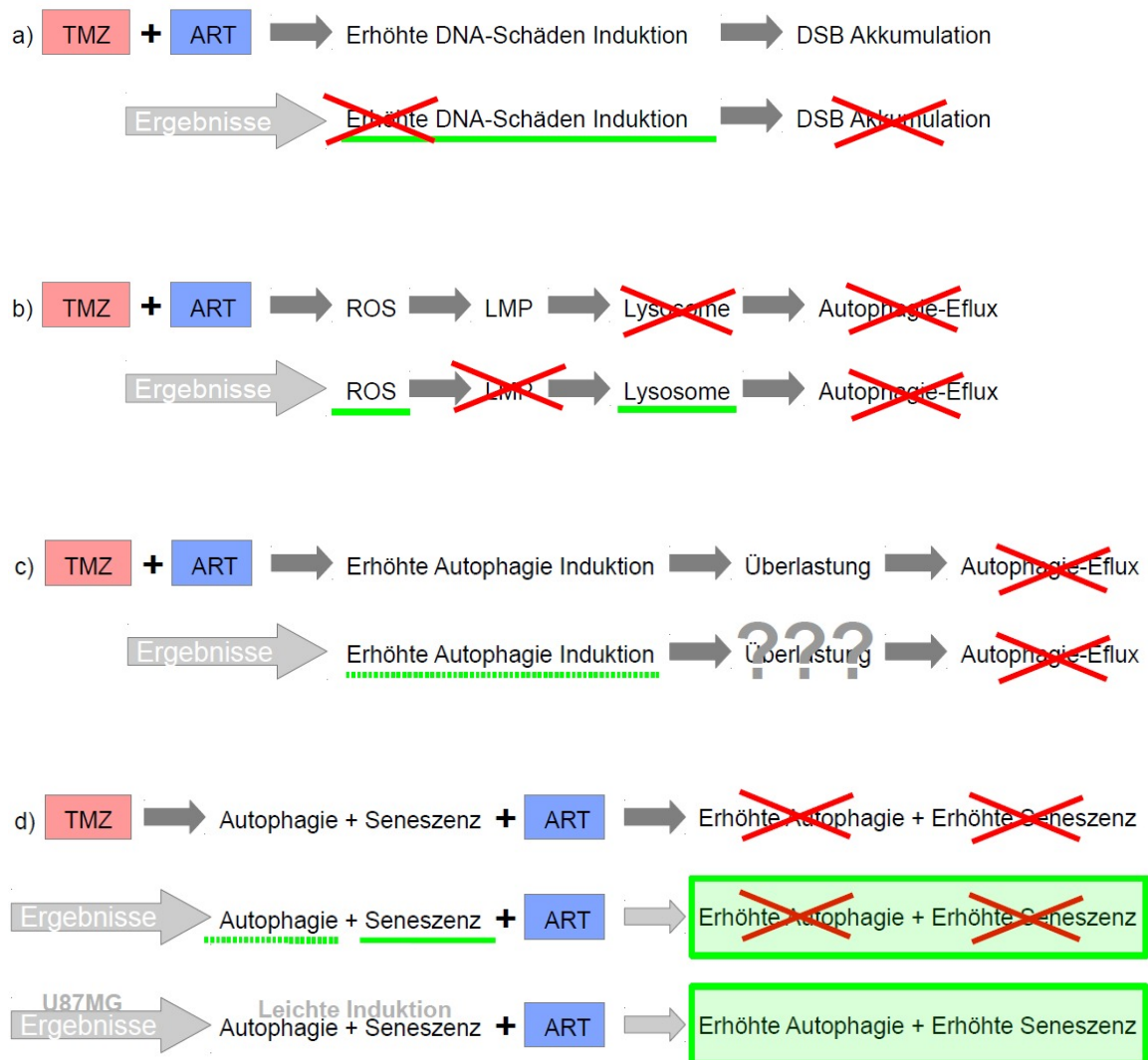


Abbildung 5.2: Hypothesen und Ergebnisse zu den Analysen der Wirkungsmechanismen in der Kombinationsbehandlung. Zusammenfassung der Hypothesen und Ergebnisse zu den Analysen der Wirkungsmechanismen in dieser Arbeit. Die Kombinationsbehandlung führte nicht zur erhöhten DNA-Schadensinduktion und Akkumulation der DSB (a). Die bestätigte ROS-Produktion führte nicht zur LMP und somit nicht zur Schädigung der Lysosomen, dennoch kam es zur Hemmung des Autophagie-Efflux (b). Das die erhöhte (zusätzliche) Autophagie-Induktion zur Überlastung der Autophagie und somit zur Hemmung des Autophagie-Efflux führte, konnte nicht eindeutig gezeigt werden (c). Die durch TMZ zuvor induzierten Überlebensmechanismen Autophagie und Seneszenz wurden durch die Zugabe von ART gestört bzw. inhibiert (d).

Einige der aufgestellten Hypothesen mussten nach Durchführung und Auswertung der Versuche verworfen werden, die anderen konnten durch diese Arbeit bekräftigt werden. Es zeigte sich, dass durch die hier durchgeführten Studien neue Erkenntnisse und interessante Einblicke in der Wirkungsweise von ART in Kombination mit TMZ erzielt werden konnten. Ebenso wurden die Abläufe der Zellreaktionen auf die Kombinationsbehandlung besser verstanden, womit sich neue Ansätze für kommende Studien öffnen.

5.4 Resümee der Resultate

Diese Arbeit zeigt, dass ART ein effektiver Wirkstoff zur Ergänzung der Tumorthherapie von Glioblastomen ist, der die Effektivität der Chemotherapie mit Temozolomid und der Bestrahlung steigert. In dieser Studie führen die Ergebnisse zu dem Resultat, dass der effizienten Verstärkung sowohl der Chemotherapie als auch der Bestrahlung die Inhibition der durch die Behandlung induzierten Überlebensmechanismen der Zellen zu Grunde liegt. Die Entwicklung von Resistenzen, die durch die Behandlung selbst induziert werden, können durch die Gabe von Artesunat reduziert werden.

Selbst für die Zelllinie U87MG, die in den *in vitro*-Versuchen öfters von den Ergebnissen der anderen Zelllinien abwich und sich auch in der Kombinationsbehandlung als die resistanteste Zelllinie erwies, waren auch die *in vivo*-Experimente sehr erfolgreich verlaufen und führten zu einer deutlichen Verbesserung der Tumorthherapie im Mausmodell.

Diese positiven Ergebnisse und die langjährigen positiven Erfahrungen mit Artesunat als Malariamedikament fordern als weiterführende Konsequenz eine klinische Studie. Zuvor sollte das Spektrum von Glioblastomzelllinien erweitert werden. Zum einen sollten hier auch Zelllinien gewählt werden, die im p53 Protein eine funktionelle Mutation aufweisen, zum anderen sollten auch Glioblastomstammzellen untersucht werden, da diese sich in der Tumorthherapie oftmals anders verhalten als Zelllinien [Visvader und Lindeman (2008); Wang u. a. (2007); Hambardzumyan u. a. (2006)]. Erste *in vivo*-

Versuche, die mit Glioblastomstammzellen durchgeführt wurden, zeigten im Vergleich zu den Glioblastomzelllinien eine geringere Effektivität der Kombinationsbehandlung (Daten sind hier nicht gezeigt).

Auch in der hier vorliegenden umfangreichen Studie bleiben noch einige Fragen unbeantwortet. So ist das Thema Bestrahlung und Artesunat als Kombination nur am Rande mitgeführt worden, doch zeigten sich auch hier vielversprechende *in vitro*-Ergebnisse, die gut auf die etablierten Mausmodelle übertragbar sind. Hier ist auch eine erweiterte Kombination von Bestrahlung, Chemotherapie und Artesunat möglich und sinnvoll.

In den *in vitro*-Analysen sind auch nicht alle Fragen geklärt und manche der Hypothesen bedürfen weiterer Analysen. So ist die Kopplung zwischen dem Prozess der Autophagie und dem der Seneszenz noch nicht im Detail offengelegt. Es konnten klärende Erkenntnisse zur kontroversen Situation in der Literatur hinzugefügt werden, aber eine finale Antwort ist auch hier nicht gefunden. Zudem müssen noch andere Mechanismen durch die Gabe von ART beeinträchtigt sein, da auch bei der Zelllinie U87 MG *in vitro* und *in vivo* die Kombinationsbehandlung effektiver als die Einzelbehandlungen ist, jedoch bei diesen Zellen weder die Autophagie noch die Seneszenz signifikant inhibiert sind.

Desweiteren lieferten erste Ergebnisse Hinweise auf eine enorme Steigerung des ER-Stresses nach Kombinationsbehandlung von TMZ und ART in der Zelllinie LN-229 (siehe Anhang 7.2). ER-Stress kann der Auslöser vieler Zellmechanismen sein, in der Literatur wird auch auf den der Seneszenz eingegangen [Kuilman u. a. (2010)]. Hier könnte eine neue Studie begonnen werden, um den genauen Verlauf von der Schadenskaskade hin zur Inhibition der Resistenzmechanismen zu entschlüsseln.

Da Artesunat in die induzierten Überlebensmechanismen eingreift und diese effektiv inhibiert, werden die durch die Therapie ausgelösten Resistenzen aufgehoben. Artesunat bietet hier die Möglichkeit, bestehende klassische Therapieansätze in ihrer Wirkung zu potenzieren, da die ausgelösten Resistenzmechanismen gestört und verhindert werden.

Werden auch in anderen Behandlungsmethoden Resistenzen durch die Induktion von

Autophagie und Seneszenz ausgelöst, können auch hier Ansätze für weitere Therapiemöglichkeiten mit Artesunat liegen. Zu beachten ist dabei, dass gerade die Krebszellen (entartete Zellen mit einem hohen Eisengehalt) für Artesunat anfällig sind und bevorzugt diese Zellen geschädigt werden und nicht die gesunden Zellen [Hamacher-Brady u. a. (2011); Kroemer und Jäättelä (2005)]. Weiterhin können andere Wirkstoffe mit ähnlichen Merkmalen wie die von Artesunat für die Verbesserung der Glioblastomtherapie in Betracht gezogen werden.

Artesunat hat das Potenzial, die Tumorthherapie zu revolutionieren. Es reduziert die Entwicklung von Resistenzen, die durch die Behandlung selbst ausgelöst werden. Durch die Kombination mit ART konnten die Dosen der Chemotherapie und Bestrahlung reduziert werden. Zudem konnte die Kombinationsbehandlung mit ART und TMZ erfolgreich auf Tiermodelle übertragen werden und in der Kombinationsbehandlung eine um etwa 40% längere Lebensdauer der Mäuse im Vergleich zur Einzelbehandlung mit TMZ erzielt werden.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Die häufigste und aggressivste Form von Hirntumoren bei erwachsenen Menschen sind die Glioblastome (Grad WHO-IV), bei denen die Rate der Neuerkrankungen weiter zunimmt. Die Tumorthherapie bestehend aus Resektion, Bestrahlung und Chemotherapie führt zu einer mittleren Überlebenszeit von etwa 15 Monaten nach Diagnose. Die geringe Wirkung der Chemo- und Radiotherapie ist zum größten Teil auf die Entwicklung von Resistenzmechanismen zurückzuführen. Deswegen ist eine Steigerung der Effektivität der Chemo- und Radiotherapie dringend erforderlich.

Artesunat, ein bekannter Anti-Malaria-Wirkstoff, der *in vitro* die Zellteilung bei Krebszellen hemmt, wurde in der hier vorliegenden Arbeit mit einer Chemo- und Radiotherapie kombiniert und analysiert. Ein Grundstein der Arbeit bildete die Fragestellung, ob diese Kombination eine positive Wirkung auf die Effektivität der Tumorthherapie hat und falls ja, welche Mechanismen dem zugrunde liegen. Ferner sollte untersucht werden, ob ein *in vitro* etabliertes Behandlungsschema mit Erfolg auf *in vivo*-Modelle übertragbar ist.

Eines der wichtigsten und am häufigsten für Glioblastome verwendeten Chemotherapeutika ist das Temozolomid, das — ebenso wie Bestrahlung — DNA-Schäden induziert. Diese führen bei den Glioblastomzellen zu einem Zellzyklusarrest, Induktion des

Zelltods, aber auch zur Induktion von Überlebensmechanismen wie der Autophagie und der Seneszenz. In dieser Studie wurden sowohl Temozolomid als auch die Bestrahlung in einem neuen Behandlungsansatz mit Artesunat kombiniert.

