

**Einfluss von Inhibitoren der
DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur auf
die Zytostatika-Sensitivität von
Tumorzellen**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.) an der Universität Hamburg
Fakultät für Mathematik, Informatik
und Naturwissenschaften

vorgelegt von Linda Roth
Hamburg 2012

1. Gutachter: JProf. Dr. Dorothee Dartsch
2. Gutachter: Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein

Tag der mündlichen Prüfung: 21. September 2012

Diese Arbeit wurde in der Zeit von November 2007 bis August 2012 am Institut für Pharmazie der Universität Hamburg unter der Leitung von Frau JProf. Dr. Dorothee Dartsch erstellt.

Für die Möglichkeit, dieses Thema zu bearbeiten, möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau JProf. Dr. Dorothee Dartsch herzlich bedanken. Ich danke ihr auch für die engagierte und freundliche Betreuung sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Für die spontane Bereitschaft, sich als Gutachter zur Verfügung zu stellen, möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein ebenfalls herzlich bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Peter Heisig und seinem Arbeitskreis für die Bereitstellung von Geräten und die fachliche Unterstützung. Besonders möchte ich mich bei Frau Antje Schnasse für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Zeit bedanken.

Für die Bereitstellung der beiden Zelllinien bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Frank Gieseler, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein.

Bei Frau Dr. Ilona Schonn bedanke ich mich für das hilfreiche Korrekturlesen, bei Frau Eva Griewel für die gute Zusammenarbeit. Außerdem danke ich Frau Dr. Göntje Schoch und Frau Dr. Birgit Holland für aufmunternde Worte.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herrn Hans-Peter Sfeir, Frau Katja Carstens und Herrn Alexander Reinhardt für die gute Nachbarschaft.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AIF	Apoptosis inducing factor
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
Apaf -1	Apoptotic protease activating factor 1
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATR	ATM related
au	Arbitrary units
Bad	Bcl-2 antagonist of cell death
Bax	Bcl-2-associated protein
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bcl-2	B-cell lymphoma-2 protein
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BLM	Bloom syndrome
B-NHEJ	Backup-NHEJ
Brca	Breast cancer susceptibility gene
BSA	Bovines Serumalbumin
c-Abl	Cellular Abelson leukemia protein tyrosin kinase
CACO-2	Colon Carcinoma Cells
CD95	cluster of differentiation 95
Cdk	Cyclin dependent kinase
cDNA	complementary DNA
Chk	Checkpoint homolog
CtBP	C-terminal-binding protein 1
CtIP	CtBP-interactin protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNA-PKcs	Katalytische Untereinheit von DNA-PK
D-NHEJ	DNA-PK-abhängiges NHEJ

DOX	Doxorubicin
DSB	DNA-Strangbruch
ECL™	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ETO	Etoposid
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FANCD2	Fanconi anemia group D2
Fas	Apoptosis stimulating fragment
FBS	Foetal bovine serum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FSC	Forward Scatter
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HMGB1	High-Mobility-Group-Protein B1
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HR	Homologe Rekombination
IgG	Immunglobulin G
LigIV	Ligase IV
LMPA	Low melting point agarose
Mdm2	Murine double minute 2
MDR	Multidrug resistance
Mre11	Meiotic recombination protein 11
mRNA	messenger RNA
Nbs1	Nijmegen breakage syndrome 1
NHEJ	Non-homologous end joining
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
P-gp	P-Glykoprotein
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PPi	Anorganisches Pyrophosphat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPA	Replication protein A
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	ribosomal RNA
SAPK	Stress-activated protein kinase

SCLC	Small cell lung cancer
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SSA	Single strand annealing
SSC	Side Scatter
SMC1	Structural maintenance of chromosomes
Tab.	Tabelle
TBS	Tris buffered saline
THP-1	Suspensionszelllinie (akute monozytäre Leukämie)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
TOP2A	Topoisomerase II α
Topo	Topoisomerase II α
WRN	Werner syndrome
Xrcc	X-ray cross-complementing protein

Inhalt

1	Vorwort.....	1
2	Einleitung.....	2
2.1	Humane Topoisomerasen	2
2.1.1	Topoisomerase II α	2
2.2	Topoisomerase II α -Inhibitoren.....	4
2.2.1	Etoposid.....	4
2.2.2	Doxorubicin	7
2.3	DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur	9
2.3.1	Non-homologous end-joining (NHEJ)	10
2.3.2	Homologe Rekombination (HR).....	12
2.3.3	Wahl des Reparaturwegs	14
2.4	Koordination der Schadensantwort.....	15
2.5	Zelltod	18
2.5.1	Apoptose.....	18
2.5.2	Nekrose.....	19
2.5.3	Mitotische Katastrophe.....	20
2.6	Zelluläre Resistenzmechanismen gegen Topoisomerase II α -Inhibitoren	20
3	Fragestellung.....	22
4	Ergebnisse	24
4.1	Inkubationsbedingungen	24
4.2	DNA-Strangbrüche nach Behandlung mit Topoisomerase II α -Inhibitoren.....	24
4.3	Zelltodanalytik zur Unterscheidung von Apoptose und Nekrose	30
4.4	Zellviabilität nach Behandlung mit Doxorubicin.....	34
4.5	Koloniebildungsvermögen von CACO-2-Zellen	36
4.6	Einfluss der Topoisomerase II α -Inhibitoren auf den Zellzyklus	37
4.7	Analyse der Expression ausgewählter Proteine.....	41
4.7.1	Proteine des NHEJ und Topoisomerase II α	42
4.7.2	Proteine der Homologen Rekombination.....	46
4.8	Vergleich des Topoisomerase II α -Gehalts in THP-1 und CACO-2-Zellen.....	51
4.9	Genexpressionsanalyse	51
4.10	Proteinanalytik von CHK1 und ATM.....	53
4.10.1	ATM	53
4.10.2	CHK1	54
4.11	Einfluss pharmakologischer Inhibitoren auf die Etoposid-Sensitivität von THP-1-Zellen.....	54

4.11.1	DNA-PKcs-Inhibitor NU7026	56
4.11.2	ATM Kinase Inhibitor	58
4.11.3	CHK1-Inhibitor TCS 2312.....	59
4.11.4	Ligase-Inhibitor L189.....	61
4.12	Ergebnisüberblick	64
5	Diskussion	66
5.1	DNA-Schaden nach Behandlung mit Topoisomerase II α -Inhibitoren	66
5.2	Korrelation der Zytotoxizität von Topoisomerase II α -Inhibitoren und der DNA-Reparatur.....	67
5.3	Veränderungen des Zellzyklus nach Behandlung mit Topoisomerase II α -Inhibitoren	70
5.4	Reparaturproteine und Reparaturmechanismus	71
5.5	Veränderung des Topoisomerase II α -Gehalts	73
5.6	Einfluss weiterer Proteine auf die Schadensantwort.....	73
5.6.1	ATM	74
5.6.2	CHK1	75
5.7	Bedeutung des Topoisomerase II α -Gehalts für die Sensitivität gegenüber Topoisomerase II α -Inhibitoren	76
5.8	Einfluss pharmakologischer Inhibitoren auf die Zytotoxizität von Etoposid und den Reparaturverlauf in THP-1-Zellen	77
5.8.1	Faktoren des NHEJ	77
5.8.2	Weitere Faktoren der Schadensantwort	79
6	Fazit und Ausblick.....	83
7	Zusammenfassung	84
8	Summary	86
9	Material und Methoden	88
9.1	Geräte	88
9.2	Kultivierung der beiden Zelllinien THP-1 und CACO-2	90
9.2.1	THP-1	90
9.2.2	CACO-2-Zellen.....	90
9.3	Detektion der DNA-Strangbrüche	91
9.3.1	Comet-Assay.....	91
9.4	Methoden zur Bewertung der Zytoxizität	93
9.4.1	CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay.....	93
9.4.2	Bestimmung des Anteils abgelöster Zellen.....	95
9.4.3	Colony Formation Assay	95
9.5	Proteinanalytik.....	97

9.5.1	Isolierung der Proteine	97
9.5.2	Bestimmung des Proteingehalts in der Probe.....	98
9.5.3	Western Blot	99
9.6	Durchflusszytometrie.....	103
9.6.1	Zelltodanalytik mit Propidiumiodid- und Annexin V-FITC-Färbung.....	103
9.6.2	Zellzyklusanalytik	104
9.7	Multiplex-Genexpression	106
9.7.1	Isolierung der RNA	106
9.7.2	Quantitative und qualitative Bewertung der RNA.....	107
9.7.3	Reverse Transkription	108
9.7.4	PCR	109
9.7.5	Primerlisten	110
9.7.6	Vermessung der Proben am GenomeLab™ GeXP	111
9.7.7	Auswertung der Genexpressionsanalyse	112
9.8	Pharmakologische Inhibitoren	113
9.8.1	CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay.....	114
9.8.2	Comet-Assay.....	114
9.9	Statistik	115
10	Gefahrstoffe.....	116
11	Literatur	118

1 Vorwort

Zum Gelingen einer Krebstherapie ist neben dem Wissen zum Status des Patienten die Kenntnis über die Eigenschaften des Tumors von äußerster Wichtigkeit. Je detaillierter die Informationen zu einem Tumor sind, desto gezielter kann ein Zytostatikum für eine anstehende Therapie ausgewählt werden. So besteht die Möglichkeit, bestimmte, nicht in jedem Tumor vorkommende Zielstrukturen, als therapeutische Targets zu nutzen, wie es beispielsweise schon in der Behandlung von HER/2-positivem Brustkrebs der Fall ist. Weiterhin können unnötige – weil nicht wirksame – Therapien vermieden werden, wenn bekannt ist, dass eine Resistenz gegenüber einem Zytostatikum vorliegt. Bei genauer Kenntnis des Resistenzmechanismus kann auch dieser als Angriffspunkt dienen und dadurch überwunden werden. Daher ist die Erforschung der molekularen Grundlagen von Resistenzmechanismen ein Schritt auf dem Weg zur Individualisierung der Krebstherapie.

Neben Resistenzen, die viele Zytostatika gleichermaßen betreffen, gibt es auch Mechanismen, die nur gegen bestimmte Zytostatika oder Gruppen von Zytostatika gerichtet sind. Diese können genauso vielfältig gestaltet sein, wie der Wirkmechanismus selbst. Vor diesem Hintergrund ist es wichtig, die molekularen Effekte von Tumorthapeutika zu kennen und zu wissen, auf welche Art und Weise sich Krebszellen deren Wirkung entziehen können. Die Zytostatika Etoposid und Doxorubicin gehören zu der Gruppe der Topoisomerase II α -Inhibitoren. Da deren Wirkung auf der Erzeugung von DNA-Doppelstrangbrüchen beruht, besteht ein möglicher Resistenzmechanismus in der Reparatur solcher Strangbrüche. Im Rahmen dieser Arbeit werden die molekularen Effekte dieser beiden Topoisomerase II α -Inhibitoren vor dem Hintergrund der DNA-Reparatur betrachtet. Abschließend soll der Einfluss von Inhibitoren der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur auf die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Etoposid und Doxorubicin untersucht werden.

2 Einleitung

2.1 Humane Topoisomerasen

Topoisomerasen erzeugen transiente Einzel- oder Doppelstrangbrüche in der DNA, um deren Supercoiling zu entspannen. Sie ermöglichen dadurch Prozesse wie Replikation, Transkription und Chromatin Remodeling und erleichtern Wechselwirkungen zwischen der DNA und Proteinen [1, 2]. Topoisomerasen lassen sich dem Typ I (Typ IA und IB) oder dem Typ II zuordnen [1]. Typ I-Topoisomerasen schneiden immer nur einen DNA-Strang, die Typ II-Enzyme schneiden beide Stränge der DNA [2]. Typ I-Topoisomerasen sind Monomere, die für ihre Arbeit kein ATP benötigen. Typ II-Topoisomerasen bilden Homodimere, die mit Mg^{2+} und ATP funktionieren [3]. Auch die Typ IA-Enzyme brauchen ein divalentes Metall-Ion. Sie binden kovalent an ein 5'-Phosphat-Ende des Strangbruchs – anders als der Typ IB, der ohne Metall-Kation arbeitet und an das 3'-Ende bindet [2, 3]. Abgesehen von den Typ IA-Topoisomerasen, die nur für negatives Supercoiling zuständig sind, können alle Topoisomerasen sowohl positives als auch negatives Supercoiling [2] relaxieren.

Neben der im Folgenden näher betrachteten Topoisomerase II α existiert noch ein weiteres Isoenzym, die Topoisomerase II β . Die Gene beider Isoformen haben sehr ähnliche Sequenzen und die Enzyme zeigen vergleichbare katalytische Eigenschaften. Allerdings wird die Topoisomerase II β – im Gegensatz zur Topoisomerase II α – zellzyklusunabhängig exprimiert [2]. Die Bedeutung der Topoisomerase II β ist nicht ganz klar [4]. Sie kann die Funktionen der Topoisomerase II α nicht ersetzen und scheint daher spezielle Aufgaben zu übernehmen. Man vermutet eine Beteiligung an der neuralen Entwicklung [3, 4] und an der Regulation der Transkription [5].

2.1.1 Topoisomerase II α

Die Topoisomerase II α ist wichtig für das Überleben proliferierender Zellen, was sich in steigender Proteinexpression während des Zellwachstums äußert. Sie wird zellzyklusabhängig exprimiert und zeigt maximale Konzentrationen in der G2/M-Phase [3, 4], was mit ihrem Wirken zusammenhängt. Topoisomerase II α ist essentiell für die Replikation und die Chromosomen-Segregation [3, 6]. Ihr wird aber auch eine Rolle in der Transkription zugesprochen [5].

Um zu verstehen, wie es zu einem DNA-Doppelstrangbruch durch Topoisomerase II α -Inhibitoren kommt, ist es hilfreich, den Mechanismus genauer zu betrachten, nach welchem Typ II-Topoisomerasen einen DNA-Doppelstrang schneiden,

einen anderen Doppelstrang durch die entstandene Lücke passagieren und die DNA wieder zusammenfügen. Der N-terminale Bereich der Topoisomerase II α beinhaltet die ATP-Bindungsstelle. Zentral befinden sich eine TOPRIM-Domäne, die das zweiwertige Kation komplexiert, und die Domäne, die für die Erzeugung des transienten Strangbruchs und dessen späterer Ligation verantwortlich ist. Die C-terminale Domäne steuert die nukleäre Lokalisation des Enzyms. Außerdem reguliert sie vermutlich die Aktivität des Enzyms durch post-translationale Modifikationen und beeinflusst dessen Funktion mittels Protein-Protein-Wechselwirkungen [5].

In Abb. 1 ist der Mechanismus der Strangpassage veranschaulicht. Die beiden mit dem homodimeren Enzym in Kontakt tretenden DNA-Segmente werden als G-Segment (gate) und T-Segment (transported) bezeichnet. Das G-Segment wird von dem Enzym durchtrennt, um im Anschluss daran das T-Segment durch diese Öffnung führen zu können. Unter der Bindung von ATP ändert die Topoisomerase ihre Konformation und geht aus dem Zustand einer offenen Klammer in eine geschlossenen Form über. In Anwesenheit von Mg²⁺ greift jedes Monomer über ein Tyrosin eine Phosphodiester-Bindung der DNA des G-Segments an. Jedes Tyrosin bindet dabei kovalent an das 5'-Ende eines Stranges des durchtrennten Doppelstrangs. Dieses Intermediat aus Enzym und kovalent gebundener DNA wird als 'Cleavage Complex' bezeichnet und ist für die Wirkung von Topoisomerase II α -Inhibitoren von Bedeutung [3]. Nun erfolgt die Passage des T-Segments. Dieses wird schließlich wieder freigesetzt und der Doppelstrang wird verschlossen. Unter ATP-Hydrolyse erfährt das Homodimer eine erneute Konformationsänderung, die es in die ursprüngliche Form einer offenen Klammer versetzt. Das G-Segment kann sich dabei von dem Enzym lösen [2, 3, 5].