Zur Etablierung des *in vitro*-Behandlungsschemas wurden Zelltodanalysen an drei Glioblastomzelllinien für verschiedene applizierte Dosen Artesunat und unterschiedliche Behandlungsdauer sowie verschiedene Therapieabfolgen in Einzel- und Kombinationsbehandlung durchgeführt. Die Kombination mit Artesunat führte zu einer deutlichen Steigerung der Effektivität im Vergleich zu den Einzelbehandlungen. Nach Etablierung der sequentiellen Kombinationsbehandlung stellte sich die Frage nach den zugrunde liegenden Mechanismen. Eine der ersten Hypothesen, basierend auf bereits publizierten Ergebnissen, zielte auf die gentoxische Wirkung aller drei Noxen: Da sowohl Temozolomid, Bestrahlung als auch Artesunat DNA-Schäden induzieren, lag die Vermutung nahe, dass eine Akkumulation von DNA-Schäden zur gesteigerten Toxizität führt. Diese Hypothese konnte durch die Analyse von Proteinen der DNA-Schadensantwort nicht bestätigt werden.

Weitere Analysen kombiniert mit Erkenntnissen aus der Literatur führten zu der Hypothese, dass die gesteigerte Toxizität der Kombination auf der Inhibition von Überlebensmechanismen wie Autophagie und Seneszenz basiert, die durch Temozolomid induziert werden und für die Entstehung von Resistenzen verantwortlich sein könnten. Die Untersuchungen bestätigten letztendlich, dass Artesunat auf die durch Temozolomid induzierte Autophagie einwirkt und die durch Temozolomid induzierte Seneszenz inhibiert. Die Inhibition der Seneszenz führte in dieser Studie zur Erhöhung der Toxizität und somit zur Steigerung der Effektivität der Chemotherapie.

Das *in vitro* etablierte Behandlungsschema wurde erfolgreich auf ein subkutanes und folgend auf ein intrakranielles Tumormodell in der Maus übertragen. Die Steigerung der Effektivität der Kombinationsbehandlung konnte in den beiden Mausmodellen bestätigt werden. Es zeigte sich besonders im intrakraniellen Modell eine 40% längere Lebensdauer der Mäuse mit kombinierter Behandlung von Artesunat und Temozolomid

verglichen mit der Überlebenszeit der Mäuse mit alleiniger Behandlung von Temozolomid (bis zum geplanten Ende des Versuchs).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die effiziente Verstärkung der Chemotherapie durch Artesunat an der Inhibition der durch die Behandlung induzierten Überlebensmechanismen der Zellen liegt. Die verbesserten Therapieergebnisse der sequentiellen Behandlung mit Temozolomid und Artesunat bieten somit eine vielversprechende Strategie für zukünftige Krebstherapien, die in klinischen Studien untersucht werden sollte.

Kapitel 7

Anhang

7.1 Untersuchung der Proteinexpression zur Zellzyklusanalyse der Zelllinie LN-229 nach Behandlung mit ART

Zur genaueren Analyse und zur Bestätigung der Zellzyklusveränderung der Zelllinie LN-229 durch die Behandlung von ART wurde die Proteinexpression von pChk1 und pChk2 sowie von Cyclin B1 und Cyclin D1 in Abhängigkeit der Konzentration von ART bestimmt. Die Ergebnisse der Westernblots sind im Balkendiagramm in Abb. 7.1 dargestellt.

Achtundvierzig Stunden nach ART-Behandlung war eine über zweifach höhere Expression der pChk2 Proteine zu beobachten. Bei den pChk1 Proteinen war kaum ein Unterschied zu erkennen. Bei der Zelllinie LN-229 wirkte sich die ART-Behandlung hemmend auf die Expression der Cycline B1 und D1 aus. Besonders die geringen Konzentrationen von ART sorgten für eine Runterregulation von Cyclin D1 von einem Faktor von vier (0.25), das Cyclin B1 war zweifach runterreguliert.

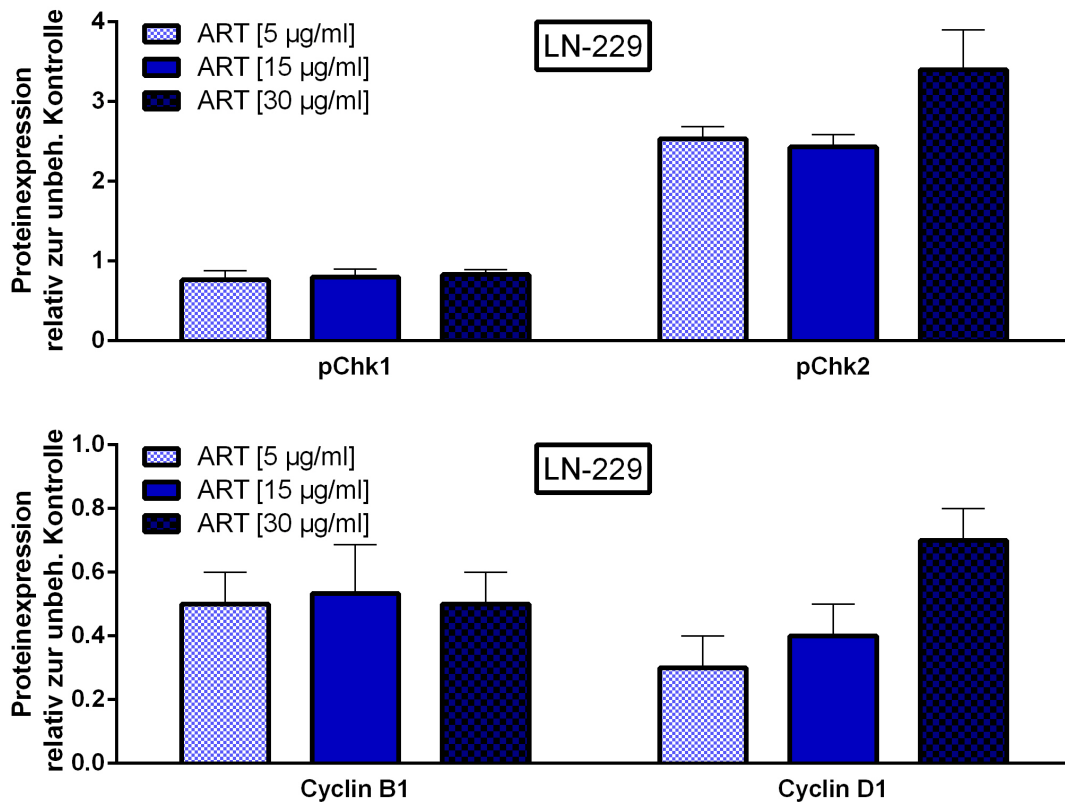


Abbildung 7.1: Zellzyklusanalysen der Zelllinie LN-229 nach ART-Behandlung. Zellzyklusanalysen mittels Proteinexpression von pChk1 und pChk2 (oben) und der Cycline B1 und D1 (unten) der Zelllinie LN-229 48 Stunden nach ART-Behandlung in Abhängigkeit aufsteigender ART-Konzentrationen von 5-15 µg/ml.

7.2 Untersuchung zur Induktion von ER-Stress innerhalb des neuen Behandlungsschemas

Die Induktion von ROS und der daraus resultierende ER-Stress ist ein bekannter Faktor in der Induktion der Seneszenz [Matos u. a. (2015)]. Da sowohl TMZ als auch ART ROS induzieren, besteht die Hypothese, dass durch die Kombinationsbehandlung der ER-Stress gesteigert wird.

Die Induktion des ER-Stresses wurde Mittels der Proteinexpression von pJNK und IRE

innerhalb des neuen Behandlungsschemas sechs und 12 Stunden nach ART-Behandlung analysiert. Die Ergebnisse sind in Relation zur unbehandelten Kontrolle in Abb. 7.2 dargestellt. Desweiteren wurde die Genexpression des Transkriptionsfaktors CHOP¹ untersucht, der bei ER-Sress hochreguliert wird und somit als spezifischer Marker für ER-Stress dient [Marciniak u. a. (2004)]. Für das Genexpressionsprofil wurden die zuvor für den DNA-Repair-Array synthetisierten cDNAs (sechs Stunden nach den Behandlungen) der Zelllinie LN-229 verwendet. Diese Zellen wurden noch nach dem simultanen Behandlungsschema behandelt (siehe Kapitel 4.2.1.6). Die Regulation des Gens ist in Relation zur unbehandelten Kontrolle in Abb. 7.3 dargestellt.

Bei den Zelllinien LN-229 und A172 ergaben sich in den untersuchten Proteinexpressionen Werte von unter zwei relativ zur unbehandelten Kontrolle, bei der Zelllinie U87MG waren die Expressionen höher reguliert. Das Protein pJNK war bei der Zelllinie U87MG nach Einzelbehandlung von ART nicht reguliert, nach Einzelbehandlung von TMZ stieg die Expression auf einen Wert von über zwei an. In der Kombinationsbehandlung nahm die Expression mit der Zeit weiter zu. Das Protein IRE wurde nach Einzelbehandlung von ART kaum reguliert, auch nach Einzelbehandlung von TMZ stieg diese nur leicht auf einen Wert unter 1,5 an. In der Kombinationsbehandlung erhöhte sich die Expression sechs Stunden nach ART-Behandlung auf einen Wert über zwei, weitere sechs Stunden danach sank die Expression wieder auf einen Wert unter 1,5 und damit unter die Expression nach Einzelbehandlung mit TMZ.

Das Genexpressionsprofil des Transkriptionsfaktors CHOP zeigte nach Einzelbehandlung von ART eine deutlich gesteigerte Expression von über fünffach im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Nach Einzelbehandlung von TMZ war keine signifikante Expressionssteigerung zu beobachten. In der Kombinationsbehandlung aber war die Expression mehr als das 15-fache höher als in der unbehandelten Kontrolle.

¹C/EBP homologes Protein (CCAAT/Enhancer-Binding-Proteine (C/EBP) homologous protein, CHOP)

7.2. Untersuchung zur Induktion von ER-Stress innerhalb des neuen Behandlungsschemas

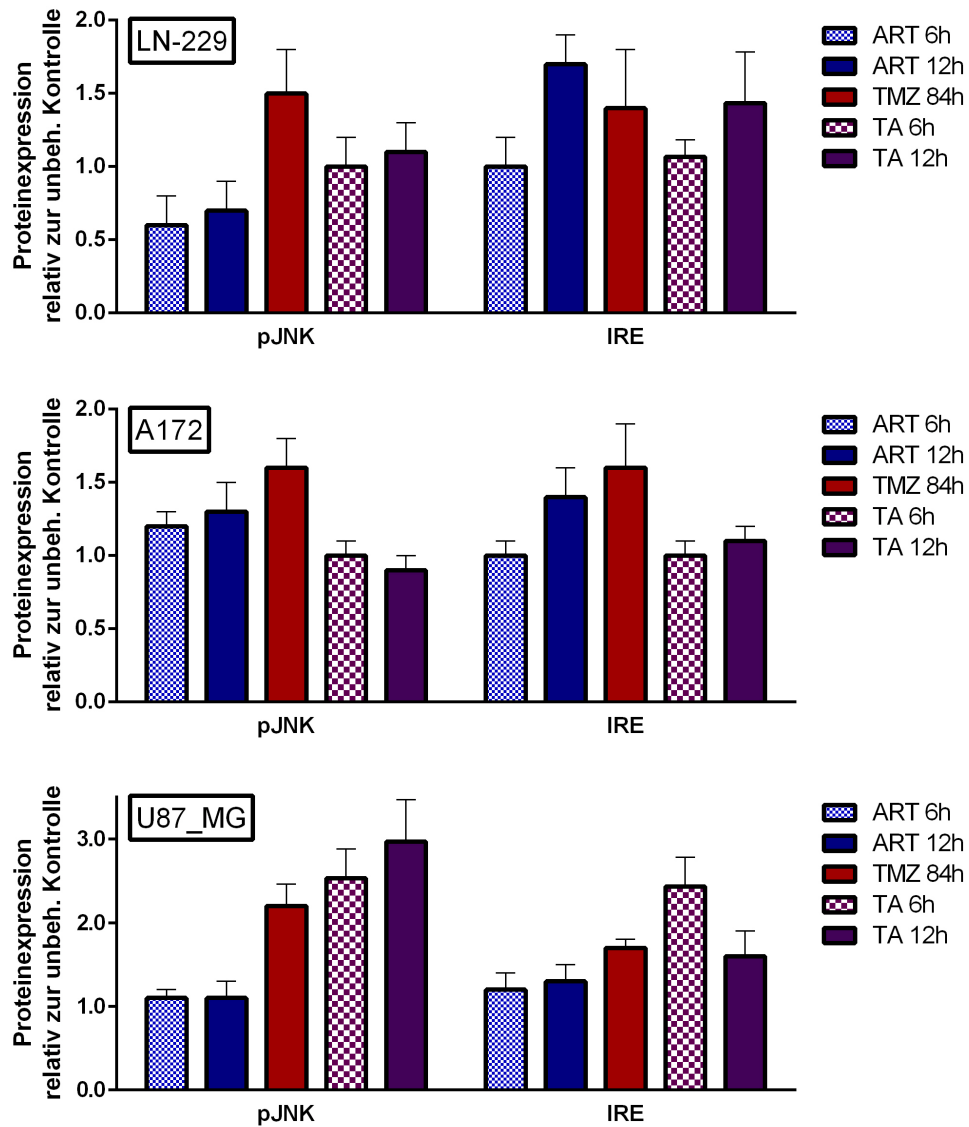


Abbildung 7.2: Untersuchung zum ER-Stress innerhalb des neuen Behandlungsschemas mittels Proteinexpression. Untersuchung zum ER-Stress mittels Proteinexpression von pJNK und IRE innerhalb des neuen Behandlungsschemas der Zelllinien LN-229 (oben), A172 (Mitte) und U87 MG (unten) sechs und 12 Stunden nach ART-Behandlung. Die Proteinexpression ist relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt, TA entspricht der Kombinationsbehandlung mit TMZ und ART nach dem neuem Behandlungsschema.

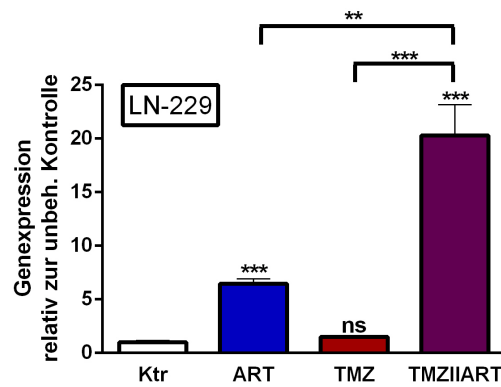


Abbildung 7.3: Untersuchung zum ER-Stress mittels Genexpression von CHOP bei der Zelllinie LN-229. *Untersuchung zum ER-Stress mittels Genexpression von CHOP bei der Zelllinie LN-229 12 Stunden nach Behandlung (simultane ART- und TMZ-Behandlung). Die Genexpression ist relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt.*

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP	apurine/apyrimidine Stelle
Apaf-1	apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor 1
APE1	Apurine Endonuklease
APS	Ammoniumpersulfat
ART	Artesunat
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Ataxia telangiectasia und Rad 3 verbunden
BER	Basenexzisionsreparatur
BLM	Bloom Syndrom Protein
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CHK1	Checkpoint Kinase 1
CHK2	Checkpoint Kinase 2
CSA	Cockayne Syndrom A
CSB	Cockayne Syndrom B
DDR	DNA-Schadensantwort
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PKcs	Kathalytische Untereinheit der DNA-abhängige Proteinkinase
dRP	5'desoxyribose-Phosphat
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK2	Extrazelluläre signalverbundene Kinase 2
EXO1	Exonuklease 1
FAN1	FANCD2/FANCI-assozierte Nuklease 1
FCS	Fetales Kälberserum
FEN1	Überhang Endomuklease 1
g	Gramm
GBS	Glioblastom
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR	Homologe Rekombination
HSP90	Hitzeschock Protein 90
i.p.	intraperitoneal
IFN- β	Interferon- β
JNK	Jun N-termnal Kinase
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
Ku70	Röntgenreparatur kreuzergänzendes Protein 6
Ku80	Röntgenreparatur kreuzergänzendes Protein 5
l	Liter
LIG1	DNA-Ligase
LIG3	DNA-Ligase
3MA	3 Methyladenin
m	Milli

7.2. *Untersuchung zur Induktion von ER-Stress innerhalb des neuen
Behandlungsschemas*

M	Molar
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minute(n)
Min	Minute
MITC	Monomethyl-triazenoimidazol-carboxamid
MLH1	MutL Homolog 1
MMR	Basenfehlpaarungsreparatur
MRE11	Meiotische Rekombinations Einheit 11
MSH2	MutS Homolog 2
MSH6	MutS Homolog 6
Mt	mutiert
n	nano
N3MeA	N3-Methyladenin
N7MeG	N7-Methylguanin
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBS	Nijmegen-Breakage-Syndrom
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NF	Zellkernfaktor
NH3	Ammoniak
NHEJ	Nicht-Homologe-Endverknüpfung
O6MeG	O6-Methylguanin
p	piko
PALB2	Partner und Lokalisator von BRCA2
PARP1	Poly(ADP-Ribose)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	Zellkernantigen proliferierender Zellen
PI	Propidiumjodid
PK	Positivkontrolle

PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
POL	Polimerase
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
Rap	Rapamycin
Rel.	Relativ
RFC	Replikationsfaktor C
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerasen
RPA	Replikationsprotein A
RT	Raumtemperatur
SABG	SA- β -Galaktosidase
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sek.	Sekunden
SSB	DNA-Einzelstrangbruch
ssDNA	einzelsträngige DNA
Stauro	Staurosporin
Std	Stunde(n)
Std	Stunde
Sub-G1	DNA-Gehalt kleiner G1 (Diploid)
TBS	Tris-Salz Puffer
TCR	Transkription gekoppelte Reparatur
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFIIH	Transkriptionsfaktor 2 H
TLS	Translasionssynthese
TMZ	Temozolomid
TMZ	Temozolomid
TOPO3	DNA-Topoisomerase 3
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

7.2. *Untersuchung zur Induktion von ER-Stress innerhalb des neuen
Behandlungsschemas*

U	Units, Einheiten für die Enzymaktivität
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Vol	Volumen
WHO	World Health Organisation
Wt	Wildtyp
XLF	XRCC4-bezogener Faktor
XPA	Xeroderma pigmentosum Protein A
XRCC1	Röntgenreparatur kreuzergänzendes Protein 1
XRCC4	Röntgenreparatur kreuzergänzendes Protein 4
ZVTE	Zentrale Versuchstiereinrichtung
μ	Mikro

Literaturverzeichnis

[Adamson u. a. 2009] ADAMSON, Cory ; KANU, Okezie O. ; MEHTA, Ankit I. ; DI, Chunhui ; LIN, Ningjing ; MATTOX, Austin K. ; BIGNER, Darell D.: Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. In: *Expert Opin Investig Drugs* 18 (2009), Aug, Nr. 8, S. 1061–1083. – URL <http://dx.doi.org/10.1517/13543780903052764>

[Akbar und Henson 2011] AKBAR, Arne N. ; HENSON, Sian M.: Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? In: *Nat Rev Immunol* 11 (2011), Apr, Nr. 4, S. 289–295. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/nri2959>

[Albert u. a. 1998] ALBERT, M. L. ; DARNELL, J. C. ; BENDER, A. ; FRANCISCO, L. M. ; BHARDWAJ, N. ; DARNELL, R. B.: Tumor-specific killer cells in paraneoplastic cerebellar degeneration. In: *Nat Med* 4 (1998), Nov, Nr. 11, S. 1321–1324. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/3315>

[Altieri u. a. 2014] ALTIERI, R. ; AGNOLETTI, A. ; QUATTRUCCI, F. ; GARBOSSA, D. ; SPECCHIA, F. M. C. ; BOZZARO, M. ; FORNARO, R. ; MENCARANI, C. ; LANOTTE, M. ; SPAZIANTE, R. ; DUCATI, A.: Molecular biology of gliomas: present and future challenges. In: *Transl Med UniSa* 10 (2014), Sep, S. 29–37

[Axe u. a. 2008] AXE, Elizabeth L. ; WALKER, Simon A. ; MANIFAVA, Maria ; CHANDRA, Priya ; RODERICK, H. L. ; HABERMANN, Anja ; GRIFFITHS, Gareth ; KTISTAKIS, Nicholas T.: Autophagosome formation from membrane compartments

- enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. In: *J Cell Biol* 182 (2008), Aug, Nr. 4, S. 685–701. – URL <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200803137>
- [Baehrecke 2005] BAEHRECKE, Eric H.: Autophagy: dual roles in life and death? In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (2005), Jun, Nr. 6, S. 505–510. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1666>
- [Banchereau und Steinman 1998] BANCHEREAU, J. ; STEINMAN, R. M.: Dendritic cells and the control of immunity. In: *Nature* 392 (1998), Mar, Nr. 6673, S. 245–252. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/32588>
- [Bascones-Martínez u. a. 2012] BASCONES-MARTÍNEZ, Antonio ; LÓPEZ-DURÁN, Mercedes ; CANO-SÁNCHEZ, Jorge ; SÁNCHEZ-VERDE, Lydia ; DíEZ-RODRÍGUEZ, Ana ; AGUIRRE-ECHEBARRÍA, Pablo ; ALVAREZ-FERNÁNDEZ, Emilio ; GONZÁLEZ-MOLES, Miguel A. ; BASCONES-ILUNDAIN, Jaime ; MUZIO, Lorenzo L. ; CAMPO-TRAPERO, Julián: Differences in the expression of five senescence markers in oral cancer, oral leukoplakia and control samples in humans. In: *Oncol Lett* 3 (2012), Jun, Nr. 6, S. 1319–1325. – URL <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2012.649>
- [Becker 2012] BECKER: Krebs. In: *Krebsatlas* (2012)
- [Beranek 1990] BERANEK, D. T.: Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. In: *Mutat Res* 231 (1990), Jul, Nr. 1, S. 11–30
- [Berdelle u. a. 2011] BERDELLE, Nicole ; NIKOLOVA, Teodora ; QUIROS, Steve ; EFFERTH, Thomas ; KAINA, Bernd: Artesunate induces oxidative DNA damage, sustained DNA double-strand breaks, and the ATM/ATR damage response in cancer cells. In: *Mol Cancer Ther* 10 (2011), Dec, Nr. 12, S. 2224–2233. – URL <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0534>

- [Berry und Baehrecke 2007] BERRY, Deborah L. ; BAEHRECKE, Eric H.: Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*. In: *Cell* 131 (2007), Dec, Nr. 6, S. 1137–1148. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.048>
- [Beucher u. a. 2009] BEUCHER, Andrea ; BIRRAUX, Julie ; TCHOUANDONG, Leopoldine ; BARTON, Olivia ; SHIBATA, Atsushi ; CONRAD, Sandro ; GOODARZI, Aaron A. ; KREMPLER, Andrea ; JEGGO, Penny A. ; LÖBRICH, Markus: ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. In: *EMBO J* 28 (2009), Nov, Nr. 21, S. 3413–3427. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2009.276>
- [Bialik und Kimchi 2006] BIALIK, Shani ; KIMCHI, Adi: The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond. In: *Annu Rev Biochem* 75 (2006), S. 189–210. – URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142615>
- [Biederbick u. a. 1995] BIEDERBICK, A. ; KERN, H. F. ; ELSÄSSER, H. P.: Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. In: *Eur J Cell Biol* 66 (1995), Jan, Nr. 1, S. 3–14
- [Bordin u. a. 2013] BORDIN, Diana L. ; LIMA, Michelle ; LENZ, Guido ; SAFFI, Jenifer ; MEIRA, Lisiane B. ; MÉSANGE, Paul ; SOARES, Daniele G. ; LARSEN, Annette K. ; ESCARGUEIL, Alexandre E. ; HENRIQUES, João A P.: DNA alkylation damage and autophagy induction. In: *Mutat Res* 753 (2013), Nr. 2, S. 91–99. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2013.07.001>
- [Boya und Kroemer 2008] BOYA, P. ; KROEMER, G.: Lysosomal membrane permeabilization in cell death. In: *Oncogene* 27 (2008), Oct, Nr. 50, S. 6434–6451. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2008.310>
- [Boya und Kroemer 2009] BOYA, P. ; KROEMER, G.: Beclin 1: a BH3-only protein that fails to induce apoptosis. In: *Oncogene* 28 (2009), May, Nr. 21, S. 2125–2127. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2009.83>