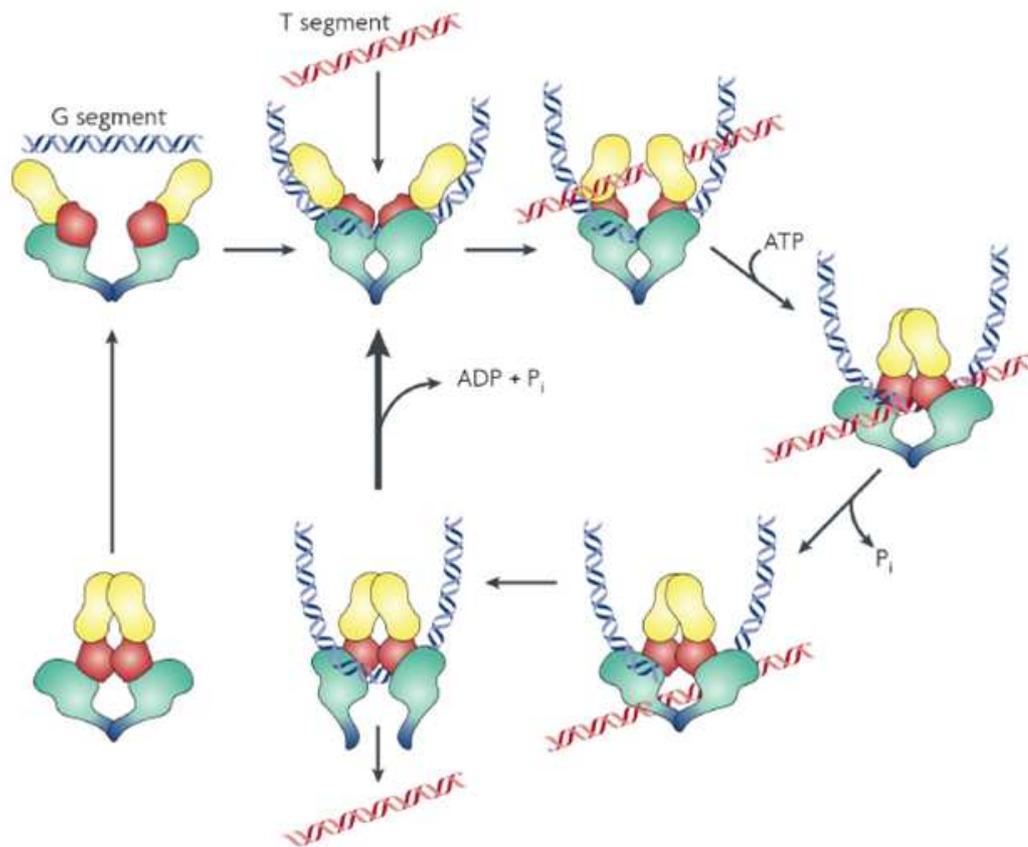


Abb. 1 Mechanismus der Strangpassage durch Typ II-Topoisomerasen. Aus Nitiss, J.L., DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. Nat Rev Cancer, 2009 [5]

2.2 Topoisomerase II α -Inhibitoren

Der durch die Topoisomerase II α vorübergehend generierte Doppelstrangbruch kann durch Topoisomerase II α -Inhibitoren in einen irreversiblen Strangbruch konvertieren. Diese Wirkung soll hier näher anhand der für diese Arbeit verwendeten Tumortheraeutika Etoposid und Doxorubicin erklärt werden.

2.2.1 Etoposid

Etoposid ist der Name des Podophyllotoxin-Derivats 4'-Demethylepipodophyllotoxin 9-(4,6-O-ethylidene- β -D-glucopyranosid). Im Gegensatz zu Podophyllotoxin, das im Rhizom von Podophyllum-Arten vorkommt, zeigt es keine Wirkung auf den Spindelapparat [7].

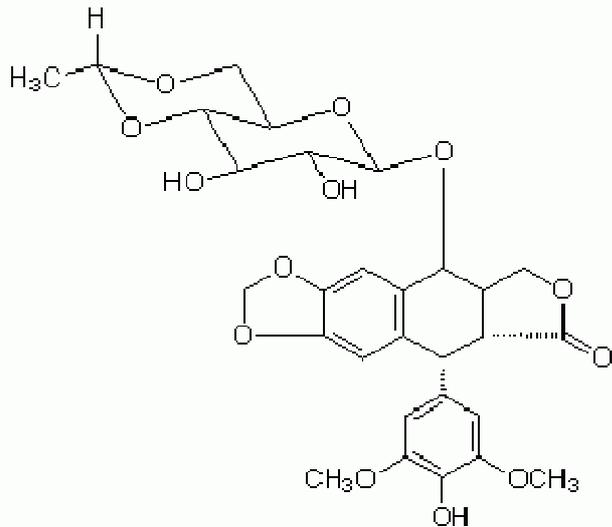


Abb. 2 Struktur von Etoposid [8]

2.2.1.1 Wirkmechanismus

Die toxische Wirkung von Etoposid beruht darauf, dass es die Menge an durch Topoisomerase II α vermittelten Doppelstrangbrüchen steigert [9]. Es fixiert den Cleavage Complex und verhindert somit, dass der zuvor erzeugte Strangbruch wieder verschlossen wird [10]. Kollidieren nun Faktoren der Replikations- oder Transkriptionsmaschinerie mit diesem Komplex aus Topoisomerase und kovalent gebundener DNA, so wird er zerstört und der gespaltene DNA-Strang kann nicht mehr zusammengefügt werden [7, 11]. Die Wirksamkeit des Topoisomerase II α -Inhibitors ist dabei auch von der Nukleinsäuresequenz in der Nähe des Cleavage Complex abhängig [2, 12].

Etoposid kann sowohl die Bildung von Doppel- als auch Einzelstrangbrüchen vermitteln. Das liegt daran, dass die beiden Topoisomerase-Monomere des Cleavage Complex unabhängig voneinander je ein Etoposid-Molekül binden [2, 9, 13].

2.2.1.2 Angaben zur Anwendung

Etoposid wird oral oder intravenös – auch als das besser wasserlösliche Etoposidphosphat – appliziert. Etoposidphosphat wird durch alkalische Phosphatasen im Blut rasch in Etoposid umgewandelt. Es besitzt vergleichbare pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften wie Etoposid [7]. Die Angaben zur absoluten Bioverfügbarkeit von Etoposid nach oraler Applikation schwanken zwischen 40 % und 70 % [14]. Ein Hersteller gibt für seine Weichkapseln eine absolute Bioverfügbarkeit von 50 % \pm 25 % an [15]. Angaben eines pharmazeutischen Unternehmers zu maximalen Plasmaspiegeln nach intravenöser Gabe liegen nach dreieinhalbstündiger Infusion von 150 mg/m² bei 20,0 \pm 3,7 μ g/ml für Etoposidphosphat und 19,6 \pm 4,2 μ g/ml für Etoposid sowie

nach einstündiger Infusion von durchschnittlich 100 mg/m^2 bei $20,1 \pm 4,1 \text{ } \mu\text{g/ml}$ und $19,0 \pm 5,1 \text{ } \mu\text{g/ml}$ für Etoposidphosphat und Etoposid [16].

Etoposid wird vorwiegend renal eliminiert. Annähernd 40 % werden unverändert ausgeschieden [17]. In geringem Maße erfolgt hepatische Metabolisierung zum cis-Lakton und zur Hydroxycarbonsäure [18]. Ungefähr ein Drittel wird durch Demethylierung und Glucuronidierung entfernt [7]. Die terminale Halbwertszeit beträgt vier bis vierzehn Stunden [19].

Etoposid wird in Kombination mit anderen Chemotherapeutika zur Behandlung von Bronchialkarzinomen, Morbus Hodgkin und Non-Morbus Hodgkin-Lymphomen, Chorionkarzinomen und Hodentumoren eingesetzt. Als Monotherapeutikum kann es in der palliativen Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms nach Versagen einer platinhaltigen Standardtherapie indiziert sein [20, 21]. Dosierungen und Therapieintervalle sind Tab. 1 zu entnehmen.

Tab. 1 Auszüge aus Fachinformationen/Rote Liste zur Dosierung von Etoposid

Produkt	Dosierung/Schema
ETO-cell® 20 mg/ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung	50-100 mg/m ² i.v. d. 1-5, bzw. 120-150 mg/m ² i.v. d. 1, 3, 5.[20]
Etomedac 20 mg/ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung (zum Verdünnen)	In Kombination mit anderen zugelassenen chemotherapeutischen Mitteln 100-120 mg/m ² /Tag in Form von Dauerinfusionen von 30 Minuten für einen Zeitraum von 3 bis 5 Tagen, an die sich eine Ruhephase von zehn bis zwanzig Tagen anschließt. Im Allgemeinen werden drei bis vier Chemotherapie-Zyklen angewandt. Dosis und Anzahl der Zyklen sollen in Abhängigkeit des Grades der Knochenmarksuppression und der Reaktion des Tumors angepasst werden. Bei Patienten mit Nierenfunktionsstörung ist die Dosis entsprechend anzupassen.[21]
LASTET® 25 mg/50 mg/100 mg Weichkapseln	Die Patienten erhalten LASTET Weichkapseln in einer Dosierung von 100-200 mg/m ² Körperoberfläche täglich während fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit mindestens 21-tägigen Intervallen zwischen zwei Zyklen. Ein Zyklus sollte generell erst dann wiederholt werden, wenn eine Erholung des Knochenmarks durch hämatologische Kontrollen bestätigt worden ist.[15]

2.2.2 Doxorubicin

Doxorubicin gehört zu der Gruppe der Anthrazykline. Während deren antibiotische Aktivität schon länger bekannt war, wurde man erst in den frühen 1960er Jahren auf die Antitumoraktivität dieser Substanzen aufmerksam. Zwei dieser Verbindungen, die ein ausgesprochen breites Spektrum in ihrer Antitumorwirkung aufweisen, wurden schließlich aus *Streptomyces peucetius* isoliert: Daunorubicin und das hier näher betrachtete Doxorubicin [22].

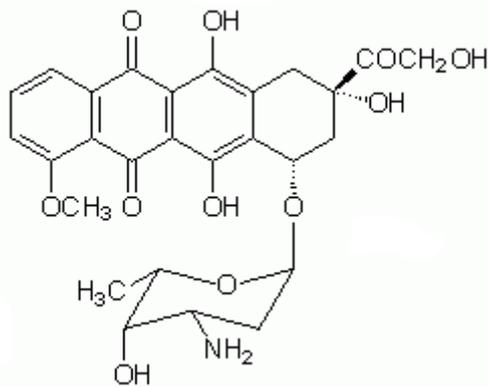


Abb. 3 Struktur von Doxorubicin [23]

2.2.2.1 Wirkmechanismus

Doxorubicin interkaliert in die DNA. Der planare Chromophor platziert sich dabei sequenzspezifisch zwischen die DNA-Basen [22, 24]. Der Daunosamin-Zucker sitzt in der kleinen Furche der DNA. Dieser Zustand wird durch Van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert [22, 25]. Das in der DNA fixierte Molekül stört die Arbeit von Helikasen [26] und blockiert dadurch die Transkription und die Synthese der DNA [27, 28]. Ein zweiter Wirkmechanismus ist die Hemmung der Topoisomerase II α durch das interkalierte Doxorubicin nach sequenzspezifischer Bindung an den Cleavage Complex [24]. Wie schon in 2.2.1.1 für Etoposid beschrieben, wird der Cleavage Komplex auf diese Art zunächst stabilisiert. Durch das Zusammentreffen mit der Replikations- oder Transkriptionsmaschinerie wird er schließlich zerstört und kann den zuvor generierten DNA-Strangbruch nicht mehr verschließen.

Die im Molekül enthaltene Chinon-Struktur kann zu einem Semichinon-Radikal reduziert werden. Dieses ist selbst - oder nach der Erzeugung von ROS - potentiell schädigend für die DNA. Freie Radikale können zur Lipidperoxidation in Membranen führen und werden für die kardiotoxische Wirkung von Doxorubicin verantwortlich gemacht. Ob eine klinisch relevante Beteiligung an der erwünschten Antitumorwirkung besteht, ist nicht sicher [29].

2.2.2.2 Angaben zur Anwendung

Nach intravenöser Gabe wird Doxorubicin schnell im Organismus verteilt. Die Elimination aus dem Blut erfolgt triphasisch ($t_{1/2\alpha} = 4,8$ min; $t_{1/2\beta} = 2,6$ h; $t_{1/2\gamma} \approx 48$ h). Die Substanz wird nur zu einem geringen Teil renal eliminiert. Ungefähr 50 % des Wirkstoffes werden biliär ausgeschieden. Doxorubicin wird in der Leber metabolisiert. Dabei entsteht - neben inaktiven Aglykonen - das aktive Doxorubinol [30-32]. Gängige Dosierungen in der Monotherapie sind Einzeldosen von 50-80 mg/m² Körperoberfläche, die alle drei Wochen verabreicht werden. In der Polychemotherapie sind Dosierungen von 30-40 mg/m² Körperoberfläche üblich, die ebenfalls in einem Abstand von drei Wochen appliziert werden sollen [31].

Bolusapplikationen im Bereich von 15 bis 90 mg/m² führten zu maximalen initialen Plasmakonzentrationen von 5 µM; in der Regel werden Konzentrationen von 1 bis 2 µM gemessen. Die Plasmaspiegel fallen schnell ab und sind dann zwischen 250 nM und 750 nM angesiedelt, was in etwa dem Bereich einer kontinuierlichen Infusion entspricht [29].

Doxorubicin hat zahlreiche Anwendungsgebiete, die in der folgenden Liste aufgeführt sind [33]:

- Kleinzelliges Bronchialkarzinom (SCLC)
- Mammakarzinom
- Rezidivierendes Ovarialkarzinom
- Systemische Therapie des lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Harnblasenkarzinoms
- Intravesikale Rezidivprophylaxe beim oberflächlichen Harnblasenkarzinom
- nach transurethraler Resektion
- Neoadjuvante und adjuvante Therapie des Osteosarkoms
- Fortgeschrittenes Weichteilsarkom bei Erwachsenen
- Ewing-Sarkom
- Morbus Hodgkin
- Non-Hodgkin-Lymphome
- Akute lymphatische Leukämie
- Akute myeloblastische Leukämie
- Fortgeschrittenes multiples Myelom
- Fortgeschrittenes oder rezidivierendes Endometriumkarzinom
- Wilms-Tumor
- Fortgeschrittenes papilläres/follikuläres Schilddrüsenkarzinom
- Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom
- Fortgeschrittenes Neuroblastom

Neben den für Zytostatika typischen Nebenwirkungen wie Myelosuppression, Alopezie, Übelkeit und Erbrechen, birgt Doxorubicin das Risiko der Kardiotoxizität [30-32].

2.3 DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur

Doppelstrangbrüche in der DNA – exogen oder endogen verursacht – zählen zu den gefährlichsten DNA-Schäden. Sie entstehen beispielsweise während der Meiose oder der V(D)J-Rekombination, durch kollabierende Replikationsgabeln, ROS, ionisierende Strahlung oder auch durch Zytostatika. Werden diese Schäden nicht oder falsch repariert, so kann

dies zu genomischer Instabilität führen oder den Zelltod auslösen [34]. Die Zelle verfügt jedoch über die Möglichkeit, DNA-Doppelstrangbrüche zu reparieren. Dazu nutzt sie zwei Mechanismen: das Non-homologous end-joining und die homologe Rekombination. Beide werden im Folgenden näher erläutert [34-36].

2.3.1 Non-homologous end-joining (NHEJ)

Das NHEJ fügt gebrochene DNA-Enden ohne oder mit nur geringer Sequenzhomologie zusammen [36, 37]. Dieser Reparaturweg wird häufig als schneller [35], aber zu Fehlern neigender Prozess beschrieben, der in Säugetierzellen im Vergleich zur Homologen Rekombination (HR) vorherrscht [38, 39].