- [Boya u. a. 2005] BOYA, Patricia ; GONZÁLEZ-POLO, Rosa-Ana ; CASARES, Noelia ; PERFETTINI, Jean-Luc ; DESSEN, Philippe ; LAROCLETTE, Nathanael ; MÉTIVIER, Didier ; MELEY, Daniel ; SOUQUERE, Sylvie ; YOSHIMORI, Tamotsu ; PIERRON, Gérard ; CODOGNO, Patrice ; KROEMER, Guido: Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. In: *Mol Cell Biol* 25 (2005), Feb, Nr. 3, S. 1025–1040. – URL <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.25.3.1025-1040.2005>
- [Bradford 1976] BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal Biochem* 72 (1976), May, S. 248–254
- [Cadet u. a. 1999] CADET, J. ; DELATOUR, T. ; DOUKI, T. ; GASPARUTTO, D. ; POUGET, J. P. ; RAVANAT, J. L. ; SAUVAIGO, S.: Hydroxyl radicals and DNA base damage. In: *Mutat Res* 424 (1999), Mar, Nr. 1-2, S. 9–21
- [Campisi und d’Adda di Fagagna 2007] CAMPISI, Judith ; FAGAGNA, Fabrizio d’Adda di: Cellular senescence: when bad things happen to good cells. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (2007), Sep, Nr. 9, S. 729–740. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2233>
- [Carmo u. a. 2011] CARMO, A. ; CARVALHEIRO, H. ; CRESPO, I. ; NUNES, I. ; LOPES, M. C.: Effect of temozolomide on the U-118 glioma cell line. In: *Oncol Lett* 2 (2011), Nov, Nr. 6, S. 1165–1170. – URL <http://dx.doi.org/10.3892/o1.2011.406>
- [Castro u. a. 2015] CASTRO, Gisela N. ; CAYADO-GUTIÉRREZ, Niubys ; ZOPPINO, Felipe Carlos M. ; FANELLI, Mariel A. ; CUELLO-CARRIÓN, Fernando D. ; SOTTILE, Mayra ; NADIN, Silvina B. ; CIOCCA, Daniel R.: Effects of temozolomide (TMZ) on the expression and interaction of heat shock proteins (HSPs) and DNA repair proteins in human malignant glioma cells. In: *Cell Stress Chaperones* 20 (2015), Mar, Nr. 2, S. 253–265. – URL <http://dx.doi.org/10.1007/s12192-014-0537-0>
- [Chai u. a. 2000] CHAI, J. ; DU, C. ; WU, J. W. ; KYIN, S. ; WANG, X. ; SHI, Y.: Structural and biochemical basis of apoptotic activation by

- Smac/DIABLO. In: *Nature* 406 (2000), Aug, Nr. 6798, S. 855–862. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/35022514>
- [Chen u. a. 2010] CHEN, Suning ; REHMAN, Sumaiyah K. ; ZHANG, Wei ; WEN, Aidong ; YAO, Libo ; ZHANG, Jian: Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. In: *Biochim Biophys Acta* 1806 (2010), Dec, Nr. 2, S. 220–229. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.07.003>
- [Cheng u. a. 2011] CHENG, Lin ; WU, Qiulian ; GURYANOVA, Olga A. ; HUANG, Zhi ; HUANG, Qian ; RICH, Jeremy N. ; BAO, Shideng: Elevated invasive potential of glioblastoma stem cells. In: *Biochem Biophys Res Commun* 406 (2011), Mar, Nr. 4, S. 643–648. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.123>
- [Cho u. a. 2009] CHO, Eun S. ; JANG, Young J. ; HWANG, Mun K. ; KANG, Nam J. ; LEE, Ki W. ; LEE, Hyong J.: Attenuation of oxidative neuronal cell death by coffee phenolic phytochemicals. In: *Mutat Res* 661 (2009), Feb, Nr. 1-2, S. 18–24. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.10.021>
- [Christmann u. a. 2003] CHRISTMANN, Markus ; TOMICIC, Maja T. ; ROOS, Wynand P. ; KAINA, Bernd: Mechanisms of human DNA repair: an update. In: *Toxicology* 193 (2003), Nov, Nr. 1-2, S. 3–34
- [Collado und Serrano 2006] COLLADO, Manuel ; SERRANO, Manuel: The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. In: *Nat Rev Cancer* 6 (2006), Jun, Nr. 6, S. 472–476. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1884>
- [Cristofalo u. a. 2004] CRISTOFALO, Vincent J. ; LORENZINI, Antonello ; ALLEN, R. G. ; TORRES, Claudio ; TRESINI, Maria: Replicative senescence: a critical review. In: *Mech Ageing Dev* 125 (2004), Nr. 10-11, S. 827–848. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.mad.2004.07.010>
- [Curtin 2012] CURTIN, Nicola J.: DNA repair dysregulation from cancer driver to

- therapeutic target. In: *Nat Rev Cancer* 12 (2012), Nov, Nr. 12, S. 801–817. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3399>
- [Czarny u.a. 2015] CZARNY, Piotr ; PAWLOWSKA, Elzbieta ; BIALKOWSKA-WARZECHA, Jolanta ; KAARNIRANTA, Kai ; BLASIAK, Janusz: Autophagy in DNA damage response. In: *Int J Mol Sci* 16 (2015), Nr. 2, S. 2641–2662. – URL <http://dx.doi.org/10.3390/ijms16022641>
- [Danial und Korsmeyer 2004] DANIAL, Nika N. ; KORSMEYER, Stanley J.: Cell death: critical control points. In: *Cell* 116 (2004), Jan, Nr. 2, S. 205–219
- [Debacq-Chainiaux u. a. 2009] DEBACQ-CHAINIAUX, Florence ; ERUSALIMSKY, Jorge D. ; CAMPISI, Judith ; TOUSSAINT, Olivier: Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. In: *Nat Protoc* 4 (2009), Nr. 12, S. 1798–1806. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.191>
- [Degterev u. a. 2005] DEGTEREV, Alexei ; HUANG, Zhihong ; BOYCE, Michael ; LI, Yaqiao ; JAGTAP, Prakash ; MIZUSHIMA, Noboru ; CUNY, Gregory D. ; MITCHISON, Timothy J. ; MOSKOWITZ, Michael A. ; YUAN, Junying: Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. In: *Nat Chem Biol* 1 (2005), Jul, Nr. 2, S. 112–119. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio711>
- [Denton u. a. 2009] DENTON, Donna ; SHRAVAGE, Bhupendra ; SIMIN, Rachel ; MILLS, Kathryn ; BERRY, Deborah L. ; BAEHRECKE, Eric H. ; KUMAR, Sharad: Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. In: *Curr Biol* 19 (2009), Nov, Nr. 20, S. 1741–1746. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2009.08.042>
- [Dhomen u. a. 2009] DHOMEN, Nathalie ; REIS-FILHO, Jorge S. ; ROCHA DIAS, Silvy da ; HAYWARD, Robert ; SAVAGE, Kay ; DELMAS, Veronique ; LARUE, Lionel ;

PRITCHARD, Catrin ; MARAIS, Richard: Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. In: *Cancer Cell* 15 (2009), Apr, Nr. 4, S. 294–303. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2009.02.022>

[Dimri u. a. 1995] DIMRI, G. P. ; LEE, X. ; BASILE, G. ; ACOSTA, M. ; SCOTT, G. ; ROSKELLEY, C. ; MEDRANO, E. E. ; LINSKENS, M. ; RUBELJ, I. ; PEREIRA-SMITH, O.: A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995), Sep, Nr. 20, S. 9363–9367

[Duckett u. a. 1996] DUCKETT, D. R. ; DRUMMOND, J. T. ; MURCHIE, A. I. ; REARDON, J. T. ; SANCAR, A. ; LILLEY, D. M. ; MODRICH, P.: Human MutSalpha recognizes damaged DNA base pairs containing O6-methylguanine, O4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996), Jun, Nr. 13, S. 6443–6447

[Eadie u. a. 1984] EADIE, J. S. ; CONRAD, M. ; TOORCHEN, D. ; TOPAL, M. D.: Mechanism of mutagenesis by O6-methylguanine. In: *Nature* 308 (1984), Nr. 5955, S. 201–203

[Efferth u. a. 2001] EFFERTH, T. ; DUNSTAN, H. ; SAUERBREY, A. ; MIYACHI, H. ; CHITAMBAR, C. R.: The anti-malarial artesunate is also active against cancer. In: *Int J Oncol* 18 (2001), Apr, Nr. 4, S. 767–773

[Eich 2011] EICH, M.: *Doktorarbeit*, Unimedizin Mainz, Dissertation, 2011

[El-Khamisy u. a. 2003] EL-KHAMISY, Sherif F. ; MASUTANI, Mitsuko ; SUZUKI, Hiroshi ; CALDECOTT, Keith W.: A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. In: *Nucleic Acids Res* 31 (2003), Oct, Nr. 19, S. 5526–5533

[Esposti 1998] ESPOSTI, M. D.: Apoptosis: who was first? In: *Cell Death Differ* 5 (1998), Sep, Nr. 9, S. 719. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4400430>

- [Evan und Vousden 2001] EVAN, G. I. ; VOUSDEN, K. H.: Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. In: *Nature* 411 (2001), May, Nr. 6835, S. 342–348. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/35077213>
- [d’Adda di Fagagna 2008] FAGAGNA, Fabrizio d’Adda di: Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. In: *Nat Rev Cancer* 8 (2008), Jul, Nr. 7, S. 512–522. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2440>
- [Feng u. a. 2014] FENG, Yuchen ; HE, Ding ; YAO, Zhiyuan ; KLIONSKY, Daniel J.: The machinery of macroautophagy. In: *Cell Res* 24 (2014), Jan, Nr. 1, S. 24–41. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2013.168>
- [Filippi-Chiela u. a. 2013] FILIPPI-CHIELA, Eduardo C. ; THOMÉ, Marcos P. ; SILVA, Mardja Manssur Bueno E. ; PELEGRINI, Alessandra L. ; LEDUR, Pitia F. ; GARRICOHEA, Bernardo ; ZAMIN, Lauren L. ; LENZ, Guido: Resveratrol abrogates the Temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the Temozolomide-induced senescence in glioma cells. In: *BMC Cancer* 13 (2013), Mar, Nr. 1, S. 147. – URL <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-13-147>
- [Filippo u. a. 2008] FILIPPO, Joseph S. ; SUNG, Patrick ; KLEIN, Hannah: Mechanism of eukaryotic homologous recombination. In: *Annu Rev Biochem* 77 (2008), S. 229–257. – URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255>
- [Filomeni u. a. 2015] FILOMENI, G. ; ZIO, D. D. ; CECCONI, F.: Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. In: *Cell Death Differ* 22 (2015), Mar, Nr. 3, S. 377–388. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2014.150>
- [Finkel und Holbrook 2000] FINKEL, T. ; HOLBROOK, N. J.: Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. In: *Nature* 408 (2000), Nov, Nr. 6809, S. 239–247. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/35041687>
- [Furnari u. a. 2007] FURNARI, Frank B. ; FENTON, Tim ; BACHOO, Robert M. ; MUKASA, Akitake ; STOMMEL, Jayne M. ; STEGH, Alexander ; HAHN, William C. ;

LIGON, Keith L. ; LOUIS, David N. ; BRENNAN, Cameron ; CHIN, Lynda ; DEPINHO, Ronald A. ; CAVENEE, Webster K.: Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. In: *Genes Dev* 21 (2007), Nov, Nr. 21, S. 2683–2710. – URL <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1596707>

[Galluzzi u. a. 2007] GALLUZZI, L. ; MAIURI, M. C. ; VITALE, I. ; ZISCHKA, H. ; CASTEDO, M. ; ZITVOGEL, L. ; KROEMER, G.: Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. In: *Cell Death Differ* 14 (2007), Jul, Nr. 7, S. 1237–1243. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4402148>

[Galluzzi u. a. 2012] GALLUZZI, L. ; VITALE, I. ; ABRAMS, J. M. ; ALNEMRI, E. S. ; BAEHRECKE, E. H. ; BLAGOSKLONNY, M. V. ; DAWSON, T. M. ; DAWSON, V. L. ; EL-DEIRY, W. S. ; FULDA, S. ; GOTTLIEB, E. ; GREEN, D. R. ; HENGARTNER, M. O. ; KEPP, O. ; KNIGHT, R. A. ; KUMAR, S. ; LIPTON, S. A. ; LU, X. ; MADEO, F. ; MALORNI, W. ; MEHLEN, P. ; NUÑEZ, G. ; PETER, M. E. ; PIACENTINI, M. ; RUBINSZTEIN, D. C. ; SHI, Y. ; SIMON, H-U. ; VANDENABEELE, P. ; WHITE, E. ; YUAN, J. ; ZHIVOTOVSKY, B. ; MELINO, G. ; KROEMER, G.: Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. In: *Cell Death Differ* 19 (2012), Jan, Nr. 1, S. 107–120. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2011.96>

[Gewirtz 2014] GEWIRTZ, David A.: The four faces of autophagy: implications for cancer therapy. In: *Cancer Res* 74 (2014), Feb, Nr. 3, S. 647–651. – URL <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2966>

[Gorospe und Abdelmohsen 2011] GOROSPE, Myriam ; ABDELMOHSEN, Kotb: MicroRegulators come of age in senescence. In: *Trends Genet* 27 (2011), Jun, Nr. 6, S. 233–241. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2011.03.005>

[Gradia u. a. 1999] GRADIA, S. ; SUBRAMANIAN, D. ; WILSON, T. ; ACHARYA, S. ; MAKHOV, A. ; GRIFFITH, J. ; FISHEL, R.: hMSH2-hMSH6 forms a hydrolysis-

- independent sliding clamp on mismatched DNA. In: *Mol Cell* 3 (1999), Feb, Nr. 2, S. 255–261
- [Grills u. a. 2012] GRILLS, Inga S. ; HOPE, Andrew J. ; GUCKENBERGER, Matthias ; KESTIN, Larry L. ; WERNER-WASIK, Maria ; YAN, Di ; SONKE, Jan-Jakob ; BISSONNETTE, Jean-Pierre ; WILBERT, Juergen ; XIAO, Ying ; BELDERBOS, Jose: A collaborative analysis of stereotactic lung radiotherapy outcomes for early-stage non-small-cell lung cancer using daily online cone-beam computed tomography image-guided radiotherapy. In: *J Thorac Oncol* 7 (2012), Sep, Nr. 9, S. 1382–1393. – URL <http://dx.doi.org/10.1097/JT0.0b013e318260e00d>
- [Guenebeaud u. a. 2010] GUENEBEAUD, Céline ; GOLDSCHNEIDER, David ; CASTETS, Marie ; GUIX, Catherine ; CHAZOT, Guillaume ; DELLOYE-BOURGEOIS, Céline ; EISENBERG-LERNER, Avital ; SHOHAT, Galit ; ZHANG, Mingjie ; LAUDET, Vincent ; KIMCHI, Adi ; BERNET, Agnès ; MEHLEN, Patrick: The dependence receptor UNC5H2/B triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase. In: *Mol Cell* 40 (2010), Dec, Nr. 6, S. 863–876. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.11.021>
- [Guo u. a. 2015] GUO, Sujuan ; LIANG, Yanping ; MURPHY, Susan F. ; HUANG, Angela ; SHEN, Haihong ; KELLY, Deborah F. ; SOBRADO, Pablo ; SHENG, Zhi: A rapid and high content assay that measures cyto-ID-stained autophagic compartments and estimates autophagy flux with potential clinical applications. In: *Autophagy* 11 (2015), Nr. 3, S. 560–572. – URL <http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2015.1017181>
- [Hahn und Weinberg 2002] HAHN, William C. ; WEINBERG, Robert A.: Modelling the molecular circuitry of cancer. In: *Nat Rev Cancer* 2 (2002), May, Nr. 5, S. 331–341. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrc795>
- [Hailey u. a. 2010] HAILEY, Dale W. ; RAMBOLD, Angelika S. ; SATPUTE-KRISHNAN, Prasanna ; MITRA, Kasturi ; SOUGRAT, Rachid ; KIM, Peter K. ; LIPPINCOTT-

- SCHWARTZ, Jennifer: Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. In: *Cell* 141 (2010), May, Nr. 4, S. 656–667. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.009>
- [Hamacher-Brady u. a. 2011] HAMACHER-BRADY, Anne ; STEIN, Henning A. ; TURSCHNER, Simon ; TOEGEL, Ina ; MORA, Rodrigo ; JENNEWEIN, Nina ; EFFERTH, Thomas ; EILS, Roland ; BRADY, Nathan R.: Artesunate activates mitochondrial apoptosis in breast cancer cells via iron-catalyzed lysosomal reactive oxygen species production. In: *J Biol Chem* 286 (2011), Feb, Nr. 8, S. 6587–6601. – URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.210047>
- [Hambardzumyan u. a. 2006] HAMBARDZUMYAN, Dolores ; SQUATRITO, Massimo ; SQUARTRO, Massimo ; HOLLAND, Eric C.: Radiation resistance and stem-like cells in brain tumors. In: *Cancer Cell* 10 (2006), Dec, Nr. 6, S. 454–456. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2006.11.008>
- [Han u. a. 2011] HAN, Sinsuk ; KOO, Jihye ; BAE, Jingyu ; KIM, Soochan ; BAIK, Song ; KIM, Mi-Yeon: Modulation of TNFSF expression in lymphoid tissue inducer cells by dendritic cells activated with Toll-like receptor ligands. In: *BMB Rep* 44 (2011), Feb, Nr. 2, S. 129–134. – URL <http://dx.doi.org/10.5483/BMBRep.2011.44.2.129>
- [Hartwell u. a. 1994] HARTWELL, L. ; WEINERT, T. ; KADYK, L. ; GARVIK, B.: Cell cycle checkpoints, genomic integrity, and cancer. In: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59 (1994), S. 259–263
- [Hayashi-Nishino u. a. 2009] HAYASHI-NISHINO, Mitsuko ; FUJITA, Naonobu ; NODA, Takeshi ; YAMAGUCHI, Akihito ; YOSHIMORI, Tamotsu ; YAMAMOTO, Akitugu: A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. In: *Nat Cell Biol* 11 (2009), Dec, Nr. 12, S. 1433–1437. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1991>

- [Hayflick 1965] HAYFLICK, L.: The Limited In Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. In: *Exp Cell Res* 37 (1965), Mar, S. 614–636
- [He u. a. 2009] HE, Xiaoqing ; KAN, Hong ; CAI, Lu ; MA, Qiang: Nrf2 is critical in defense against high glucose-induced oxidative damage in cardiomyocytes. In: *J Mol Cell Cardiol* 46 (2009), Jan, Nr. 1, S. 47–58. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.10.007>
- [Herbig u. a. 2006] HERBIG, Utz ; FERREIRA, Mark ; CONDEL, Laura ; CAREY, Dee ; SEDIVY, John M.: Cellular senescence in aging primates. In: *Science* 311 (2006), Mar, Nr. 5765, S. 1257. – URL <http://dx.doi.org/10.1126/science.1122446>
- [Herbig u. a. 2004] HERBIG, Utz ; JOBLING, Wendy A. ; CHEN, Benjamin P C. ; CHEN, David J. ; SEDIVY, John M.: Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). In: *Mol Cell* 14 (2004), May, Nr. 4, S. 501–513
- [Heylmann 2011] HEYLMANN: *Diplomarbeit*, Unimedizin Mainz, Diplomarbeit, 2011
- [Huber u. a. 2013] HUBER, Stephan M. ; BUTZ, Lena ; STEGEN, Benjamin ; KLUMPP, Dominik ; BRAUN, Norbert ; RUTH, Peter ; ECKERT, Franziska: Ionizing radiation, ion transports, and radioresistance of cancer cells. In: *Front Physiol* 4 (2013), S. 212. – URL <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2013.00212>
- [Ichimura u. a. 2000] ICHIMURA, Y. ; KIRISAKO, T. ; TAKAO, T. ; SATOMI, Y. ; SHIMONISHI, Y. ; ISHIHARA, N. ; MIZUSHIMA, N. ; TANIDA, I. ; KOMINAMI, E. ; OHSUMI, M. ; NODA, T. ; OHSUMI, Y.: A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. In: *Nature* 408 (2000), Nov, Nr. 6811, S. 488–492. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/35044114>
- [Itahana u. a. 2003] ITAHANA, Koji ; ZOU, Ying ; ITAHANA, Yoko ; MARTINEZ, Jose Luis ; BEAUSEJOUR, Christian ; JACOBS, Jacqueline J L. ; LOHUIZEN, Maarten V. ; BAND, Vimla ; CAMPISI, Judith ; DIMRI, Goberdhan P.: Control of the replicative

life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. In: *Mol Cell Biol* 23 (2003), Jan, Nr. 1, S. 389–401

[Jin und Klionsky 2014] JIN, Meiyang ; KLIONSKY, Daniel J.: Regulation of autophagy: modulation of the size and number of autophagosomes. In: *FEBS Lett* 588 (2014), Aug, Nr. 15, S. 2457–2463. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.06.015>

[Kaina u. a. 1991] KAINA, B. ; FRITZ, G. ; MITRA, S. ; COQUERELLE, T.: Transfection and expression of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) cDNA in Chinese hamster cells: the role of MGMT in protection against the genotoxic effects of alkylating agents. In: *Carcinogenesis* 12 (1991), Oct, Nr. 10, S. 1857–1867

[Kaina u. a. 1997] KAINA, B. ; ZIOUTA, A. ; OCHS, K. ; COQUERELLE, T.: Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex-, Mex+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models. In: *Mutat Res* 381 (1997), Nov, Nr. 2, S. 227–241

[Kamchonwongpaisan u. a. 1994] KAMCHONWONGPAISAN, S. ; CHANDRA-NGAM, G. ; AVERY, M. A. ; YUTHAVONG, Y.: Resistance to artemisinin of malaria parasites (*Plasmodium falciparum*) infecting alpha-thalassemic erythrocytes in vitro. Competition in drug accumulation with uninfected erythrocytes. In: *J Clin Invest* 93 (1994), Feb, Nr. 2, S. 467–473. – URL <http://dx.doi.org/10.1172/JCI116994>

[Kanzawa u. a. 2004] KANZAWA, T. ; GERMANO, I. M. ; KOMATA, T. ; ITO, H. ; KONDO, Y. ; KONDO, S.: Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. In: *Cell Death Differ* 11 (2004), Apr, Nr. 4, S. 448–457. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4401359>

[Karran und Bignami 1994] KARRAN, P. ; BIGNAMI, M.: DNA damage tolerance, mismatch repair and genome instability. In: *Bioessays* 16 (1994), Nov, Nr. 11, S. 833–839. – URL <http://dx.doi.org/10.1002/bies.950161110>

- [Kerr u. a. 1972] KERR, J. F. ; WYLLIE, A. H. ; CURRIE, A. R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. In: *Br J Cancer* 26 (1972), Aug, Nr. 4, S. 239–257
- [Kimura u. a. 2008] KIMURA, Shunsuke ; NODA, Takeshi ; YOSHIMORI, Tamotsu: Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. In: *Cell Struct Funct* 33 (2008), Nr. 1, S. 109–122
- [Kischkel u. a. 1995] KISCHKEL, F. C. ; HELLBARDT, S. ; BEHRMANN, I. ; GERMER, M. ; PAWLITA, M. ; KRAMMER, P. H. ; PETER, M. E.: Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. In: *EMBO J* 14 (1995), Nov, Nr. 22, S. 5579–5588
- [Klayman 1985] KLAYMAN, D L.: Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. In: *Science* 228 (1985), May, S. 1049–1055
- [Klionsky und Emr 2000] KLIONSKY, D. J. ; EMR, S. D.: Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. In: *Science* 290 (2000), Dec, Nr. 5497, S. 1717–1721
- [Klionsky 2007] KLIONSKY, Daniel J.: Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (2007), Nov, Nr. 11, S. 931–937. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2245>
- [Klionsky u. a. 2014] KLIONSKY, Daniel J. ; ESKELINEN, Eeva-Liisa ; DERETIC, Vojo: Autophagosomes, phagosomes, autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes... wait, I'm confused. In: *Autophagy* 10 (2014), Apr, Nr. 4, S. 549–551. – URL <http://dx.doi.org/10.4161/auto.28448>
- [Knizhnik u. a. 2013] KNIZHNIK, Anna V. ; ROOS, Wynand P. ; NIKOLOVA, Teodora ; QUIROS, Steve ; TOMASZOWSKI, Karl-Heinz ; CHRISTMANN, Markus ; KAINA, Bernd: Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-

induced DNA damage. In: *PLoS One* 8 (2013), Nr. 1, S. e55665. – URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0055665>