Der Ablauf des NHEJ ist in Abb. 4 schematisch dargestellt. Zunächst werden die freien Enden des Doppelstrangbruchs durch den Ku-Komplex, einem Heterodimer aus den beiden Proteinuntereinheiten Ku70 und Ku86, gebunden. Zusammen mit der DNA-PKcs (catalytic subunit of DNA protein kinase), die eine Serin-/Threonin-Proteinkinase-Aktivität aufweist, bildet Ku das trimere Holoenzym DNA-PK (DNA-Proteinkinase) [38, 39]. Es wird angenommen, dass dieser Komplex die DNA-Enden vor dem Abbau durch Nukleasen schützt, und die Enden überbrückt [38, 40]. DNA-PK phosphoryliert und aktiviert sich selbst und andere für die Schadensantwort relevante Zielproteine (z. B. Artemis, XRCC4) [34, 41]. Komplexere Doppelstrangbrüche müssen vor der Ligation prozessiert werden. An diesem Vorgang können verschiedene Nukleasen, wie der MRN-Komplex oder Artemis, und DNA-Polymerasen beteiligt sein [42]. Im letzten Schritt werden die beiden DNA-Enden durch den Komplex aus XRCC4 und Ligase IV zusammengefügt. XLF (Cernunnos) scheint diesen Prozess zu unterstützen [43, 44].

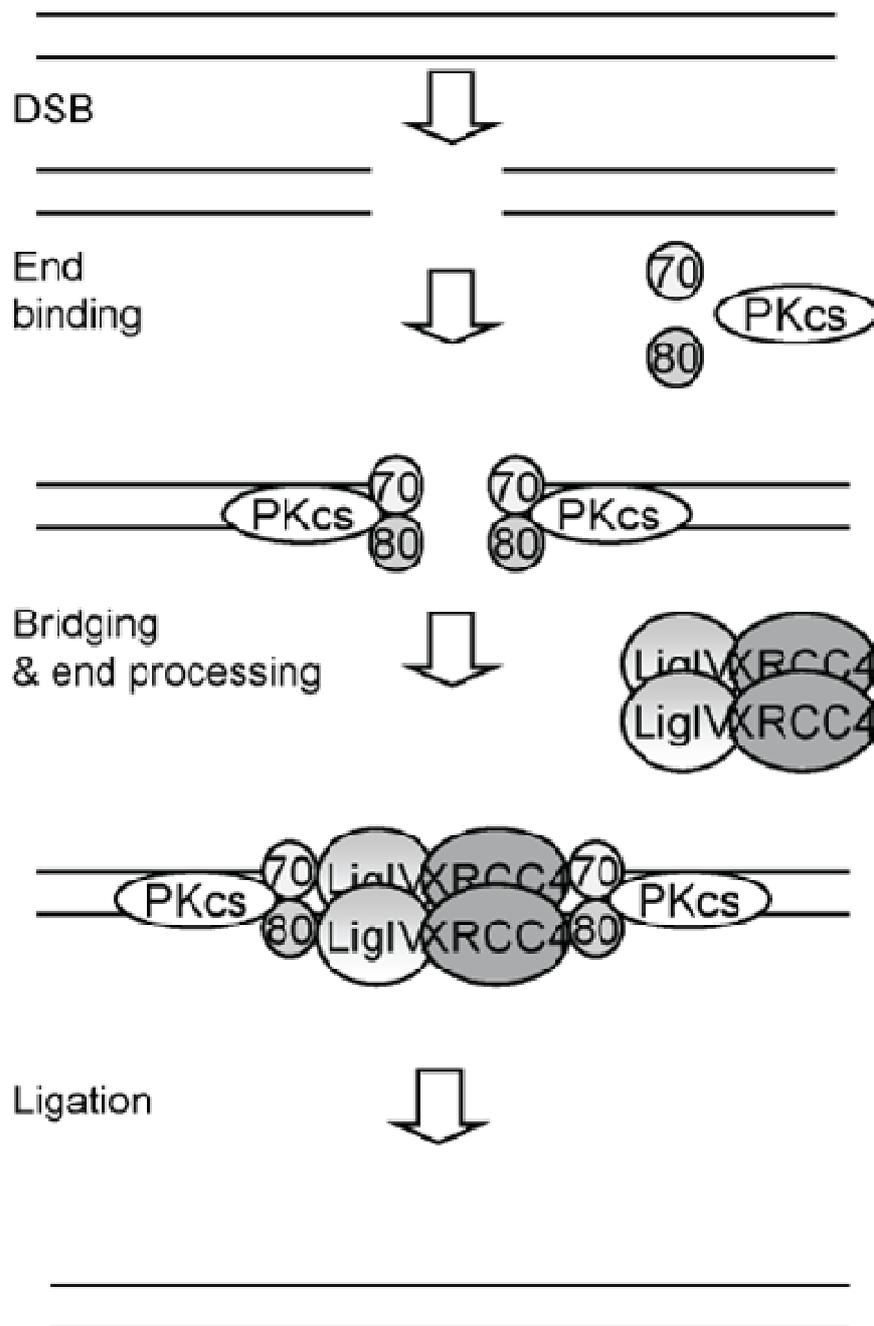


Abb. 4 Ablauf des NHEJ aus Pastwa und Blasiak [38]

Neben diesem bekannten NHEJ-Weg, in dem die DNA-PK eine zentrale Funktion übernimmt und der deshalb D-NHEJ (DNA-PK-dependent) genannt wird, ist in der Literatur ein zweiter Weg beschrieben. Dieser wird als B-NHEJ (Backup-NHEJ) bezeichnet. Zellen, die Mutationen in Faktoren des klassischen NHEJ aufwiesen (DNA-PKcs, Ku, DNA-Ligase IV, XRCC4), konnten DNA-Doppelstrangbrüche immer noch reparieren. Dies ging allerdings langsamer von statten, als durch D-NHEJ. Da dieser Vorgang aber durch das Fehlen funktionstüchtiger Proteine der Homologen Rekombination nicht beeinflusst wurde, kam die HR als Reparaturmechanismus nicht in Frage. Iliakis et al. [45] leiteten daraus einen

alternativen NHEJ-Weg ab. Dieser ist langsamer, führt häufiger zu Chromosomenaberrationen und ist nur dann aktiv, wenn der klassische Weg ausfällt. Anscheinend kommt das B-NHEJ aber der Homologen Rekombination zuvor [45, 46]. Das Backup-NHEJ enthält noch viele Unbekannte. Man vermutet eine Beteiligung von PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) an der Schadenserkennung, von MRN und CtIP an der Prozessierung der DNA-Enden und von XRCC1/LigIII an der Ligation der Enden [46].

2.3.2 Homologe Rekombination (HR)

Durch die Homologe Rekombination können fehlende oder beschädigte DNA-Sequenzen neu synthetisiert werden. Hierzu wird auf homologe Sequenzen, vorzugsweise von einem Schwesterchromatid, zurückgegriffen. Aus diesem Grund ist die Homologe Rekombination mit bestimmten Zellzyklusphasen – der S und der G2-Phase – assoziiert [46, 47]. Dieser Reparaturweg ist im Vergleich zur NHEJ komplexer und gilt als fehlerfrei [48]. Zu Beginn der HR werden die DNA-Enden zu DNA-Einzelsträngen mit 3'-Überhängen geschnitten. Dieser Schritt wird durch den MRN-Komplex unterstützt [48]. Obwohl MRE11, das dem MRN-Komplex angehört, sowohl Endo- als auch Exonukleaseaktivität besitzt, konnte bisher nicht bestätigt werden, dass es einen Beitrag zur Aufbereitung der DNA-Enden während der HR leistet. Jedoch vermutet man, dass der MRN-Komplex mit anderen Komponenten wechselwirkt und dadurch die Prozessierung der DNA-Enden ermöglicht. Einer dieser Faktoren ist CtIP (CtBP-interacting protein) [46, 49]. Im Anschluss an diesen ersten Schritt bildet der generierte Einzelstrang ein Rad51-Nukleoproteinfilament aus, das aus je einem Rad51-Protein pro drei Nukleotiden besteht. Dieser Vorgang wird durch das einzelstrangbindende Protein RPA, durch Rad54 und Rad52 begünstigt [50]. Rad54, dessen eigene ATPase-Aktivität durch DNA-Doppelstränge aktiviert wird, stabilisiert die Wechselwirkungen von Rad51 und DNA-Einzelsträngen [50]. Rad52 bindet Einzelstränge und Überhänge von doppelsträngiger DNA und kann sie vor dem Angriff durch Nukleasen schützen [51]. Das Filament dehnt die DNA, was wichtig für die schnelle und effiziente Homologie-Suche ist [52].

Das Nukleoproteinfilament stellt dann eine Verbindung zwischen dem eindringenden DNA-Einzelstrang und der homologen Sequenz auf der Template-DNA her. Anschließend erfolgt die DNA-Synthese, wobei das 3'-Ende des eindringenden Einzelstranges als Primer genutzt wird. Damit die Synthese stattfinden kann, muss Rad51 abgelöst werden [52]. Dieser Prozess wird vermutlich von Rad54 unterstützt [46, 52].

Die überkreuzten Verbindungen, die durch das Einwandern des Einzelstranges in den Doppelstrang entstanden sind (Holliday Junctions, siehe Abb. 5), werden abschließend getrennt. Am Ende liegen wieder zwei intakte DNA-Doppelstränge vor.

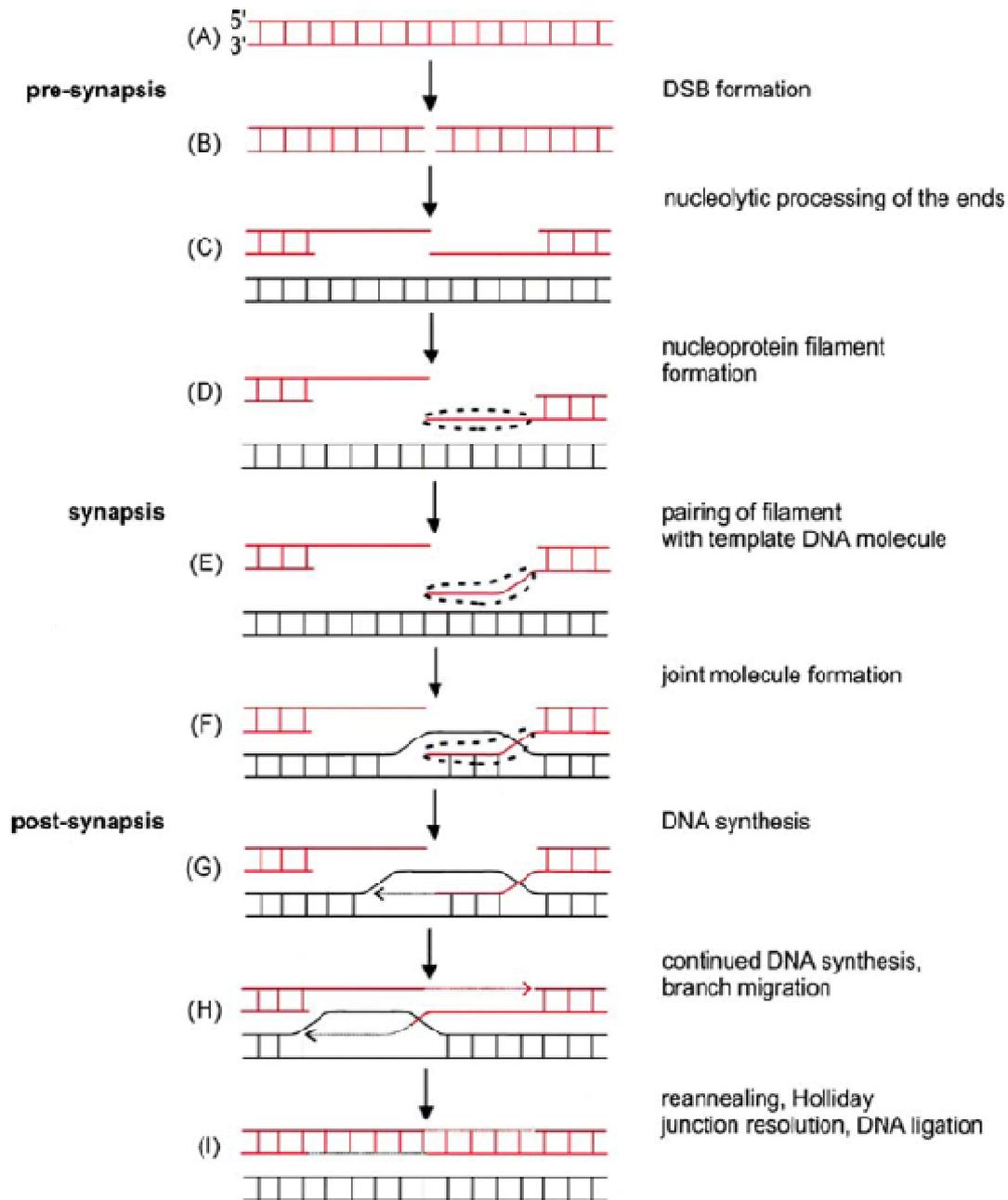


Abb. 5 Doppelstrangbruch-Reparatur durch Homologe Rekombination aus Tan et al. [50]

Ein Rad51-unabhängiger Mechanismus ist das Single Strand Annealing (Abb. 6), bei dem repetitive Sequenzen des komplementären Strangs als Template dienen. Hier wird also kein zweiter Doppelstrang benötigt. Dieses Verfahren ist möglich, wenn sich in Nachbarschaft zu den DNA-Enden auf beiden Seiten des Strangbruchs die gleiche DNA-Sequenz befindet. Der Strang wird dann bis zur komplementären Sequenz geschnitten, was zum Verlust einer dieser repetitiven Elemente führt.

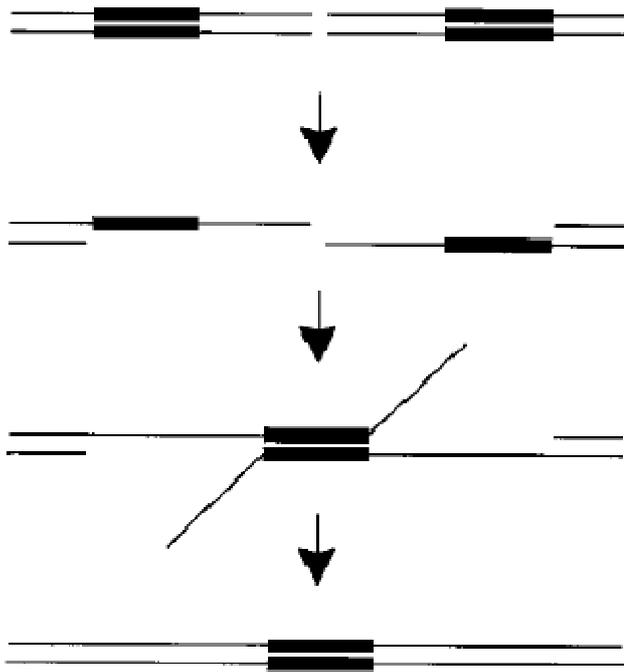


Abb. 6 Single Strand Annealing aus Sugawara et al. [53]

2.3.3 Wahl des Reparaturwegs

Ob und in welchem Maß ein Reparaturmechanismus an der Beseitigung eines Doppelstrangbruchs beteiligt ist, hängt von vielen Faktoren ab. Grundsätzliche Unterschiede existieren zwischen verschiedenen Organismen. So gilt NHEJ als dominanter Mechanismus in Säugetierzellen. In Hefen herrscht die Homologe Rekombination vor [38].

Da die HR homologe Sequenzen bevorzugt einem Schwesterchromatid entnimmt, könnte dessen Verfügbarkeit über den Reparaturweg entscheiden. So wird angenommen, dass die Homologe Rekombination vor allem in der S- oder der G2-Phase stattfindet, da hier genügend Templates vorliegen [47].

Ein weiterer Aspekt ist die Natur des Doppelstrangbruchs. Komplexere Strangbrüche neigen stärker zur Resektion ihrer DNA-Enden und zur Bindung von Rad51 und bedürfen möglicherweise eher der HR [54].

Auch die Struktur des Chromatins vermag einen Einfluss auf die Reparatur zu haben. So gibt es Hinweise darauf, dass Doppelstrangbrüche im Heterochromatin verstärkt durch HR repariert werden [34, 55].