[Kroemer u. a. 2009] KROEMER, G. ; GALLUZZI, L. ; VANDENABEELE, P. ; ABRAMS, J. ; ALNEMRI, E. S. ; BAEHRECKE, E. H. ; BLAGOSKLONNY, M. V. ; EL-DEIRY, W. S. ; GOLSTEIN, P. ; GREEN, D. R. ; HENGARTNER, M. ; KNIGHT, R. A. ; KUMAR, S. ; LIPTON, S. A. ; MALORNI, W. ; NUÑEZ, G. ; PETER, M. E. ; TSCHOPP, J. ; YUAN, J. ; PIACENTINI, M. ; ZHIVOTOVSKY, B. ; MELINO, G. ; CELL DEATH 2009, Nomenclature C. on: Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. In: *Cell Death Differ* 16 (2009), Jan, Nr. 1, S. 3–11

[Kroemer u. a. 2007] KROEMER, Guido ; GALLUZZI, Lorenzo ; BRENNER, Catherine: Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. In: *Physiol Rev* 87 (2007), Jan, Nr. 1, S. 99–163. – URL <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>

[Kroemer und Jäättelä 2005] KROEMER, Guido ; JÄÄTTELÄ, Marja: Lysosomes and autophagy in cell death control. In: *Nat Rev Cancer* 5 (2005), Nov, Nr. 11, S. 886–897. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1738>

[Krungkrai und Yuthavong 1987] KRUNGKRAI, S. R. ; YUTHAVONG, Y.: The antimalarial action on *Plasmodium falciparum* of qinghaosu and artesunate in combination with agents which modulate oxidant stress. In: *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81 (1987), Nr. 5, S. 710–714

[Kuilman u. a. 2010] KUILMAN, Thomas ; MICHALOGLOU, Chrysiis ; MOOI, Wolter J. ; PEEPER, Daniel S.: The essence of senescence. In: *Genes Dev* 24 (2010), Nov, Nr. 22, S. 2463–2479. – URL <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1971610>

[Kumar u. a. 2011] KUMAR, Ashok ; SRIVASTAVA, Kumkum ; KUMAR, S. R. ; SIDDIQI, M. I. ; PURI, Sunil K. ; SEXANA, Jitendra K. ; CHAUHAN, Prem M S.: 4-anilinoquinoline triazines: a novel class of hybrid antimalarial agents.

-
- In: *Eur J Med Chem* 46 (2011), Feb, Nr. 2, S. 676–690. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.12.003>
- [Köchler u. a. 2006] KÖCHLER, Robert ; HU, Xiao W. ; CHAN, Edmond Y W. ; TOOZE, Sharon A.: Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. In: *Traffic* 7 (2006), Feb, Nr. 2, S. 129–145. – URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00368.x>
- [Laemmli 1970] LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), Aug, Nr. 5259, S. 680–685
- [Lee u. a. 2012] LEE, Hong J. ; BURGER, Petra ; VOGEL, Marianne ; FRIESE, Klaus ; BRÜNING, Ansgar: The nucleoside antagonist cordycepin causes DNA double strand breaks in breast cancer cells. In: *Invest New Drugs* 30 (2012), Oct, Nr. 5, S. 1917–1925. – URL <http://dx.doi.org/10.1007/s10637-012-9859-x>
- [Leonardo u. a. 1994] LEONARDO, A. D. ; LINKE, S. P. ; CLARKIN, K. ; WAHL, G. M.: DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. In: *Genes Dev* 8 (1994), Nov, Nr. 21, S. 2540–2551
- [Li und Modrich 1995] LI, G. M. ; MODRICH, P.: Restoration of mismatch repair to nuclear extracts of H6 colorectal tumor cells by a heterodimer of human MutL homologs. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995), Mar, Nr. 6, S. 1950–1954
- [Li u. a. 1998] LI, H. ; ZHU, H. ; XU, C. J. ; YUAN, J.: Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. In: *Cell* 94 (1998), Aug, Nr. 4, S. 491–501
- [Li u. a. 1997] LI, P. ; NIJHAWAN, D. ; BUDIHardjo, I. ; SRINIVASULA, S. M. ; AHMAD, M. ; ALNEMRI, E. S. ; WANG, X.: Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. In: *Cell* 91 (1997), Nov, Nr. 4, S. 479–489

- [Li u.a. 2008] LI, Paul C H. ; LAM, Elena ; ROOS, Wynand P. ; ZDZIENICKA, Malgorzata Z. ; KAINA, Bernd ; EFFERTH, Thomas: Artesunate derived from traditional Chinese medicine induces DNA damage and repair. In: *Cancer Res* 68 (2008), Jun, Nr. 11, S. 4347–4351. – URL <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2970>
- [Longley u.a. 1997] LONGLEY, M. J. ; PIERCE, A. J. ; MODRICH, P.: DNA polymerase delta is required for human mismatch repair in vitro. In: *J Biol Chem* 272 (1997), Apr, Nr. 16, S. 10917–10921
- [Lord und Ashworth 2012] LORD, Christopher J. ; ASHWORTH, Alan: The DNA damage response and cancer therapy. In: *Nature* 481 (2012), Jan, Nr. 7381, S. 287–294. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/nature10760>
- [Lowe u.a. 2004] LOWE, Scott W. ; CEPERO, Enrique ; EVAN, Gerard: Intrinsic tumour suppression. In: *Nature* 432 (2004), Nov, Nr. 7015, S. 307–315. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/nature03098>
- [LOWRY u.a. 1951] LOWRY, O. H. ; ROSEBROUGH, N. J. ; FARR, A. L. ; RANDALL, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. In: *J Biol Chem* 193 (1951), Nov, Nr. 1, S. 265–275
- [Lum u.a. 2005] LUM, Julian J. ; BAUER, Daniel E. ; KONG, Mei ; HARRIS, Marian H. ; LI, Chi ; LINDSTEN, Tullia ; THOMPSON, Craig B.: Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. In: *Cell* 120 (2005), Jan, Nr. 2, S. 237–248. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.046>
- [MacIsaac u.a. 2006] MACISAAC, Kenzie D. ; WANG, Ting ; GORDON, D. B. ; GIFFORD, David K. ; STORMO, Gary D. ; FRAENKEL, Ernest: An improved map of conserved regulatory sites for *Saccharomyces cerevisiae*. In: *BMC Bioinformatics* 7 (2006), S. 113. – URL <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-7-113>

- [Mahaney u. a. 2009] MAHANEY, Brandi L. ; MEEK, Katheryn ; LEES-MILLER, Susan P.: Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. In: *Biochem J* 417 (2009), Feb, Nr. 3, S. 639–650. – URL <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20080413>
- [Maiuri u. a. 2007] MAIURI, M. C. ; ZALCKVAR, Einat ; KIMCHI, Adi ; KROEMER, Guido: Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (2007), Sep, Nr. 9, S. 741–752. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2239>
- [Marciniak u. a. 2004] MARCINIAK, Stefan J. ; YUN, Chi Y. ; OYADOMARI, Seiichi ; NOVOA, Isabel ; ZHANG, Yuhong ; JUNGREIS, Rivka ; NAGATA, Kazuhiro ; HARDING, Heather P. ; RON, David: CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. In: *Genes Dev* 18 (2004), Dec, Nr. 24, S. 3066–3077. – URL <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1250704>
- [Martinet u. a. 2006] MARTINET, Wim ; MEYER, Guido R Y D. ; ANDRIES, Luc ; HERMAN, Arnold G. ; KOCKX, Mark M.: Detection of autophagy in tissue by standard immunohistochemistry: possibilities and limitations. In: *Autophagy* 2 (2006), Nr. 1, S. 55–57
- [Mathew u. a. 2007] MATHEW, Robin ; KARANTZA-WADSWORTH, Vassiliki ; WHITE, Eileen: Role of autophagy in cancer. In: *Nat Rev Cancer* 7 (2007), Dec, Nr. 12, S. 961–967. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2254>
- [Matos u. a. 2015] MATOS, Liliana ; GOUVEIA, Alexandra M. ; ALMEIDA, Henrique: ER Stress Response in Human Cellular Models of Senescence. In: *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 70 (2015), Aug, Nr. 8, S. 924–935. – URL <http://dx.doi.org/10.1093/gerona/glu129>
- [Mehlen und Bredezen 2011] MEHLEN, Patrick ; BREDESEN, Dale E.: Dependence receptors: from basic research to drug development. In: *Sci Signal* 4 (2011), Nr. 157, S. mr2. – URL <http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.2001521>

- [Michaloglou u. a. 2005] MICHALOGLOU, Chrysiis ; VREDEVELD, Liesbeth C W. ; SOENGAS, Maria S. ; DENOYELLE, Christophe ; KUILMAN, Thomas ; HORST, Chantal M A M. van der ; MAJOOR, Donné M. ; SHAY, Jerry W. ; MOOI, Wolter J. ; PEEPER, Daniel S.: BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. In: *Nature* 436 (2005), Aug, Nr. 7051, S. 720–724. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/nature03890>
- [Micheau und Tschopp 2003] MICHEAU, Olivier ; TSCHOPP, Jürg: Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. In: *Cell* 114 (2003), Jul, Nr. 2, S. 181–190
- [Mizushima u. a. 1998] MIZUSHIMA, N. ; NODA, T. ; YOSHIMORI, T. ; TANAKA, Y. ; ISHII, T. ; GEORGE, M. D. ; KLIONSKY, D. J. ; OHSUMI, M. ; OHSUMI, Y.: A protein conjugation system essential for autophagy. In: *Nature* 395 (1998), Sep, Nr. 6700, S. 395–398. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/26506>
- [Mizushima 2007] MIZUSHIMA, Noboru: Autophagy: process and function. In: *Genes Dev* 21 (2007), Nov, Nr. 22, S. 2861–2873. – URL <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1599207>
- [Mojas u. a. 2007] MOJAS, Nina ; LOPES, Massimo ; JIRICNY, Josef: Mismatch repair-dependent processing of methylation damage gives rise to persistent single-stranded gaps in newly replicated DNA. In: *Genes Dev* 21 (2007), Dec, Nr. 24, S. 3342–3355. – URL <http://dx.doi.org/10.1101/gad.455407>
- [Moody und Wheelhouse 2014] MOODY, Catherine L. ; WHEELHOUSE, Richard T.: The medicinal chemistry of imidazotetrazine prodrugs. In: *Pharmaceuticals (Basel)* 7 (2014), Nr. 7, S. 797–838. – URL <http://dx.doi.org/10.3390/ph7070797>
- [Muzio u. a. 1996] MUZIO, M. ; CHINNAIYAN, A. M. ; KISCHKEL, F. C. ; O’ROURKE, K. ; SHEVCHENKO, A. ; NI, J. ; SCAFFIDI, C. ; BRETZ, J. D. ; ZHANG, M. ; GENTZ, R. ; MANN, M. ; KRAMMER, P. H. ; PETER, M. E. ; DIXIT, V. M.: FLICE, a novel

- FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. In: *Cell* 85 (1996), Jun, Nr. 6, S. 817–827
- [Nardella u. a. 2011] NARDELLA, Caterina ; CLOHESSY, John G. ; ALIMONTI, Andrea ; PANDOLFI, Pier P.: Pro-senescence therapy for cancer treatment. In: *Nat Rev Cancer* 11 (2011), Jul, Nr. 7, S. 503–511. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3057>
- [Nazio und Cecconi 2013] NAZIO, Francesca ; CECCONI, Francesco: mTOR, AMBRA1, and autophagy: an intricate relationship. In: *Cell Cycle* 12 (2013), Aug, Nr. 16, S. 2524–2525. – URL <http://dx.doi.org/10.4161/cc.25835>
- [Newlands u. a. 1997] NEWLANDS, E. S. ; STEVENS, M. F. ; WEDGE, S. R. ; WHEELHOUSE, R. T. ; BROCK, C.: Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. In: *Cancer Treat Rev* 23 (1997), Jan, Nr. 1, S. 35–61
- [Nezis u. a. 2010] NEZIS, Ioannis P. ; SHRAVAGE, Bhupendra V. ; SAGONA, Antonia P. ; JOHANSEN, Terje ; BAEHRECKE, Eric H. ; STENMARK, Harald: Autophagy as a trigger for cell death: autophagic degradation of inhibitor of apoptosis dBruce controls DNA fragmentation during late oogenesis in *Drosophila*. In: *Autophagy* 6 (2010), Nov, Nr. 8, S. 1214–1215
- [Ochs und Kaina 2000] OCHS, K. ; KAINA, B.: Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent. In: *Cancer Res* 60 (2000), Oct, Nr. 20, S. 5815–5824
- [Ohgaki u. a. 2004] OHGAKI, Hiroko ; DESSEN, Pierre ; JOURDE, Benjamin ; HORSTMANN, Sonja ; NISHIKAWA, Tomofumi ; PATRE, Pier-Luigi D. ; BURKHARD, Christoph ; SCHÜLER, Danielle ; PROBST-HENSCH, Nicole M. ; MAIORKA, Paulo C. ; BAEZA, Nathalie ; PISANI, Paola ; YONEKAWA, Yasuhiro ; YASARGIL, M. G. ; LÜTOLF, Urs M. ; KLEIHUES, Paul: Genetic pathways to glioblastoma: a population-

- based study. In: *Cancer Res* 64 (2004), Oct, Nr. 19, S. 6892–6899. – URL <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1337>
- [Olliaro u. a. 2001] OLLIARO, P. L. ; HAYNES, R. K. ; MEUNIER, B. ; YUTHAVONG, Y.: Possible modes of action of the artemisinin-type compounds. In: *Trends Parasitol* 17 (2001), Mar, Nr. 3, S. 122–126
- [Omuro u. a. 2013] OMURO, Antonio ; CHAN, Timothy A. ; ABREY, Lauren E. ; KHASRAW, Mustafa ; REINER, Anne S. ; KALEY, Thomas J. ; DEANGELIS, Lisa M. ; LASSMAN, Andrew B. ; NOLAN, Craig P. ; GAVRILOVIC, Igor T. ; HORMIGO, Adilia ; SALVANT, Cynthia ; HEGUY, Adriana ; KAUFMAN, Andrew ; HUSE, Jason T. ; PANAGEAS, Katherine S. ; HOTTINGER, Andreas F. ; MELLINGHOFF, Ingo: Phase II trial of continuous low-dose temozolomide for patients with recurrent malignant glioma. In: *Neuro Oncol* 15 (2013), Feb, Nr. 2, S. 242–250. – URL <http://dx.doi.org/10.1093/neuonc/nos295>
- [Ostermann u. a. 2004] OSTERMANN, Sandrine ; CSAJKA, Chantal ; BUCLIN, Thierry ; LEYVRAZ, Serge ; LEJEUNE, Ferdy ; DECOSTERD, Laurent A. ; STUPP, Roger: Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients. In: *Clin Cancer Res* 10 (2004), Jun, Nr. 11, S. 3728–3736. – URL <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0807>
- [Palumbo u. a. 2012] PALUMBO, Silvia ; PIRTOLI, Luigi ; TINI, Paolo ; CEVENINI, Gabriele ; CALDERARO, Francesco ; TOSCANO, Marzia ; MIRACCO, Clelia ; COMINCINI, Sergio: Different involvement of autophagy in human malignant glioma cell lines undergoing irradiation and temozolomide combined treatments. In: *J Cell Biochem* 113 (2012), Jul, Nr. 7, S. 2308–2318. – URL <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.24102>
- [Pandit und Gartel 2011] PANDIT, Bulbul ; GARTEL, Andrei L.: FoxM1 knock-down sensitizes human cancer cells to proteasome inhibitor-induced apoptosis but not to autophagy. In: *Cell Cycle* 10 (2011), Oct, Nr. 19, S. 3269–3273. – URL <http://dx.doi.org/10.4161/cc.10.19.17735>

- [Patel u. a. 2013] PATEL, Avignat S. ; MORSE, Danielle ; CHOI, Augustine M K.: Regulation and functional significance of autophagy in respiratory cell biology and disease. In: *Am J Respir Cell Mol Biol* 48 (2013), Jan, Nr. 1, S. 1–9. – URL <http://dx.doi.org/10.1165/rcmb.2012-0282TR>
- [Polager u. a. 2008] POLAGER, S. ; OFIR, M. ; GINSBERG, D.: E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. In: *Oncogene* 27 (2008), Aug, Nr. 35, S. 4860–4864. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2008.117>
- [Porter u. a. 2013] PORTER, Kristine ; NALLATHAMBI, Jeyabalan ; LIN, Yizhi ; LITON, Paloma B.: Lysosomal basification and decreased autophagic flux in oxidatively stressed trabecular meshwork cells: implications for glaucoma pathogenesis. In: *Autophagy* 9 (2013), Apr, Nr. 4, S. 581–594. – URL <http://dx.doi.org/10.4161/auto.23568>
- [Preuss u. a. 1996] PREUSS, I. ; HAAS, S. ; EICHHORN, U. ; EBERHAGEN, I. ; KAUFMANN, M. ; BECK, T. ; EIBL, R. H. ; DALL, P. ; BAUKNECHT, T. ; HENGSTLER, J. ; WITTIG, B. M. ; DIPPOLD, W. ; KAINA, B.: Activity of the DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human tumor and corresponding normal tissue. In: *Cancer Detect Prev* 20 (1996), Nr. 2, S. 130–136
- [Preusser u. a. 2011] PREUSSER, Matthias ; RIBAUPIERRE, Sandrine de ; WÖHRER, Adelheid ; ERRIDGE, Sara C. ; HEGI, Monika ; WELLER, Michael ; STUPP, Roger: Current concepts and management of glioblastoma. In: *Ann Neurol* 70 (2011), Jul, Nr. 1, S. 9–21. – URL <http://dx.doi.org/10.1002/ana.22425>
- [Quiros u. a. 2010] QUIROS, Steve ; ROOS, Wynand P. ; KAINA, Bernd: Processing of O6-methylguanine into DNA double-strand breaks requires two rounds of replication whereas apoptosis is also induced in subsequent cell cycles. In: *Cell Cycle* 9 (2010), Jan, Nr. 1, S. 168–178
- [Ramirez u. a. 2013] RAMIREZ, Yulian P. ; WEATHERBEE, Jessica L. ; WHEELHOUSE, Richard T. ; ROSS, Alonzo H.: Glioblastoma multiforme therapy and mechanisms

- of resistance. In: *Pharmaceuticals (Basel)* 6 (2013), Nr. 12, S. 1475–1506. – URL <http://dx.doi.org/10.3390/ph6121475>
- [Ravikumar u. a. 2010] RAVIKUMAR, Brinda ; MOREAU, Kevin ; JAHREISS, Luca ; PURI, Claudia ; RUBINSZTEIN, David C.: Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. In: *Nat Cell Biol* 12 (2010), Aug, Nr. 8, S. 747–757. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2078>
- [Robles und Adami 1998] ROBLES, S. J. ; ADAMI, G. R.: Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. In: *Oncogene* 16 (1998), Mar, Nr. 9, S. 1113–1123. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1201862>
- [Rodrigues u. a. 2013] RODRIGUES, George ; ZINDLER, Jaap ; WARNER, Andrew ; LAGERWAARD, Frank: Recursive partitioning analysis for the prediction of stereotactic radiosurgery brain metastases lesion control. In: *Oncologist* 18 (2013), Nr. 3, S. 330–335. – URL <http://dx.doi.org/10.1634/theoncologist.2012-0316>
- [Rodriguez-Rocha u. a. 2011] RODRIGUEZ-ROCHA, Humberto ; GARCIA-GARCIA, Aracely ; PANAYIOTIDIS, Mihalis I. ; FRANCO, Rodrigo: DNA damage and autophagy. In: *Mutat Res* 711 (2011), Jun, Nr. 1-2, S. 158–166. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.03.007>
- [Roos u. a. 2007] ROOS, W. P. ; BATISTA, L. F. Z. ; NAUMANN, S. C. ; WICK, W. ; WELLER, M. ; MENCK, C. F. M. ; KAINA, B.: Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. In: *Oncogene* 26 (2007), Jan, Nr. 2, S. 186–197. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1209785>
- [Roos und Kaina 2013] ROOS, Wynand P. ; KAINA, Bernd: DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. In: *Cancer Lett* 332 (2013), May, Nr. 2, S. 237–248. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.007>

- [Rothkamm u. a. 2003] ROTHKAMM, Kai ; KRÜGER, Ines ; THOMPSON, Larry H. ; LÖBRICH, Markus: Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. In: *Mol Cell Biol* 23 (2003), Aug, Nr. 16, S. 5706–5715
- [Rothkamm und Löbrich 2003] ROTHKAMM, Kai ; LÖBRICH, Markus: Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003), Apr, Nr. 9, S. 5057–5062. – URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0830918100>
- [Rusten und Stenmark 2010] RUSTEN, Tor E. ; STENMARK, Harald: p62, an autophagy hero or culprit? In: *Nat Cell Biol* 12 (2010), Mar, Nr. 3, S. 207–209. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/ncb0310-207>
- [Sa und Das 2008] SA, Gaurisankar ; DAS, Tanya: Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death. In: *Cell Div* 3 (2008), S. 14. – URL <http://dx.doi.org/10.1186/1747-1028-3-14>
- [Saffhill u. a. 1985] SAFFHILL, R. ; MARGISON, G. P. ; O'CONNOR, P. J.: Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agents. In: *Biochim Biophys Acta* 823 (1985), Dec, Nr. 2, S. 111–145
- [Schütze u. a. 2008] SCHÜTZE, Stefan ; TCHIKOV, Vladimir ; SCHNEIDERBRACHERT, Wulf: Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (2008), Aug, Nr. 8, S. 655–662. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2430>
- [Serrano u. a. 1997] SERRANO, M. ; LIN, A. W. ; MCCURRACH, M. E. ; BEACH, D. ; LOWE, S. W.: Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. In: *Cell* 88 (1997), Mar, Nr. 5, S. 593–602
- [Shay und Roninson 2004] SHAY, Jerry W. ; RONINSON, Igor B.: Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. In: *Oncogene* 23 (2004), Apr, Nr. 16, S. 2919–2933. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1207518>

- [Sherr 1996] SHERR, C. J.: Cancer cell cycles. In: *Science* 274 (1996), Dec, Nr. 5293, S. 1672–1677
- [Shrivastav u. a. 2008] SHRIVASTAV, Meena ; HARO, Leyma P D. ; NICKOLOFF, Jac A.: Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. In: *Cell Res* 18 (2008), Jan, Nr. 1, S. 134–147. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2007.111>
- [Smith und Jackson 1999] SMITH, G. C. ; JACKSON, S. P.: The DNA-dependent protein kinase. In: *Genes Dev* 13 (1999), Apr, Nr. 8, S. 916–934
- [Srinivasula u. a. 2003] SRINIVASULA, Srinivasa M. ; GUPTA, Sanjeev ; DATTA, Pina-ki ; ZHANG, ZhiJia ; HEGDE, Ramesh ; CHEONG, NaEun ; FERNANDES-ALNEMRI, Teresa ; ALNEMRI, Emad S.: Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2. In: *J Biol Chem* 278 (2003), Aug, Nr. 34, S. 31469–31472. – URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C300240200>
- [Steinbach u. a. 2003] STEINBACH, J. P. ; WOLBURG, H. ; KLUMPP, A. ; PROBST, H. ; WELLER, M.: Hypoxia-induced cell death in human malignant glioma cells: energy deprivation promotes decoupling of mitochondrial cytochrome c release from caspase processing and necrotic cell death. In: *Cell Death Differ* 10 (2003), Jul, Nr. 7, S. 823–832. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4401252>
- [Stojic u. a. 2004] STOJIC, Lovorka ; BRUN, Richard ; JIRICNY, Josef: Mismatch repair and DNA damage signalling. In: *DNA Repair (Amst)* 3 (2004), Nr. 8-9, S. 1091–1101. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.06.006>
- [Stucki u. a. 1998] STUCKI, M. ; PASCUCCI, B. ; PARLANTI, E. ; FORTINI, P. ; WILSON, S. H. ; HÜBSCHER, U. ; DOGLIOTTI, E.: Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. In: *Oncogene* 17 (1998), Aug, Nr. 7, S. 835–843. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1202001>