NHEJ kann in jeder Phase des Zellzyklus arbeiten. Die Proteine des DNA-PK-Komplexes werden in großen Mengen exprimiert und binden schnell an den Doppelstrangbruch. Der Mechanismus führt zu einer raschen Ligation der DNA-Enden. All diese Tatsachen sprechen dafür, dass NHEJ in den meisten Fällen zuerst beansprucht wird. Erst, wenn die erfolgreiche Ligation der DNA-Enden möglich ist, tritt die HR in den Vordergrund. Die beiden

Reparaturoptionen sollten nicht als konkurrierend betrachtet werden. Vielmehr tragen sie gemeinsam und ergänzend dazu bei, dass ein Doppelstrangbruch in der DNA entfernt wird [46, 54, 56].

2.4 Koordination der Schadensantwort

Um die Integrität des Genoms zu bewahren, stehen der Zelle komplexe Mechanismen zur Verfügung. Neben der schon beschriebenen DNA-Reparatur gibt es weitere Möglichkeiten, auf einen DNA-Strangbruch zu reagieren. So können erhöhte dNTP-Levels, eine Veränderung der Transkription relevanter Gene oder die Induktion eines Zellzyklusarrests dazu beitragen, mit dem Schaden umzugehen. Ist der DNA-Strangbruch nicht reparabel, wird die geschädigte DNA durch das Auslösen des Zelltods entfernt [57, 58]. Die genannten Optionen stehen dabei nicht isoliert nebeneinander, sondern kooperieren.

Zunächst muss ein DNA-Doppelstrangbruch durch sogenannte Sensoren erkannt werden. Diese aktivieren eine aufwendige Signalkaskade, in der das Schadenssignal weitergeleitet und verstärkt wird. Am Ende dieses Wegs stehen Effektoren, die die konkrete Reaktion der Zelle, wie z. B. DNA-Reparatur oder Zelltod, hervorrufen (Abb. 7).

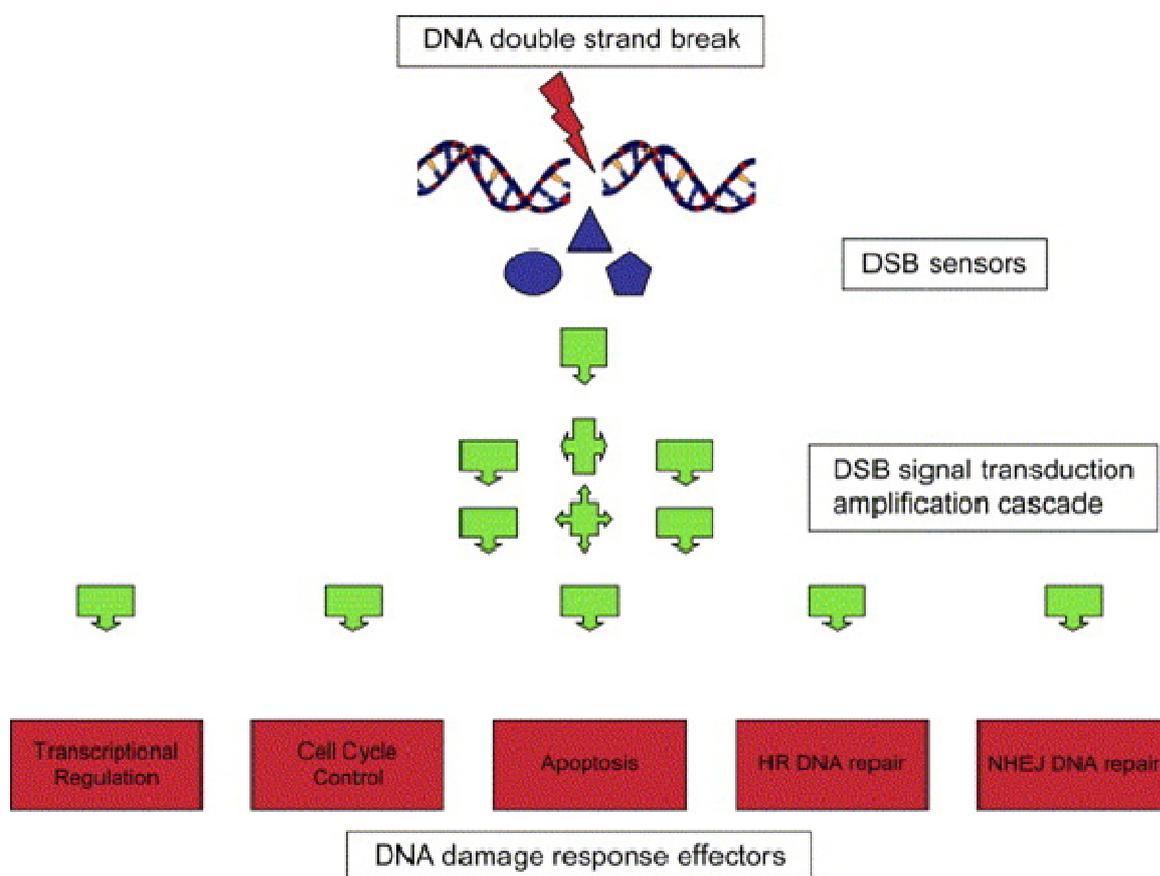


Abb. 7 Schadensantwort auf einen DNA-Doppelstrangbruch aus Tutt und Yarnold [59]

Der Komplex aus MRE11, Rad50 und NBS1 (MRN) fungiert als initialer Sensor von DNA Doppelstrangbrüchen [75, 76]. MRN rekrutiert ATM zu dem Doppelstrangbruch. Es folgt die Autophosphorylierung von ATM an Ser1981. Dies löst seine Dissoziation von einem inaktiven Dimer in das aktive Monomer aus, in welchem die katalytische Domäne frei liegt [75, 77]. Eines der Substrate ist das Histon H2AX, das von ATM – aber auch von DNA PK oder ATR - zu γ H2AX phosphoryliert wird [60]. γ H2AX führt über eine Wechselwirkung mit dem MDC1-Protein (Mediator of DNA damage checkpoint protein 1), welches wiederum mit MRN interagiert, zu einer weiteren Aktivierung von ATM. MDC1 ruft über Ubiquitin-Ligasen und weitere Proteine die Ubiquitinierung von Histonprotein in der Nähe des Doppelstrangbruchs hervor. Dies führt vermutlich über die Exposition spezifischer Histonstrukturen zur Akkumulation von 53BP1. Dieser Schadensmediator kann durch Wechselwirkung mit dem MRN-Komplex eine weitere Rekrutierung von ATM an den Doppelstrangbruch hervorrufen [61, 62]. ATM phosphoryliert zahlreiche weitere Substrate, die in die Regulierung von Zelltod, Zellkylus, DNA-Reparatur und die Kontrolle der Transkription von für die Stress-Anwort relevanten Genen involviert sind. Dazu gehören unter anderem p53, CHK2, BRCA1, SMC1 und Artemis [63-65].

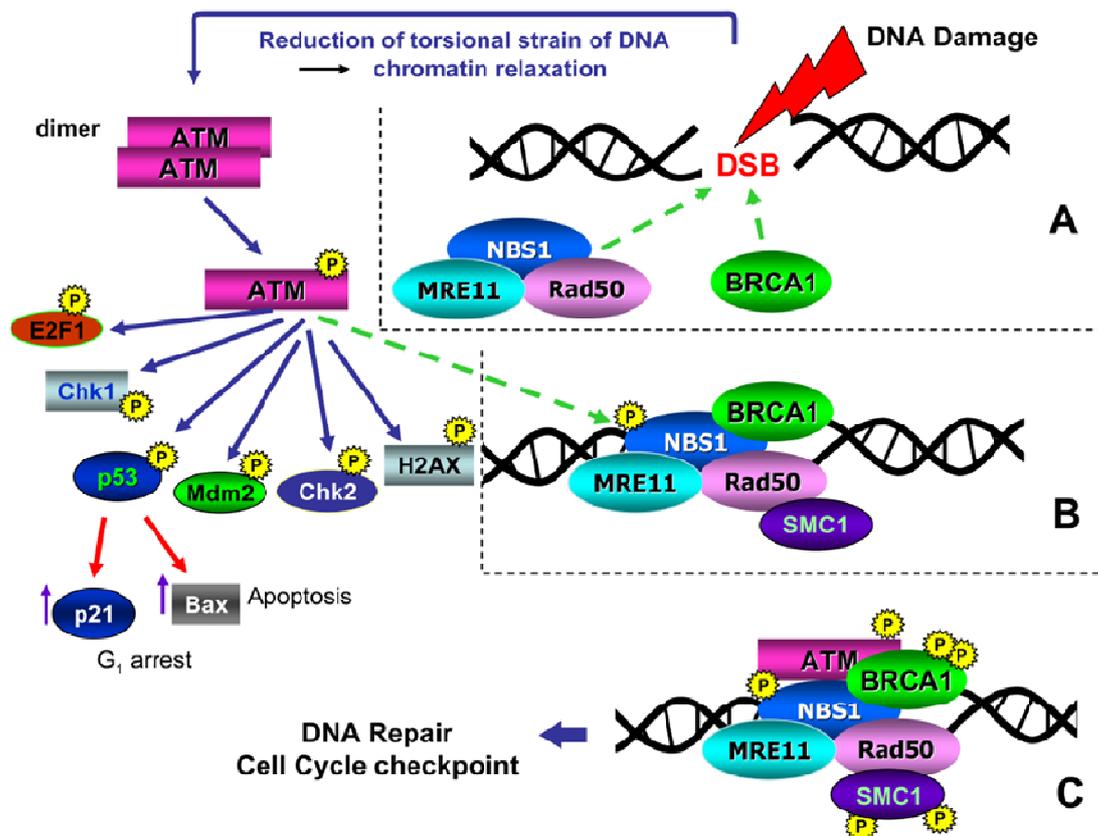


Abb. 8 ATM-Signalweg nach einem DNA-Doppelstrangbruch aus Darzynkiewicz et al. [65]. Darstellung nach Kitagawa et al. [66] und modifiziert von Darzynkiewicz et al. [65]. A) Induktion des DNA-Doppelstrangbruchs. MRN und Chromatinrelaxation mit anschließender Aktivierung und Monomerisierung von ATM, das dann katalytisch aktiv wird. B) ATM-Rekrutierung zum Doppelstrangbruch. C) Phosphorylierung diverser Substrate durch ATM (NBS1, BRCA1, SMC1).

Neben ATM sind auch ATR und DNA-PK an der Koordination der Schadensantwort beteiligt [67, 68].

Der Tumorsuppressor p53 kann sowohl einen Zellzyklus-Arrest als auch Apoptose vermitteln. Nach seiner Phosphorylierung durch ATM steigert es die Transkription von p21. Dadurch wird dessen hemmende Wirkung auf Cyclin-abhängig Kinasen (CDKs) verstärkt und somit der Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus verhindert. ATM wirkt außerdem stabilisierend auf p53, in dem es die Ubiquitin-Ligase Mdm2 phosphoryliert und dadurch deren Wechselwirkung mit p53 unterbindet. Die Ubiquitinierung und der dann folgende Abbau von p53 werden so gehemmt [64, 67]. Die Phosphorylierung von CHK2 durch ATM kann über die Inaktivierung von Cdc25 einen G2/M-Arrest hervorrufen [64, 67]. NBS1-Phosphorylierung führt nach Phosphorylierung von SMC1 zu einem S-Phase-Arrest [69].

Die proapoptotische Wirkung von p53 beruht auf der Regulation von bcl-2/Bax-Genen. Eine vermehrte Expression von Bax fördert dabei den Zelltod [60, 65, 70].

Ein Modell zur Regulierung der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur durch ATM und DNA-PKcs ist in Abb. 9 dargestellt. Sowohl ATM als auch DNA-PKcs phosphorylieren zahlreiche Proteine, die zur Aktivierung der Homologen Rekombination führen, darunter c-Abl, SMC1, BRCA1 und CHK1 (A). DNA-PKcs stabilisiert ATM. Die Phosphorylierung der DNA-PKcs – durch ATM oder sich selbst - führt zur deren Dissoziation von den DNA-Enden, was den Zugang von Reparaturproteinen des NHEJ oder der HR ermöglicht (B) [34].

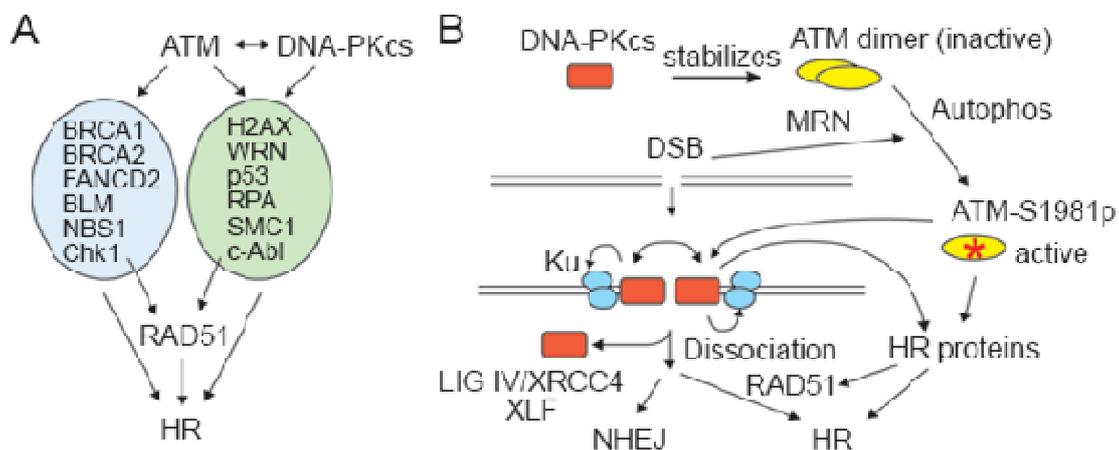


Abb. 9 Modell der Co-Regulation der DNA-Doppelstrangbruchreparatur durch ATM und DNA-PKcs aus [34].

Ein DNA-Doppelstrangbruch kann also diverse Signalwege aktivieren, die unabhängig oder zusammen arbeiten. Insgesamt sind diese sehr aufwendig reguliert. Dabei haben viele Proteine überlappende Funktionen oder ein Protein kann verschiedene Reaktionen – z.B. Apoptose oder Zellzyklusarrest – auslösen. Dies trägt dazu bei, dass der genaue Beitrag der einzelnen Faktoren und deren Bedeutung nicht im Einzelnen geklärt sind.

2.5 Zelltod

Wann immer möglich, soll eine Therapie mit Zytostatika den Tod der Tumorzellen herbeiführen. Der Zelltod kann auf verschiedenen Wegen ausgelöst werden. Zur Differenzierung unterschiedlicher Arten des Zelltods werden biochemische, morphologische oder funktionelle Charakteristika herangezogen [71-73]. Klassischerweise wird zwischen einem physiologischen, programmierten Zelltod - der Apoptose - und der Nekrose, einem eher chaotischen Prozess, der nach schädigenden äußeren Einflüssen abläuft, unterschieden [70, 71].

2.5.1 Apoptose

Die Apoptose ist ein hoch regulierter Vorgang, bei dem einzelne Zellen – losgelöst von ihren Nachbarzellen – sterben [74]. Morphologische Kennzeichen sind das Schrumpfen der Zelle, Chromatin-Kondensation, die Fragmentierung des Zellkerns und die Abschnürung sogenannter apoptotischer Körperchen – kleine membranumschlossene Vesikel, die Zellorganellen enthalten [70, 71]. Da während der Apoptose die Membranintegrität aufrechterhalten wird, kann der Zellinhalt nicht in den extrazellulären Raum austreten. Im Gegensatz zur Nekrose kommt es daher nicht zu Entzündungsreaktionen [70, 74]. Die apoptotischen Körperchen werden schließlich phagozytiert.