- [Stupp und Newlands 2001] STUPP, R. ; NEWLANDS, E.: New approaches for temozolomide therapy: use in newly diagnosed glioma. In: *Semin Oncol* 28 (2001), Aug, Nr. 4 Suppl 13, S. 19–23
- [Stupp u. a. 2005] STUPP, Roger ; MASON, Warren P. ; BENT, Martin J. van den ; WELLER, Michael ; FISHER, Barbara ; TAPHOORN, Martin J B. ; BELANGER, Karl ; BRANDES, Alba A. ; MAROSI, Christine ; BOGDAHN, Ulrich ; CURSCHMANN, Jürgen ; JANZER, Robert C. ; LUDWIN, Samuel K. ; GORLIA, Thierry ; ALLGEIER, Anouk ; LACOMBE, Denis ; CAIRNCROSS, J. G. ; EISENHAEUER, Elizabeth ; MIRIMANOFF, René O. ; RESEARCH, European O. for ; CANCER BRAIN TUMOR, Treatment of ; GROUPS, Radiotherapy ; CANADA CLINICAL TRIALS GROUP, National Cancer I. of: Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. In: *N Engl J Med* 352 (2005), Mar, Nr. 10, S. 987–996
- [Stupp u. a. 2009] STUPP, Roger ; MAYER, Michael ; KANN, Roger ; WEDER, Walter ; ZOUHAIR, Abderahim ; BETTICHER, Daniel C. ; ROTH, Arnaud D. ; STAHEL, Rolf A. ; MAJNO, Sabine B. ; PETERS, Solange ; JOST, Lorenz ; FURRER, Markus ; THIERSTEIN, Sandra ; SCHMID, Ralph A. ; HSU-SCHMITZ, Shu-Fang ; MIRIMANOFF, René-Olivier ; RIS, Hans-Beat ; PLESS, Miklos: Neoadjuvant chemotherapy and radiotherapy followed by surgery in selected patients with stage IIIB non-small-cell lung cancer: a multicentre phase II trial. In: *Lancet Oncol* 10 (2009), Aug, Nr. 8, S. 785–793. – URL [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70172-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70172-X)
- [Tanida u. a. 2004] TANIDA, Isei ; UENO, Takashi ; KOMINAMI, Eiki: LC3 conjugation system in mammalian autophagy. In: *Int J Biochem Cell Biol* 36 (2004), Dec, Nr. 12, S. 2503–2518. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2004.05.009>
- [Tolkovsky 2009] TOLKOVSKY, Aviva M.: Mitophagy. In: *Biochim Biophys Acta* 1793 (2009), Sep, Nr. 9, S. 1508–1515. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.03.002>
- [Tomkinson u. a. 2001] TOMKINSON, A. E. ; CHEN, L. ; DONG, Z. ; LEPPARD, J. B. ;

- LEVIN, D. S. ; MACKEY, Z. B. ; MOTYCKA, T. A.: Completion of base excision repair by mammalian DNA ligases. In: *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68 (2001), S. 151–164
- [Toorchen und Topal 1983] TOORCHEN, D. ; TOPAL, M. D.: Mechanisms of chemical mutagenesis and carcinogenesis: effects on DNA replication of methylation at the O6-guanine position of dGTP. In: *Carcinogenesis* 4 (1983), Dec, Nr. 12, S. 1591–1597
- [Umar u. a. 1994] UMAR, A. ; BOYER, J. C. ; THOMAS, D. C. ; NGUYEN, D. C. ; RISINGER, J. I. ; BOYD, J. ; IONOV, Y. ; PERUCHO, M. ; KUNKEL, T. A.: Defective mismatch repair in extracts of colorectal and endometrial cancer cell lines exhibiting microsatellite instability. In: *J Biol Chem* 269 (1994), May, Nr. 20, S. 14367–14370
- [Vandenabeele u. a. 2010] VANDENABEELE, Peter ; GALLUZZI, Lorenzo ; BERGHE, Tom V. ; KROEMER, Guido: Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 11 (2010), Oct, Nr. 10, S. 700–714. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2970>
- [Vermes u. a. 1995] VERMES, I. ; HAANEN, C. ; STEFFENS-NAKKEN, H. ; REUTELINGSPERGER, C.: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. In: *J Immunol Methods* 184 (1995), Jul, Nr. 1, S. 39–51
- [Verrier u. a. 2003] VERRIER, Florence ; MIGNOTTE, Bernard ; JAN, Gwenaël ; BRENNER, Catherine: Study of PTPC composition during apoptosis for identification of viral protein target. In: *Ann N Y Acad Sci* 1010 (2003), Dec, S. 126–142
- [Villano u. a. 2009] VILLANO, J. L. ; SEERY, Tara E. ; BRESSLER, Linda R.: Temozolomide in malignant gliomas: current use and future targets. In: *Cancer Chemother Pharmacol* 64 (2009), Sep, Nr. 4, S. 647–655. – URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00280-009-1050-5>

- [Visvader und Lindeman 2008] VISVADER, Jane E. ; LINDEMAN, Geoffrey J.: Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. In: *Nat Rev Cancer* 8 (2008), Oct, Nr. 10, S. 755–768. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2499>
- [Vizioli u. a. 2011] VIZIOLI, Maria G. ; POSSIK, Patricia A. ; TARANTINO, Eva ; MEISSL, Katrin ; BORRELLO, Maria G. ; MIRANDA, Claudia ; ANANIA, Maria C. ; PAGLIARDINI, Sonia ; SEREGNI, Ettore ; PIEROTTI, Marco A. ; PILOTTI, Silvana ; PEEPER, Daniel S. ; GRECO, Angela: Evidence of oncogene-induced senescence in thyroid carcinogenesis. In: *Endocr Relat Cancer* 18 (2011), Dec, Nr. 6, S. 743–757. – URL <http://dx.doi.org/10.1530/ERC-11-0240>
- [Vos u. a. 2012] VOS, Mike D. ; SCHREIBER, Valérie ; DANTZER, Françoise: The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art. In: *Biochem Pharmacol* 84 (2012), Jul, Nr. 2, S. 137–146. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.03.018>
- [Wajant 2002] WAJANT, Harald: The Fas signaling pathway: more than a paradigm. In: *Science* 296 (2002), May, Nr. 5573, S. 1635–1636. – URL <http://dx.doi.org/10.1126/science.1071553>
- [Wang u. a. 2007] WANG, Jing ; GUO, Li-Ping ; CHEN, Li-Zhen ; ZENG, Yi-Xin ; LU, Shih H.: Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line. In: *Cancer Res* 67 (2007), Apr, Nr. 8, S. 3716–3724. – URL <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4343>
- [White 2008] WHITE, N. J.: Qinghaosu (artemisinin): the price of success. In: *Science* 320 (2008), Apr, Nr. 5874, S. 330–334. – URL <http://dx.doi.org/10.1126/science.1155165>
- [Wilson und Barsky 2001] WILSON, D. M. ; BARSKY, D.: The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. In: *Mutat Res* 485 (2001), May, Nr. 4, S. 283–307

- [Woodhouse u. a. 2008] WOODHOUSE, Bethany C. ; DIANOVA, Irina I. ; PARSONS, Jason L. ; DIANOV, Grigory L.: Poly(ADP-ribose) polymerase-1 modulates DNA repair capacity and prevents formation of DNA double strand breaks. In: *DNA Repair (Amst)* 7 (2008), Jun, Nr. 6, S. 932–940. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.03.017>
- [Wu und Hu 2010] WU, P. ; HU, Y-Z.: PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in cancer: a perspective on clinical progress. In: *Curr Med Chem* 17 (2010), Nr. 35, S. 4326–4341
- [Yang u. a. 2014] YANG, Nai-Di ; TAN, Shi-Hao ; NG, Shukie ; SHI, Yin ; ZHOU, Jing ; TAN, Kevin Shyong W. ; WONG, Wai-Shiu F. ; SHEN, Han-Ming: Artesunate induces cell death in human cancer cells via enhancing lysosomal function and lysosomal degradation of ferritin. In: *J Biol Chem* 289 (2014), Nov, Nr. 48, S. 33425–33441. – URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.564567>
- [Yang u. a. 2003] YANG, Qi-Heng ; CHURCH-HAJDUK, Robin ; REN, Jinyu ; NEWTON, Michelle L. ; DU, Chunying: Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. In: *Genes Dev* 17 (2003), Jun, Nr. 12, S. 1487–1496. – URL <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1097903>
- [Yang und Klionsky 2010] YANG, Zhifen ; KLIONSKY, Daniel J.: Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. In: *Curr Opin Cell Biol* 22 (2010), Apr, Nr. 2, S. 124–131. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2009.11.014>
- [Yin u. a. 2014] YIN, Haitao ; ZHOU, Yun ; WEN, Cuixia ; ZHOU, Chong ; ZHANG, Wei ; HU, Xiang ; WANG, Lifeng ; YOU, Chuanwen ; SHAO, Junfei: Curcumin sensitizes glioblastoma to temozolomide by simultaneously generating ROS and disrupting AKT/mTOR signaling. In: *Oncol Rep* 32 (2014), Oct, Nr. 4, S. 1610–1616. – URL <http://dx.doi.org/10.3892/or.2014.3342>

- [Yin u. a. 1999] YIN, X. M. ; WANG, K. ; GROSS, A. ; ZHAO, Y. ; ZINKEL, S. ; KLOCKE, B. ; ROTH, K. A. ; KORSMEYER, S. J.: Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. In: *Nature* 400 (1999), Aug, Nr. 6747, S. 886–891. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/23730>
- [Ylä-Anttila u. a. 2009] YLÄ-ANTTILA, Päivi ; VIHINEN, Helena ; JOKITALO, Eija ; ESKELINEN, Eeva-Liisa: 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. In: *Autophagy* 5 (2009), Nov, Nr. 8, S. 1180–1185
- [Young u. a. 2006] YOUNG, Andrew R J. ; CHAN, Edmond Y W. ; HU, Xiao W. ; KÖCHL, Robert ; CRAWSHAW, Samuel G. ; HIGH, Stephen ; HAILEY, Dale W. ; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, Jennifer ; TOOZE, Sharon A.: Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. In: *J Cell Sci* 119 (2006), Sep, Nr. Pt 18, S. 3888–3900. – URL <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.03172>
- [Zhou u. a. 2013] ZHOU, Jing ; TAN, Shi-Hao ; NICOLAS, Valérie ; BAUVY, Chantal ; YANG, Nai-Di ; ZHANG, Jianbin ; XUE, Yuan ; CODOGNO, Patrice ; SHEN, Han-Ming: Activation of lysosomal function in the course of autophagy via mTORC1 suppression and autophagosome-lysosome fusion. In: *Cell Res* (2013), Jan. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2013.11>
- [Zitvogel u. a. 2004] ZITVOGEL, Laurence ; CASARES, Noelia ; PÉQUIGNOT, Marie O. ; CHAPUT, Nathalie ; ALBERT, Matthew L. ; KROEMER, Guido: Immune response against dying tumor cells. In: *Adv Immunol* 84 (2004), S. 131–179. – URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2776\(04\)84004-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2776(04)84004-5)
- [Zou u. a. 1997] ZOU, H. ; HENZEL, W. J. ; LIU, X. ; LUTSCHG, A. ; WANG, X.: Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. In: *Cell* 90 (1997), Aug, Nr. 3, S. 405–413

Publikationen und Konferenzen

Publikationen

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

Posterpräsentationen

- 09/2014 **Ernst Klenk Symposium in Molecular Medicine**, Köln
- 04/2014 **Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V.**, Hannover
- 11/2013 **International Conference on Environmental Mutagens 2013**, Foz do Iguassu, Brasilien
- 10/2013 **Fundamental Aspects of DNA Repair and Mutagenesis**, Sao Paulo, Brasilien
- 09/2013 **Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e.V.**, Darmstadt

Vorträge

- 04/2013 Eppendorf
- 06/2013 GUM

Konferenzteilnahmen ohne eigene Beiträge

- 10/2012 **Stem Cells and Cancer Symposium**, Heidelberg
7th International F.C. Behr Symposium
- 02/2012 **Tagung der Gesellschaft für Umwelt–Mutationsforschung**,
Mainz, Thema: DNA-Schädigung durch Genotoxine

Auszeichnungen und Stipendien

- 11/2013 **Posterpreis** auf der “International Conference on Environmental Mutagens 2013”, Foz do Iguassu, Brasilien
- 10/2013 **Reisestipendium**, Gesellschaft für Umwelt–Mutationsforschung, für die “International Conference on Environmental Mutagens 2013”, Foz do Iguassu, Brasilien
- 03/2013–
03/2014 **Mentee des Edith Heischkel–Mentoring–Programms**,
Universitätsmedizin Mainz