Auf molekularer Ebene wird die Apoptose durch extrazelluläre oder intrazelluläre Stresssignale ausgelöst. Der extrinsische Weg wird über einen sogenannten „death receptor“ eingeleitet, der nach Ligandbindung zur Aktivierung der Initiator-Caspase-8 und weiteren Caspasen führt [71, 73-75]. Caspasen sind Cystein-Proteasen, die zunächst als inaktive Pro-Caspasen vorliegen und im Rahmen der Apoptose durch Spaltung an einem Aspartat-Rest enzymatisch aktiv werden. Durch Spaltung verschiedener Proteine leiten sie die Phase der apoptotischen Degradierung ein [70, 74, 75]. Der intrinsische Weg reagiert auf eine intrazelluläre Stresssituation, z. B. DNA-Schaden, und wird durch Mitochondrien vermittelt. Reguliert wird er durch Proteine der Bcl-2-Familie, die Apoptose-Hemmer (Bcl-2, Bcl-X_L) oder proapoptotische Proteine (Bax, Bad, Bid) sind. Der Tumorsuppressor p53 steuert die Balance dieser Faktoren [70, 75]. Bax führt zu Veränderungen der Mitochondrienmembran, was die Freisetzung von Cytochrom c und AIF (apoptosis-inducing factor) begünstigt. Cytochrom c bindet und aktiviert Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1). Dadurch wird die Umwandlung von Procaspase-9 in Caspase-9 herbeigeführt. Diese aktiviert wiederum verschiedene nachgeschaltete Caspasen, die die weiteren Prozesse und zellulären Veränderungen während der Apoptose auslösen [70, 75] (Abb. 10). Apoptotische Zellen, die nicht phagozytiert wurden, können in eine sekundäre Nekrose übergehen [74].

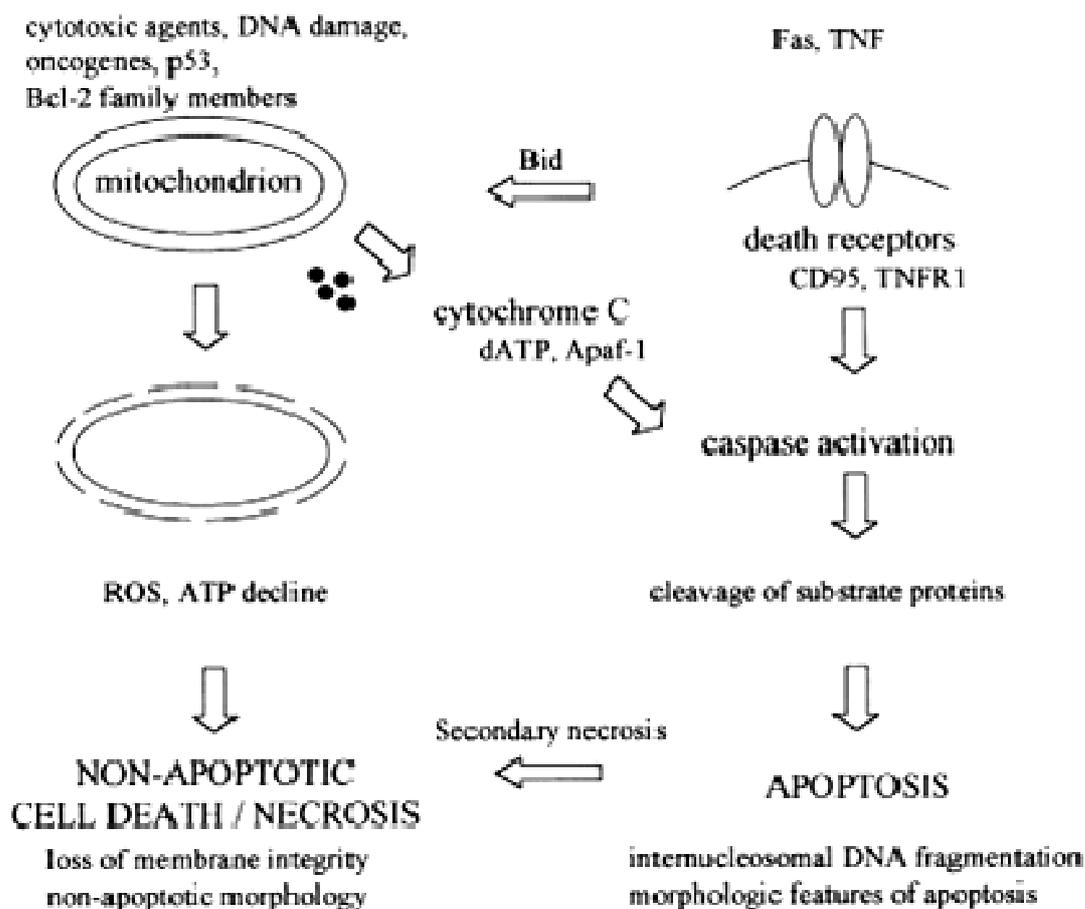


Abb. 10 Molekulare Wege der Apoptose und die Beziehung zwischen apoptotischen und nicht-apoptotischem Zelltod. Nach Saraste et al.[75]. Apaf-1 = apoptosis protease-activating factor, ROS = reactive oxygen species.

2.5.2 Nekrose

Der Zelltod durch Nekrose beinhaltet ein Anschwellen der Zelle und den Verlust der Membranzintegrität. Der Zellinhalt wird frei, was zu Entzündungsreaktionen im umliegenden Gewebe führen kann [71, 74]. Traditionell wurde die Nekrose als ungeordnet und wenig reguliert beschrieben. Inzwischen wird diese Unterscheidung zwischen der „programmierten“ Apoptose und der „chaotischen“ Nekrose nicht mehr so strikt getroffen [72, 76]. Auch die Nekrose kann reguliert ablaufen und zeigt neben den morphologischen Veränderungen auch charakteristische biochemische Merkmale. Die gestörte Funktion der Mitochondrien führt zu vermehrter Bildung von ROS, sinkendem ATP-Gehalt und Veränderungen in der Calcium-Homöostase. Außerdem kommt es zur Aktivierung von nicht-apoptotischen Proteasen, wie Calpain und Cathepsine. Durch die Hemmung dieser Faktoren, z.B. durch Calcium-Chelatoren oder Calpain- bzw. Cathepsin-Inhibitoren kann die Nekrose unterbunden werden, was für ihren aktiven Beitrag am Geschehen spricht [72, 76].

Auch die Tatsache, dass Nekrose über einen death-receptor-vermittelten Weg ablaufen kann, spricht dafür, dass ihr Charakter weitaus weniger zufällig ist, als ehemals angenommen [76, 77].

2.5.3 Mitotische Katastrophe

Obwohl die mitotische Katastrophe in manchen Veröffentlichungen als eigener Zelltodmodus beschrieben wird [78], ist sie vielmehr ein Mechanismus, der den Ereignissen Apoptose, Nekrose oder auch Seneszenz vorgeschaltet sein kann [73, 79]. Heute wird mit diesem Modell ein an die Mitose gekoppelter Zelltod erklärt, der durch ein frühzeitiges und fehlerhaftes Eintreten in die Mitose ausgelöst wird [79].

2.6 Zelluläre Resistenzmechanismen gegen Topoisomerase II α -Inhibitoren

Resistenzmechanismen setzen die Empfindlichkeit einer Tumorzelle gegenüber dem verwendeten Zytostatikum herab. Zu den zellulären Mechanismen, die das Ansprechen auf Topoisomerase II α -Inhibitoren herabsetzen, zählen die Überexpression von P-Glykoprotein oder MRP (Multidrug Resistance-Related Protein), die Reduktion des Topoisomerase II α -Gehalts oder eine Veränderung in der Aktivität des Enzyms [2]. Auch die Reparatur von DNA-Strangbrüchen wird als Resistenzfaktor beschrieben [26, 80]. Durch Inaktivierung dieser Mechanismen könnte man die Zytostatika-Empfindlichkeit von Tumorzellen verbessern.

P-Glykoprotein gehört zur Familie der ABC-Transporter. Dieser Membrantransporter bindet eine große Zahl von Arzneistoffen, die strukturell sehr verschieden sein können, und schleust sie unter ATP-Hydrolyse aus der Zelle in den Extrazellularraum. Dies führt intrazellulär zu reduzierten Arzneistoffkonzentrationen. In der Krebstherapie kommt es dadurch zu einer Kreuzresistenz gegenüber unterschiedlichen Zytostatika. Das Phänomen dieser durch P-Glykoprotein vermittelten Kreuzresistenz ist als Multidrug Resistance (MDR) bekannt. Sowohl Etoposid als auch Doxorubicin sind Substrate von P-Glykoprotein. Außerdem werden sie von einer weiteren Pumpe, dem MRP1 (Multidrug Resistance-Related Protein) ausgeschleust [81, 82].

Da die Topoisomerase II α den DNA-Strangbruch vermittelt, können spezielle Modifikationen, die dieses Enzym betreffen, ebenfalls zu einer veränderten Sensitivität beitragen. Dazu gehört die Abnahme des Topoisomerase II α -Gehalts, die durch eine verminderte Transkription bedingt sein kann. Auch eine veränderte Lokalisation des Enzyms aufgrund einer Genmutation ist bekannt. So gibt es Zelllinien, deren Topoisomerase sich verstärkt im Zytoplasma aufhält und eine verringerte Konzentration am Wirkort, dem Zellkern,

aufweist [83]. In beiden Fällen ergibt sich ein vermindertes Ansprechen auf Topoisomerase II α -Inhibitoren, da das Target nicht ausreichend vorhanden ist.

Mutationen der Topoisomerase II α können an diversen Stellen Resistenzen gegenüber Topoisomerase II α -Inhibitoren verursachen. Sie können die Wechselwirkung von Wirkstoff und Enzym betreffen oder die katalytische Aktivität reduzieren. Beispielsweise führt eine Mutation in Ser-1106 des Moleküls zur post-translationalen Hypophosphorylierung mit einer herabgesetzten Aktivität des Enzyms und einer geringeren Sensitivität für Etoposid [84].

Weitere Mechanismen, die den Effekt von Topoisomerase II α -Inhibitoren abschwächen könnten, betreffen die Signalwege nach Induktion des DNA-Strangbruchs. So kann eine verminderte Expression von Apoptose vermittelnden Caspasen eine zelluläre Resistenz gegenüber Etoposid verursachen [26]. Auch das an der Regulation von Apoptose und Zellzyklus beteiligte p53 ist ein Kandidat. Ferner ermöglicht bcr-abl durch einen G2/M-Arrest die Reparatur von durch Etoposid erzeugten DNA-Strangbrüchen [26]. Und auch die Expression anti-apoptotischer Gene wie bcl-2 könnte zur Verminderung des zytotoxischen Effekts von Topoisomerase II α -Inhibitoren beitragen [83].

Was die DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur betrifft, so wurde bereits für Reparaturproteine der HR und des NHEJ gezeigt, dass sie die Sensitivität von Tumorzellen beeinflussen [80, 85, 86] und vermutet, dass eine veränderte Reparaturrate durch erhöhte Rad51- oder DNA-PKcs-Level klinische Relevanz haben könnte [86].

Es gibt demnach zahlreiche potentielle Resistenzmechanismen, die entweder - wie die MDR – sehr verbreitet vorkommen oder aufgrund der speziellen Pharmakodynamik typisch für die Gruppe der Topoisomerase II α -Inhibitoren sind. Die klinische Relevanz ist allerdings nur in wenigen Fällen geklärt.

3 Fragestellung

Für die Optimierung der Krebstherapie ist es wichtig, die Bedeutung von Resistenzmechanismen einschätzen zu können. Im Falle der hier näher beleuchteten Zytostatika Etoposid und Doxorubicin aus der Gruppe der Topoisomerase II α -Inhibitoren, stellt die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen einen möglichen Mechanismus dar, der die Sensitivität von Tumorzellen herabsetzen kann. Es ist davon auszugehen, dass die zytotoxische Wirkung der Topoisomerase II α -Inhibitoren auf der Induktion von DNA-Strangbrüchen, insbesondere von DNA-Doppelstrangbrüchen, beruht. Die Beobachtung, dass solche Strangbrüche von der geschädigten Zelle wieder verschlossen werden können, führte zu der Annahme, dass dieser Reparaturvorgang der Tumorzelle Resistenz verleihen kann. Jedoch ist der Zusammenhang weniger deutlich. Die zytotoxische Wirkung bleibt oft bestehen – auch, wenn der Strangbruch vorher entfernt wurde. Es stellt sich also die Frage, inwiefern dieser Mechanismus tatsächlich die Wirkung von Topoisomerase II α -Inhibitoren reduzieren kann.

Der Weg von der Entstehung eines DNA-Doppelstrangbruchs bis zu seiner Reparatur ist sehr aufwendig kontrolliert und beschäftigt viele verschiedene Proteine, die den Schaden erkennen, Schadenssignale weiterleiten und ihn schließlich beheben. Das Wissen darum, welche Proteine an diesen Prozessen beteiligt sind, kann dazu beitragen, neue therapeutische Targets zu finden. Durch die Hemmung reparaturvermittelnder Proteine könnte man Zellen schließlich sensitiver für den Angriff von Topoisomerase II α -Inhibitoren machen. Denkt man diesen Gedanken weiter, so steht am Ende eine mögliche Reduktion der Dosis dieser Arzneistoffe in einer Chemotherapie und vielleicht eine dadurch bedingte bessere Verträglichkeit.

Die Beeinflussung der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur durch pharmakologische Inhibitoren und deren Auswirkung auf die Sensitivität gegenüber den Topoisomerase II α -Inhibitoren Etoposid und Doxorubicin sollen in der AML-Zelllinie THP-1 und der Kolonkarzinomzelllinie CACO-2 untersucht werden.

Im Besonderen werden auf dem Weg dorthin folgende Fragen gestellt:

Werden die durch Doxorubicin und Etoposid verursachten DNA-Doppelstrangbrüche repariert? Gibt es dabei Unterschiede zwischen den beiden Zytostatika?

In welchem Zusammenhang stehen die DNA-Reparatur und die zytotoxischen Effekte?

Welche Proteine tragen zur Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche bei?

Ist es möglich, durch Hemmung ausgewählter Proteine, die an der Schadensantwort auf einen DNA-Doppelstrangbruch beteiligt sind, die Sensitivität gegenüber Topoisomerase II α -Inhibitoren zu erhöhen?

4 Ergebnisse

4.1 Inkubationsbedingungen

Um die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen zu charakterisieren und deren Bedeutung für das Ansprechen auf Topoisomerase II α -Inhibitoren beurteilen zu können, müssen zunächst DNA-Strangbrüche (DSB) generiert werden. Aus diesem Grund wurden anhand von Vorversuchen mit dem Comet-Assay Bedingungen ermittelt, die in den beiden Zelllinien THP-1 und CACO-2 eine Zunahme von DSB im Vergleich zur Kontrolle bewirkten. Dies war bei einer dreistündigen Inkubation und einer Konzentration von 5 μ M Etoposid bzw. Doxorubicin der Fall, so dass der größte Teil der Experimente mit diesen Bedingungen durchgeführt wurde. In den folgenden Versuchen wurde das Verhalten der Zellen in den Stunden nach dieser Inkubation beobachtet. Zu diesem Zweck wurde ein Mediumswechsel von zytostatikahaltigem zu zytostatikafreiem Medium durchgeführt und die Zellen zu verschiedenen Zeiten nach Austausch des Mediums analysiert. Für die Beschreibung der Inkubationszeiten wird für eine dreistündige Inkubationszeit und ein sich anschließendes zytostatikafreies Intervall von beispielsweise einer Stunden in manchen Fällen abkürzend die Angabe „3 h + 1 h“ verwendet.

4.2 DNA-Strangbrüche nach Behandlung mit Topoisomerase II α -Inhibitoren

Etoposid und Doxorubicin führten unter den gewählten Bedingungen zu DNA-Strangbrüchen (DSB). Von Bedeutung für diese Arbeit ist die Frage, ob die Zellen in der Lage sind, diesen Schaden wieder zu beheben oder ob die Doppelstrangbrüche bestehen bleiben. Um dies zu klären, wurde das Schadensausmaß zu verschiedenen Zeiten nach Austausch des zytostatikahaltigen Mediums gegen normales Wachstumsmedium mit Hilfe des Comet-Assays bestimmt (Abb. 11).

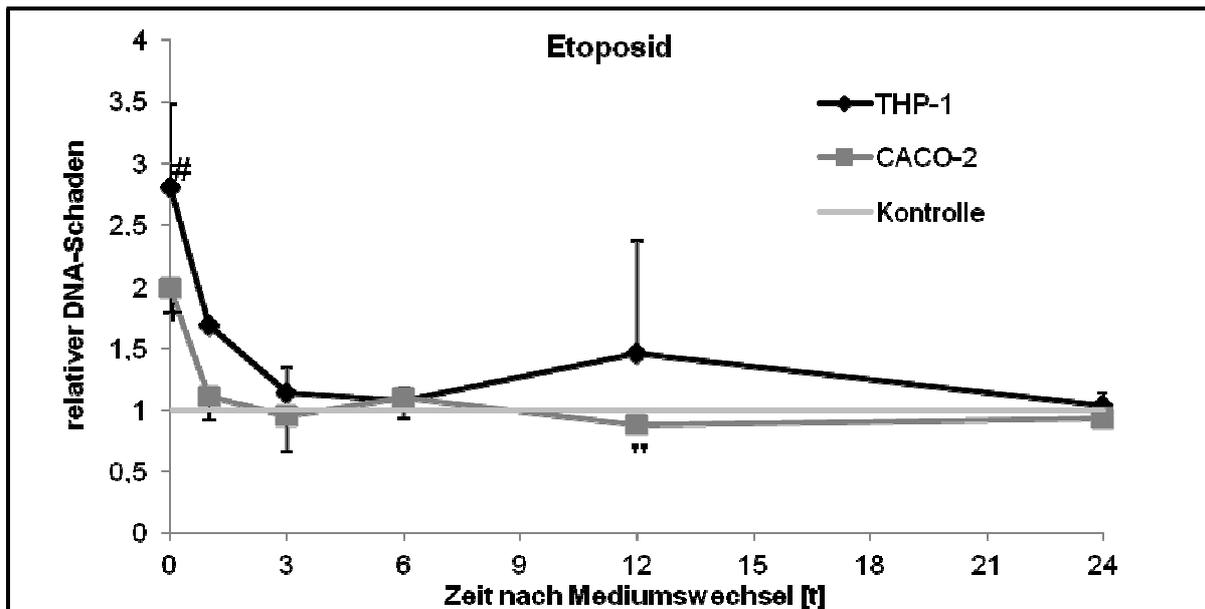


Abb. 11 DSB nach dreistündiger Behandlung mit 5 μM Etoposid und anschließender zytostatikafreier Inkubation (1/3/6/12/24 h). Der im Comet-Assay ermittelte Score wurde auf die Kontrolle normiert (relativer DNA-Schaden). Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (THP-1; 3 h + 1 h; $n = 2$) und deren Standardabweichungen, die aus Gründen der Übersicht nur in eine Richtung aufgetragen wurden (+ = $p \leq 0,001$; # = $p \leq 0,01$; * = $p \leq 0,05$ gegen die Kontrolle).

In beiden Zelllinien war direkt nach der Behandlung mit Etoposid eine signifikante Zunahme an DSB gegenüber der Kontrolle zu verzeichnen (THP-1: $2,81 \pm 0,67$; CACO-2: $1,98 \pm 0,18$; $p \leq 0,05$), wobei die THP-1-Zellen etwas empfindlicher reagierten. Der absolute Comet-Score der Kontrolle betrug dabei $121,00 \pm 11,32$ für die THP-1-Zellen und $189,50 \pm 86,75$ für die CACO-2-Zellen. Der relative DNA-Schaden in den behandelten CACO-2-Zellen erreichte bereits eine Stunde nach der Inkubation das Niveau der Kontrolle und war signifikant gegen den Initialschaden ($1,11 \pm 0,18$; $p = 0,004$). Bei den THP-1-Zellen war die Anzahl der DSB nach ca. drei bis sechs Stunden vergleichbar mit der der Kontrolle. Der Schaden nahm aber schon unmittelbar nach der Inkubation mit Etoposid um mehr als die Hälfte ab und war drei Stunden nach Mediumswechsel signifikant gegen das Ausgangsniveau der DSB ($1,14 \pm 0,21$; $p = 0,01$). Nach 24 h waren die DSB in beiden Zelllinien behoben (THP-1: $1,04 \pm 0,10$; CACO-2: $0,93 \pm 0,01$). Sowohl die THP-1- als auch die CACO-2-Zellen waren demnach in der Lage, die DSB zu entfernen. Da die CACO-2-Zellen adhärent wachsen, könnte die Abnahme der DSB jedoch auch dadurch bedingt sein, dass stark geschädigte Zellen, die sich von der Kulturschale abgelöst hatten, beim Mediumswechsel abgesaugt wurden und somit in dem Ergebnis nicht mehr repräsentiert waren. Bei der Suspensionszelllinie THP-1 bestand diese Möglichkeit nicht, da der Mediumswechsel hier mittels Zentrifugation erfolgen musste.

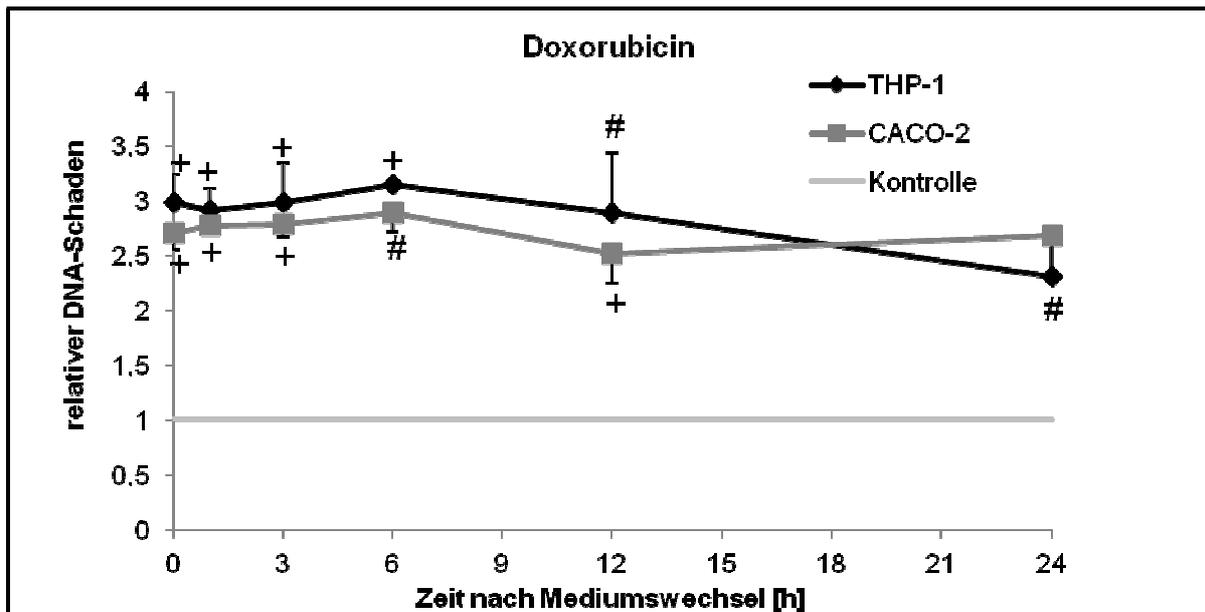


Abb. 12 DSB nach dreistündiger Behandlung mit 5 μ M Doxorubicin und anschließender zytostatikafreier Inkubation (1/3/6/12/24 h). Der im Comet-Assay ermittelte Score wurde auf die Kontrolle normiert (relativer DNA-Schaden). Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen und deren Standardabweichungen, die aus Gründen der Übersicht nur in eine Richtung aufgetragen wurden (+ = $p \leq 0,001$; # = $p \leq 0,01$ gegen die Kontrolle).

Nach einer dreistündigen Behandlung mit 5 μ M Doxorubicin (Abb. 12) wurde in beiden Zelllinien eine im Vergleich zur Kontrolle (absoluter Wert der Kontrolle THP-1: $121,67 \pm 10,69$; CACO-2: $137,08 \pm 15,27$) signifikant erhöhte Anzahl von DSB detektiert (THP-1: $2,99 \pm 0,25$; $p \leq 0,001$; CACO-2: $2,71 \pm 0,32$; $p \leq 0,001$). Der Initialschaden der CACO-2 blieb über den gesamten Zeitraum bestehen. Auch die in den THP-1-Zellen erzeugte DSB blieben bis 24 h nach Beenden der Zytostatikainkubation signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Im Gegensatz zu der Inkubation mit 5 μ M Etoposid konnten die Zellen die Doppelstrangbrüche nicht entfernen. Der auf die Kontrolle normierte Initialschaden war bei den CACO-2-Zellen – nicht aber bei den THP-1 – nach der Doxorubicin-Inkubation signifikant höher als nach der Etoposid-Behandlung ($p = 0,03$). Um auszuschließen, dass die Abnahme der Doppelstrangbrüche bei den adhärent wachsenden Zellen nach der Etoposid-Inkubation darauf zurückzuführen ist, dass sich sehr stark geschädigte Zellen bereits von der Kulturschale abgelöst hatten und beim Mediumswechsel abgesaugt wurden, wurde in zwei Ansätzen eine Zählung der CACO-2-Zellen nach Behandlung durchgeführt. Die im Überstand befindlichen Zellen sowie die in der Kulturschale angewachsenen Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gezählt und der Prozentsatz abgelöster Zellen ermittelt.

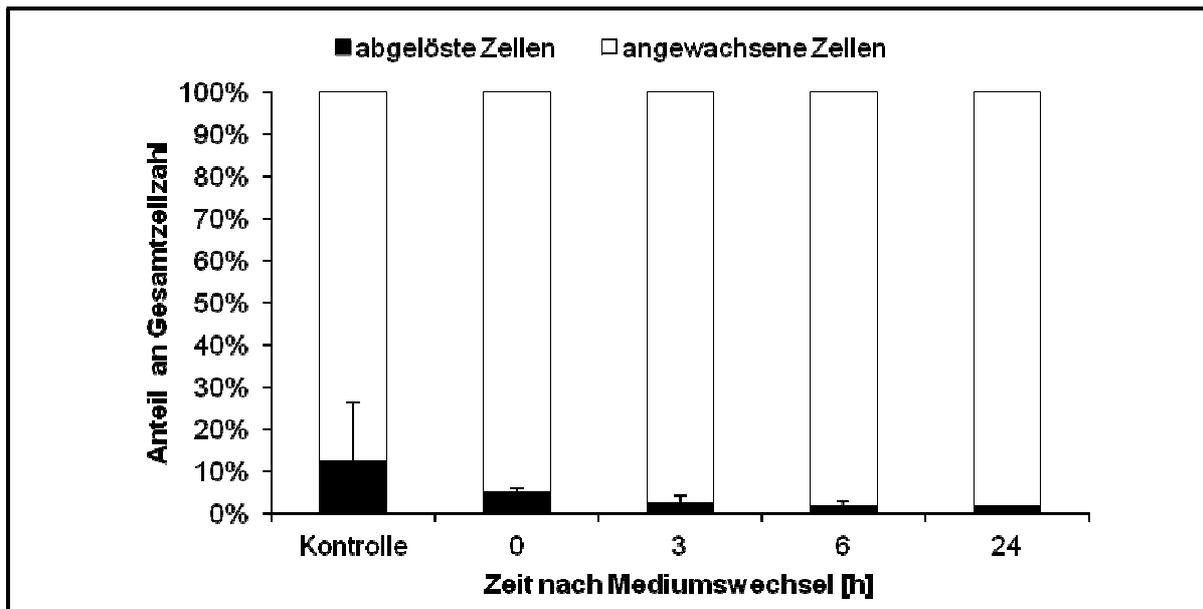


Abb. 13 Anteil abgelöster CACO-2-Zellen. Gezählt wurde der Überstand und die in der Kulturschale angewachsenen Zellen nach dreistündiger Etoposid-Behandlung ($5 \mu\text{M}$) und anschließender zytostatikafreier Inkubation. Das Diagramm zeigt Mittelwerte mit Standardabweichungen (symmetrisch um den Mittelwert verteilt; hier nur in eine Richtung aufgetragen) aus zwei unabhängigen Experimenten.

Hier konnte zu keinem Zeitpunkt eine Zunahme abgelöster Zellen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Abb. 13). Die Zellen wurden zudem mikroskopiert. Auch dabei waren im Überstand nur vereinzelte Zellen zu sehen. Demnach ist anzunehmen, dass die Abnahme der Doppelstrangbrüche nach der Behandlung mit $5 \mu\text{M}$ Etoposid tatsächlich durch eine Reparatur der DNA zustande kommt.

Da beide Zelllinien die durch Etoposid induzierten Strangbrüche schnell wieder beheben konnten, wurde in einem weiteren Versuch mit einer zehnfach höheren Konzentration ($50 \mu\text{M}$) behandelt (Abb. 14). Möglicherweise kann so ein stärkerer, nicht mehr zu entfernender Initialschaden entstehen.

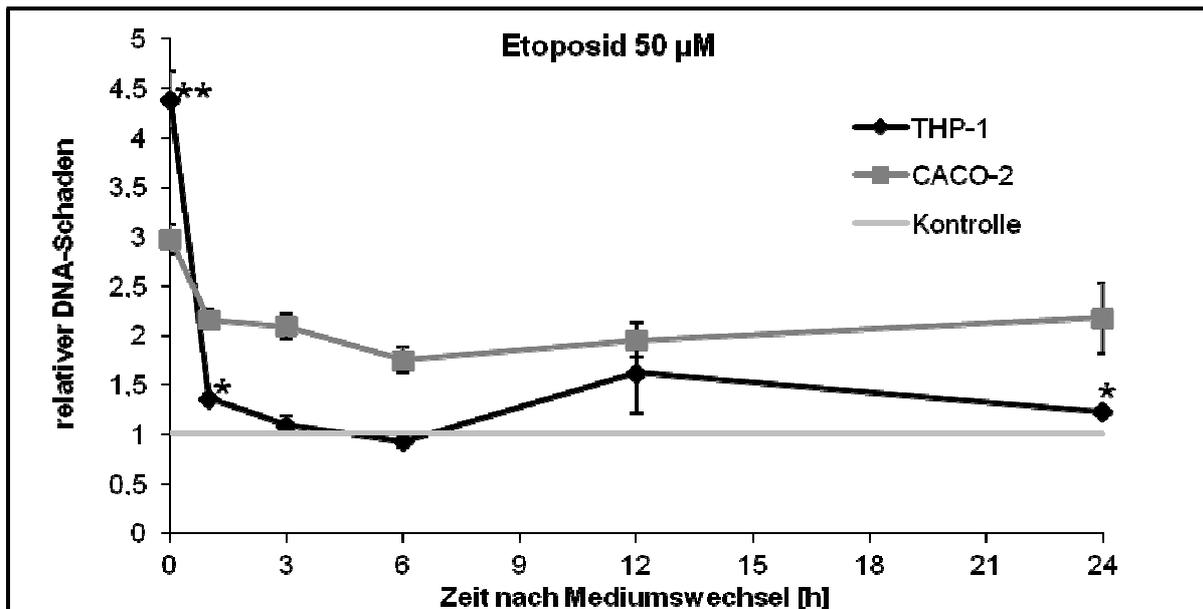


Abb. 14 DNA-Doppelstrangbrüche nach dreistündiger Behandlung mit 50 µM Etoposid und anschließender zytostatikafreier Inkubation (3 h + 1/3/6/12/24 h). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei (THP-1) bzw. zwei (CACO-2) unabhängigen Experimenten (** = $p \leq 0,0001$; * = $p \leq 0,001$ gegen die Kontrolle).

Die durch diese hohe Etoposid-Konzentration entstandenen Doppelstrangbrüche konnten von den THP-1-Zellen entfernt werden, obwohl der auf die Kontrolle (absoluter Wert der Kontrolle: $114,17 \pm 8,55$) bezogene Initialschaden sehr hoch war ($4,39 \pm 0,30$; $p \leq 0,0001$ gegen die Kontrolle). Alle Werte sind signifikant ($p \leq 0,001$) gegen den Initialschaden (1 h: $1,37 \pm 0,04$; 3 h: $1,09 \pm 0,09$; 6 h: $0,93 \pm 0,06$; 12 h: $1,62 \pm 0,41$; 24 h: $1,23 \pm 0,04$). Bemerkenswert ist, dass der Großteil des Schadens schon innerhalb der ersten Stunden behoben wurde.

Die in den CACO-2-Zellen (absoluter Wert der Kontrolle: $126,00 \pm 5,66$) entstandenen DNA-Strangbrüche hingegen blieben größtenteils bestehen. Zwar konnte der relative Schaden (0 h: $2,98 \pm 0,15$) reduziert werden. Vierundzwanzig Stunden nach Mediumswechsel lag er jedoch immer noch bei $2,15 \pm 0,36$. Nach sechs Stunden erreichte die Kurve ein Minimum ($1,75 \pm 1,66$), stieg dann aber wieder leicht an.

Im Gegensatz zu der Behandlung mit 5 µM Etoposid, unterschieden sich beide Zelllinien in der Antwort auf die Inkubation mit 50 µM. Die THP-1-Zellen wiesen hier eine höhere Reparaturkapazität als die CACO-2 auf. Abgesehen von dem Wert zwölf Stunden nach Mediumswechsel waren die Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien signifikant (0 h: $p = 0,009$; 1 h: $p = 0,001$; 3 h: $p = 0,002$; 6 h: $p = 0,002$; 12 h: $p = 0,02$),

Um den Einfluss der unterschiedlichen Schadensklassen auf den Initialschaden zu demonstrieren, wurde die durchschnittliche Zellzahl in jeder Klasse pro 100 Zellen ermittelt.

Tab. 2 Anteil der einzelnen Schadensklassen am Initialschaden nach dreistündiger Behandlung mit Topoisomerase IIa-Inhibitoren. Gezählt wurden 100 Zellen.

Klasse	THP-1 Eto 5 µM	THP-1 Eto 50 µM	THP-1 Dox 5 µM	CACO-2 Eto 5 µM	CACO-2 Eto 50 µM	CACO-2 Dox 5 µM
1	38	3	12	25	28	18
2	9	2	12	13	6	15
3	3	5	23	12	8	13
4	6	9	19	9	10	6
5	17	47	15	21	21	31
6	27	34	10	20	28	17

Um den Anteil gar nicht bis wenig geschädigter, mittel und stark geschädigter Zellen je 100 gezählten Zellen direkt nach der Behandlung zu veranschaulichen, wurden die Klassen 1 und 2 (wenig/gar nicht geschädigt), 3 und 4 (mittlerer DNA-Schaden) und 5 und 6 (stark geschädigt) zusammengefasst (Abb. 15).

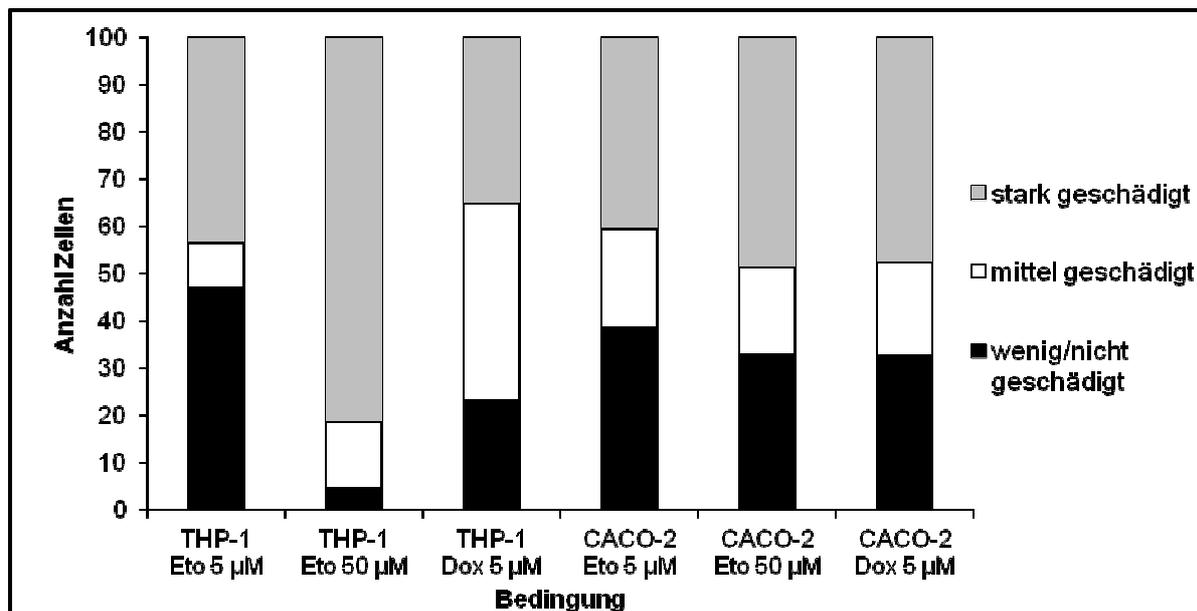


Abb. 15 Zahl der Zellen mit verschieden starkem DNA-Schaden pro 100 Zellen ($n = 3$, MW) nach dreistündiger Behandlung mit Topoisomerase IIa-Inhibitoren.

Die CACO-2-Zellen zeigten nach allen drei Bedingungen nur wenige Unterschiede. Im Vergleich zu 5 µM Etoposid führten Doxorubicin und 50 µM Etoposid zu 5-6 % weniger wenig/nicht geschädigter Zellen und einem um 7-8 % erhöhten Anteil stark geschädigter Zellen.

Bei den THP-1-Zellen führte die Behandlung mit 50 μM zu einem hohen Anteil stark geschädigter Zellen (Klasse 5: 46,8/Klasse 6: 34,4). Zellen der Schadensklasse 1 und 2 waren fast nicht mehr vorhanden (Klasse 1: 2,8/Klasse 2: 1,8). Die Doxorubicin-Inkubation führte im Vergleich zu den beiden Etoposid-Bedingungen zu einem höheren Anteil an Zellen mit einem mittelstarken Schaden der Klassen 3 (22,83) und 4 (19). Der Anteil der Klassen 1 und 2 betrug 11,5 und 11,67 Zellen je 100 Zellen. Nach der Behandlung mit 5 μM Etoposid waren durchschnittlich 28,25 THP-1-Zellen ohne DNA-Schaden (Klasse 1). Auf 100 Zellen kamen hier 33,5 stark geschädigte.

4.3 Zelltodanalytik zur Unterscheidung von Apoptose und Nekrose

Beide Zelllinien konnten den durch 5 μM Etoposid verursachten Schaden entfernen. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Zellen im Anschluss an die Behandlung überleben konnten oder starben. Mithilfe einer Doppelfärbung mit Propidiumiodid und Annexin-V-FITC wurde dabei zwischen vitalen, nekrotischen und apoptotischen Zellen unterschieden (9.6.1). Da Etoposid in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst vorliegt, wurde zusätzlich ein Vergleich unbehandelter Kontrollzellen mit einer Lösungsmittelkontrolle durchgeführt (Abb. 17). Wegen der starken Eigenfluoreszenz von Doxorubicin, die in diesem Experiment störend ist, wurde bei mit Doxorubicin behandelten Zellen keine Charakterisierung des Zelltods vorgenommen. Hier wurde stattdessen ein Viabilitätsassay über mehrere Tage durchgeführt.

Der Anteil vitaler THP-1-Zellen nahm bereits nach der dreistündigen Inkubation mit Etoposid signifikant ab (81,74 % \pm 1,26 % gegen KO: 86,98 % \pm 0,85 %; $p = 0,004$) (Abb. 16). Drei Stunden nach Mediumswechsel hatten nur 50,08 % der THP-1-Zellen überlebt. Dieses Niveau blieb bis 72 h nach Beginn des zytostatikafreien Intervalls bestehen. Der Prozentsatz apoptotischer Zellen nahm bis sechs Stunden nach Mediumswechsel zunächst zu (6 h: 37,34 % \pm 3,23 %) und ging anschließend kontinuierlich zurück, bis er sich nach 72 h wieder dem Wert der Kontrolle näherte. Auch der Anteil nekrotischer Zellen nahm nach der Behandlung zu. Er blieb über den Zeitraum der gesamten Messung signifikant gegen die Kontrolle erhöht.

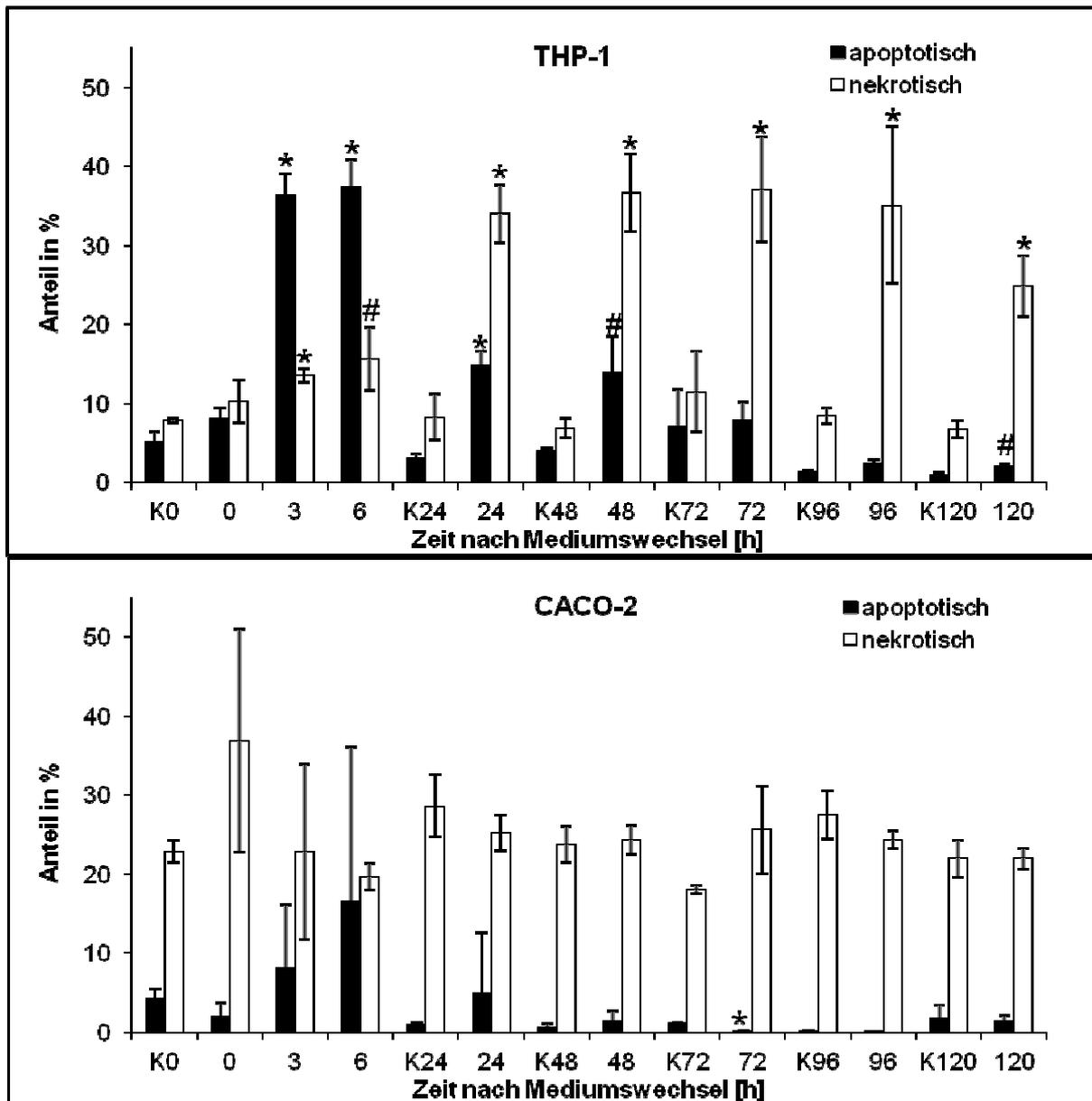


Abb. 16 Zelltodanalytik – Unterscheidung von Apoptose und Nekrose nach dreistündiger Behandlung mit 5 μ M Etoposid und anschließender Inkubation in zytostatikafreiem Medium ($n = 3$, Mittelwerte \pm Standardabweichungen; * = $p \leq 0,01$; # = $p \leq 0,05$ gegen die dazugehörige Kontrolle).

Der Anteil vitaler CACO-2-Zellen blieb über den gesamten Zeitraum auf einem ähnlich hohen Niveau. Lediglich unmittelbar nach Inkubationsende trat eine deutlichere Reduktion (K0: 72,85 % \pm 2,42 %; 0 h: 61,08 % \pm 12,57 %) auf, die jedoch nicht signifikant war. Gleichzeitig stieg die Zahl nekrotischer Zellen - ebenfalls ohne Signifikanz (36,89 % \pm 14,12 %). Der Prozentsatz apoptotischer Zellen erreichte sechs Stunden nach Mediumswechsel ein Maximum von 16,66 % \pm 19,49 % und sank dann wieder auf Kontrollniveau. Insgesamt kam es bei den CACO-2-Zellen zu keinen relevanten Veränderungen der einzelnen Fraktionen.

Die Zelltoduntersuchungen konnten demnach einen Unterschied zwischen beiden Zelllinien feststellen. Die THP-1-Zellen reagierten empfindlicher als die CACO-2-Zellen und zeigten bis 120 h nach Mediumswechsel einen signifikant höheren Nekrose-Anteil als die Kontrolle.

Außerdem waren hier drei und sechs Stunden nach Behandlung mehr apoptotische als nekrotische Zelle zu verzeichnen. Bei den CACO-2 blieb der Anteil apoptotischer Zellen immer unter dem der nekrotischen Zellen. Da die CACO-2 stark zusammenhängende Cluster bilden, wurden sie zur Vereinzelung der Zellen sehr kräftig auf- und abpipettiert. Der relativ hohe Anteil nekrotischer Zellen schon in der Kontrolle ist darauf zurückzuführen.

Tab. 3 Zelltodanalytik THP-1

Zeit nach Mediums- wechsel [h]	vital [%]	STABW	apoptotisch [%]	STABW	nekrotisch [%]	STABW
K ₀	86,98	0,85	5,19	1,16	7,83	0,30
0	81,74	1,26	8,00	1,45	10,26	2,70
3	50,08	3,24	36,39	2,65	13,54	0,82
6	46,87	1,28	37,45	3,30	15,67	4,00
K ₂₄	88,72	3,46	3,03	0,51	8,25	2,96
24	51,27	5,01	14,72	1,91	34,01	3,66
K ₄₈	89,14	1,08	3,98	0,29	6,88	1,23
48	49,56	4,36	13,84	4,61	36,60	4,88
K ₇₂	81,44	9,70	7,09	4,65	11,47	5,14
72	55,00	8,41	7,91	2,32	37,11	6,58
K ₉₆	90,17	0,86	1,37	0,17	8,45	1,02
96	62,60	9,65	2,30	0,55	35,10	9,88
K ₁₂₀	92,34	0,86	0,95	0,30	6,71	1,14
120	73,16	3,63	2,02	0,30	24,82	3,87

Tab. 4 Zelltodanalytik CACO-2

Zeit nach Mediums- wechsel [h]	vital [%]	STABW	apoptotisch [%]	STABW	nekrotisch [%]	STABW
K ₀	72,85	2,42	4,27	1,12	22,87	1,35
0	61,08	12,57	2,03	1,71	36,89	14,12
3	69,01	4,75	8,11	8,00	22,88	11,10
6	63,67	18,24	16,66	19,49	19,67	1,63
K ₂₄	70,44	3,72	0,95	0,29	28,61	3,93
24	74,89	2,46	0,60	0,44	23,76	2,22
K ₄₈	77,55	2,16	0,23	0,10	22,41	2,20
48	74,62	2,42	1,39	1,30	24,35	1,76
K ₇₂	80,84	0,49	1,09	0,17	18,07	0,50
72	74,22	5,61	0,16	0,07	25,62	5,55
K ₉₆	72,40	3,02	0,10	0,06	27,51	3,02
96	75,55	1,10	0,05	0,04	24,39	1,07
K ₁₂₀	76,36	2,31	1,66	1,69	21,98	2,32
120	76,54	1,32	1,51	0,57	21,95	1,37

Der Vergleich der unbehandelten Kontrollen mit einer Lösungsmittelkontrolle (0,1 % Dimethylsulfoxid in Medium; Inkubationszeit: 3 h, dann Mediumswechsel gegen normales Wachstumsmedium) zeigte, dass DMSO unter diesen Bedingungen keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen hatte.

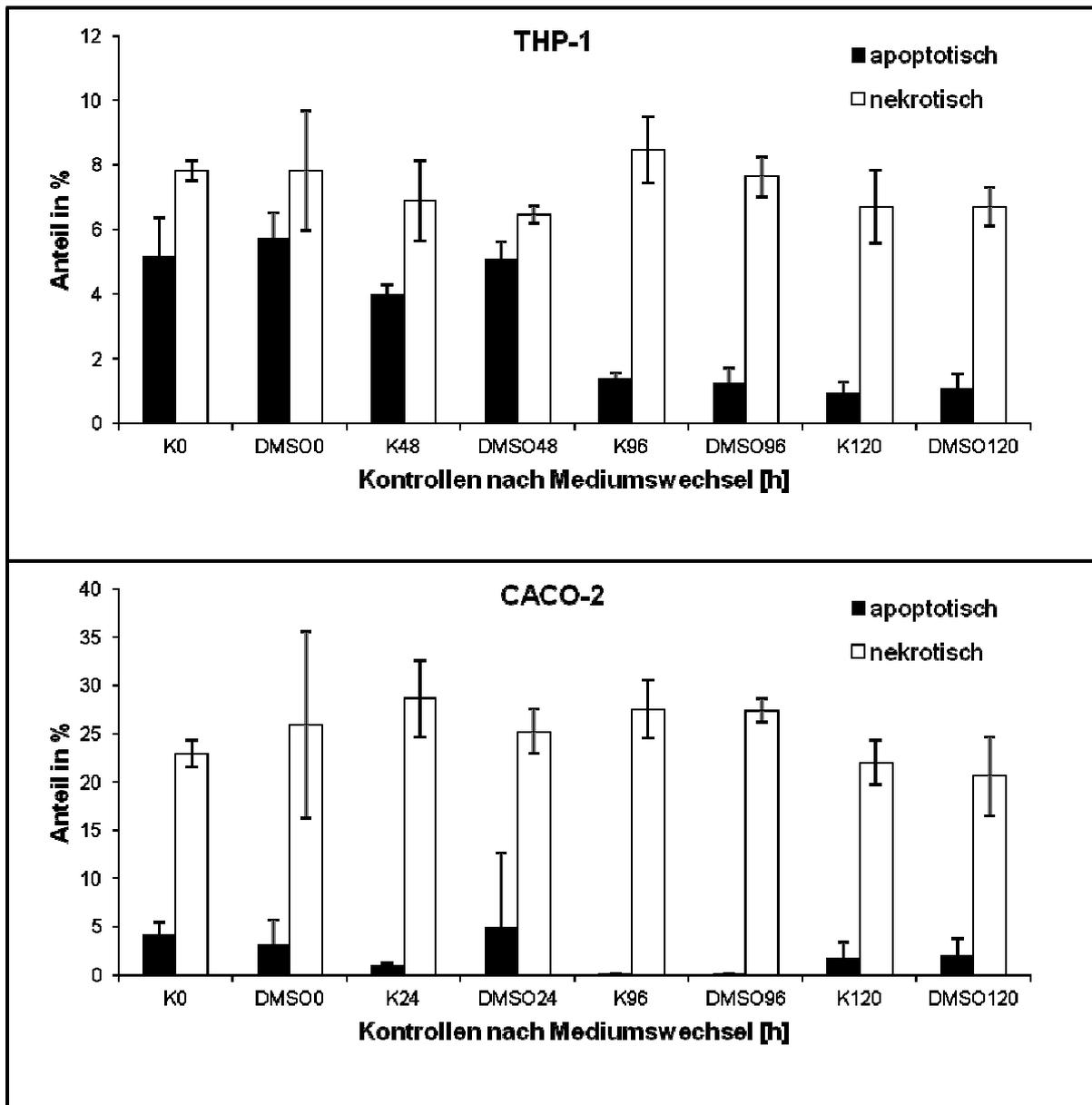


Abb. 17 Vergleich von Kontrollen und Lösungsmittelkontrollen (Dimethylsulfoxid) nach Doppelfärbung mit Annexin-V-FITC und Propidiumiodid zu verschiedenen Zeitpunkten nach Mediumswechsel. Dargestellt ist der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen als Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

4.4 Zellviabilität nach Behandlung mit Doxorubicin

Der Einfluss von Doxorubicin auf die Viabilität der Zellen wurde mit dem CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay untersucht (9.4). Die Zellen wurden drei Stunden mit 5 μ M Doxorubicin behandelt und anschließend in zytostatikafreiem Medium inkubiert. Die Analyse der behandelten Zellen und einer Kontrolle erfolgte jeweils 24 h, 48 h und 144 h nach Mediumswechsel.

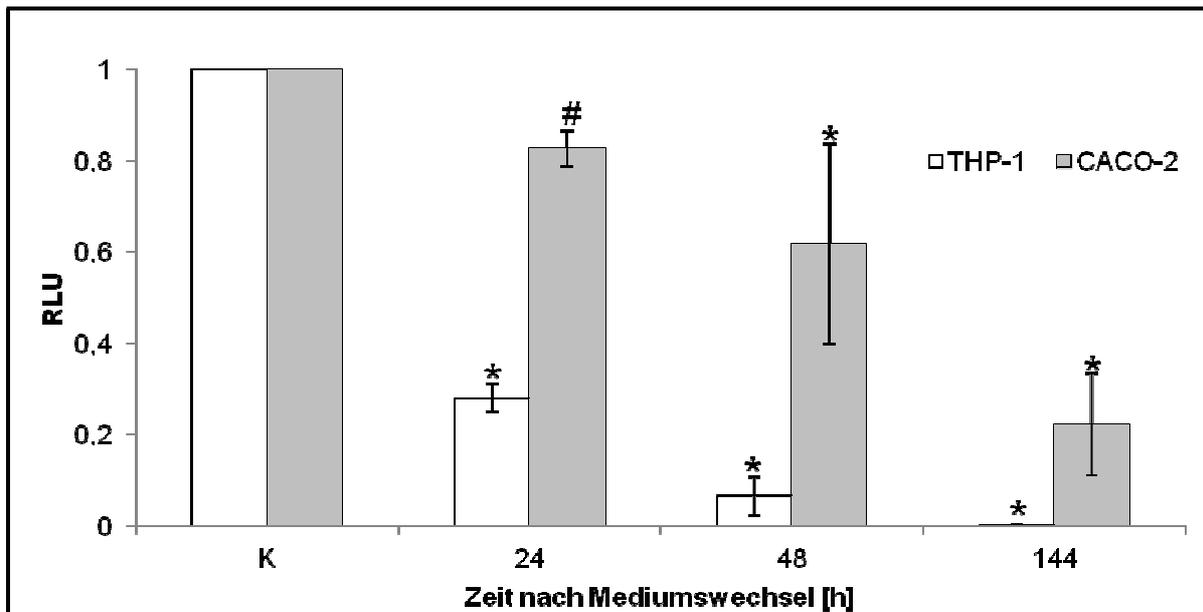


Abb. 18 Zellviabilität nach dreistündiger Behandlung mit 5 µM Doxorubicin und anschließender zytostatikafreier Inkubation für 24 h/48 h/144 h (n = 3; Mittelwert ± Standardabweichung; * = p ≤ 0,01; # = p ≤ 0,05 gegen die Kontrolle). Die Werte sind auf die Kontrolle normiert. RLU = relative light units

Die Viabilität beider Zelllinien nahm ab. Die THP-1-Zellen reagierten schneller und stärker als die CACO-2-Zellen. Nach 24 h betrug der gemessene Wert nur noch 28,09 ± 3,12 (p = 0,0006 gegen die Kontrolle). Nach 144 h war keine metabolische Aktivität mehr vorhanden.

Die CACO-2-Zellen zeigten nach der Inkubation mit Doxorubicin ebenfalls eine reduzierte Viabilität. Der gemessene Wert lag nach 24 h immer noch bei 82,63 ± 3,95, nach 48 h bei 61,75 ± 21,99 und nach 144 h bei 22,31 ± 11,22. Es konnte also auch sechs Tage nach Inkubationsende noch ATP detektiert werden.

Die Verläufe der beiden Kurven unterschieden sich zu jedem Messzeitpunkt signifikant (24 h: 0,00005; 48 h: 0,01, 144 h: 0,03).

4.5 Koloniebildungsvermögen von CACO-2-Zellen

Um den Einfluss der zytostatischen Behandlung auf das Proliferationsvermögen zu untersuchen, wurde das Koloniebildungsvermögen der adhärennten Zelllinie CACO-2 nach Behandlung beobachtet. Die Zellen wurden dafür drei Stunden mit Doxorubicin bzw. Etoposid behandelt und anschließend zwei Wochen in zytostatikafreiem Medium inkubiert (9.4.3).

Tab. 5 Bedingungen Colony Formation Assay

Zytostatikum	Inkubationszeit	Konzentrationen [μM]	Plating Efficiency
Etoposid	3 h	0,5/5/50	30,00%
Doxorubicin	3 h	0,5/5/50	30,02 %

Die Behandlungen mit 0,5 μM ($53,92 \pm 13,30$ Kolonien) und 5 μM ($53,17 \pm 21,01$ Kolonien) Etoposid hatten keine signifikante Auswirkung auf das Proliferationsvermögen der CACO-2-Zellen relativ zur Kontrolle ($60,04 \pm 8,43$ Kolonien). Eine dreistündige Behandlung mit 50 μM Etoposid bewirkte hingegen eine hoch signifikante Verminderung der Kolonien ($7,75 \pm 2,63$ Kolonien; p gegen die Kontrolle = 0,00002).

Eine dreistündige Inkubation mit 0,5 μM Doxorubicin führte zu einer signifikanten Abnahme der Kolonien ($37,22 \pm 0,51$ Kolonien; p gegen die Kontrolle = 0,01) im Vergleich zur Kontrolle ($60 \pm 9,28$ Kolonien). Durch die Behandlung mit 5 μM nahm die Zahl der Kolonien noch stärker ab ($3,89 \pm 2,22$; p gegen die Kontrolle = 0,0005). Auch zu der niedrigeren Konzentration mit 0,5 μM wurde hier ein hoch signifikanter Unterschied erreicht (p = 0,00001). 50 μM Doxorubicin waren in der Lage, die Proliferation fast vollständig zu unterbinden ($0,5 \pm 0,71$ Kolonien; p = 0,000007).

Beide Topoisomerase II α -Inhibitoren konnten die Proliferation der CACO-2-Zellen hemmen. In äquimolaren Konzentrationen bewirkte Doxorubicin einen stärkeren Effekt als Etoposid (Abb. 19).

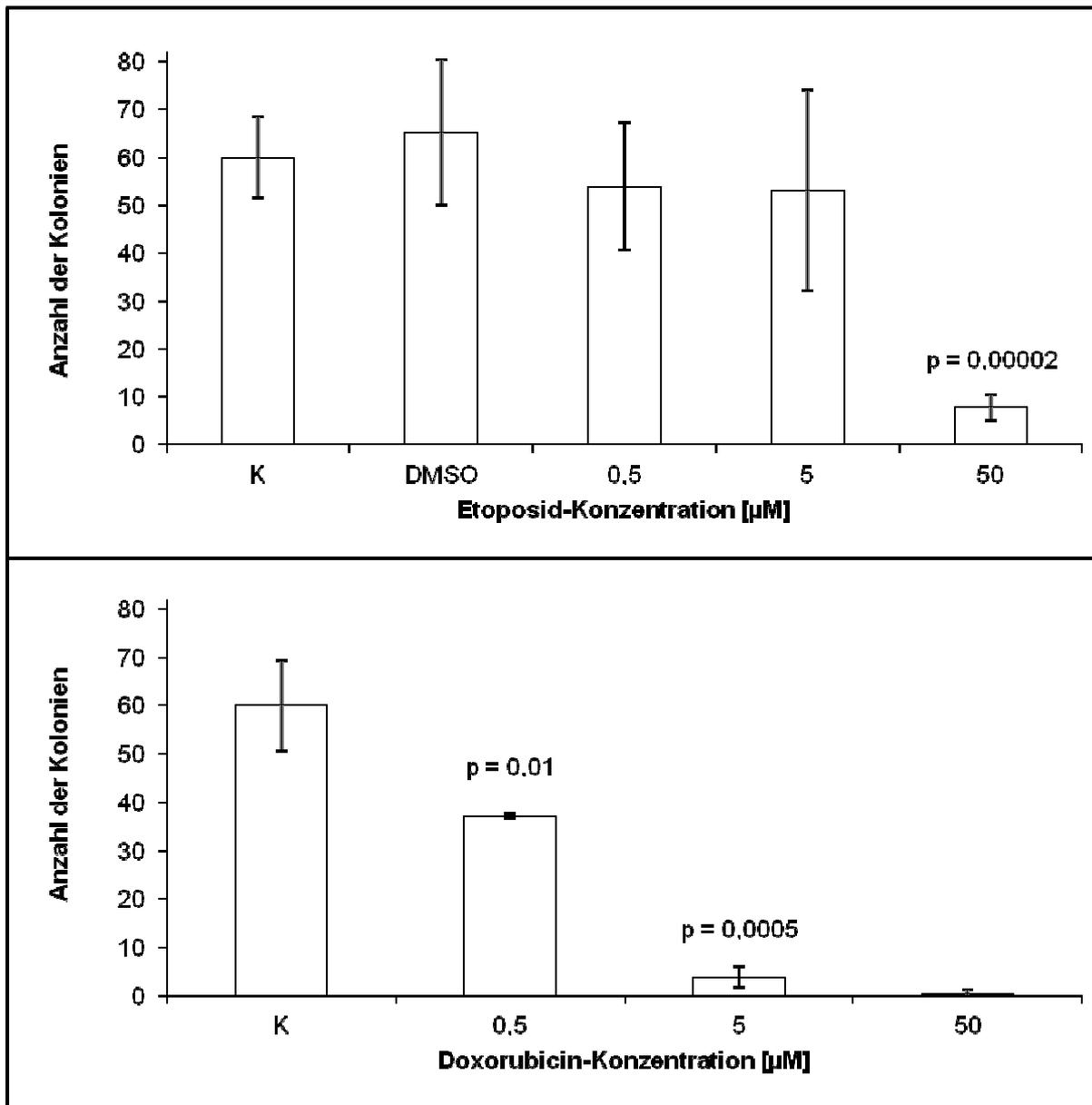


Abb. 19 Koloniebildungsvermögen von CACO-2-Zellen nach Behandlung mit Etoposid ($n = 4$) bzw. Doxorubicin ($n = 3$; $50 \mu\text{M}$: $n = 2$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der in den Experimenten ermittelten Koloniezahlen (p -Werte gegen die Kontrolle).

4.6 Einfluss der Topoisomerase II α -Inhibitoren auf den Zellzyklus

Die Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen wurde durchflusszytometrisch gemäß der beschriebenen Methode analysiert (9.6.2). Um auszuschließen, dass das Lösungsmittel DMSO unter den gewählten Bedingungen einen Einfluss auf den Zellzyklus hat, wurde ein Vergleich von unbehandelten und mit 0,1 % DMSO behandelten Zellen (3 h Inkubation, dann Mediumswechsel) zu verschiedenen Zeiten durchgeführt. Dabei gab es keinen relevanten Einfluss auf die Verteilung der verwendeten Zellen auf die Zellzyklusphasen (Abb. 20).

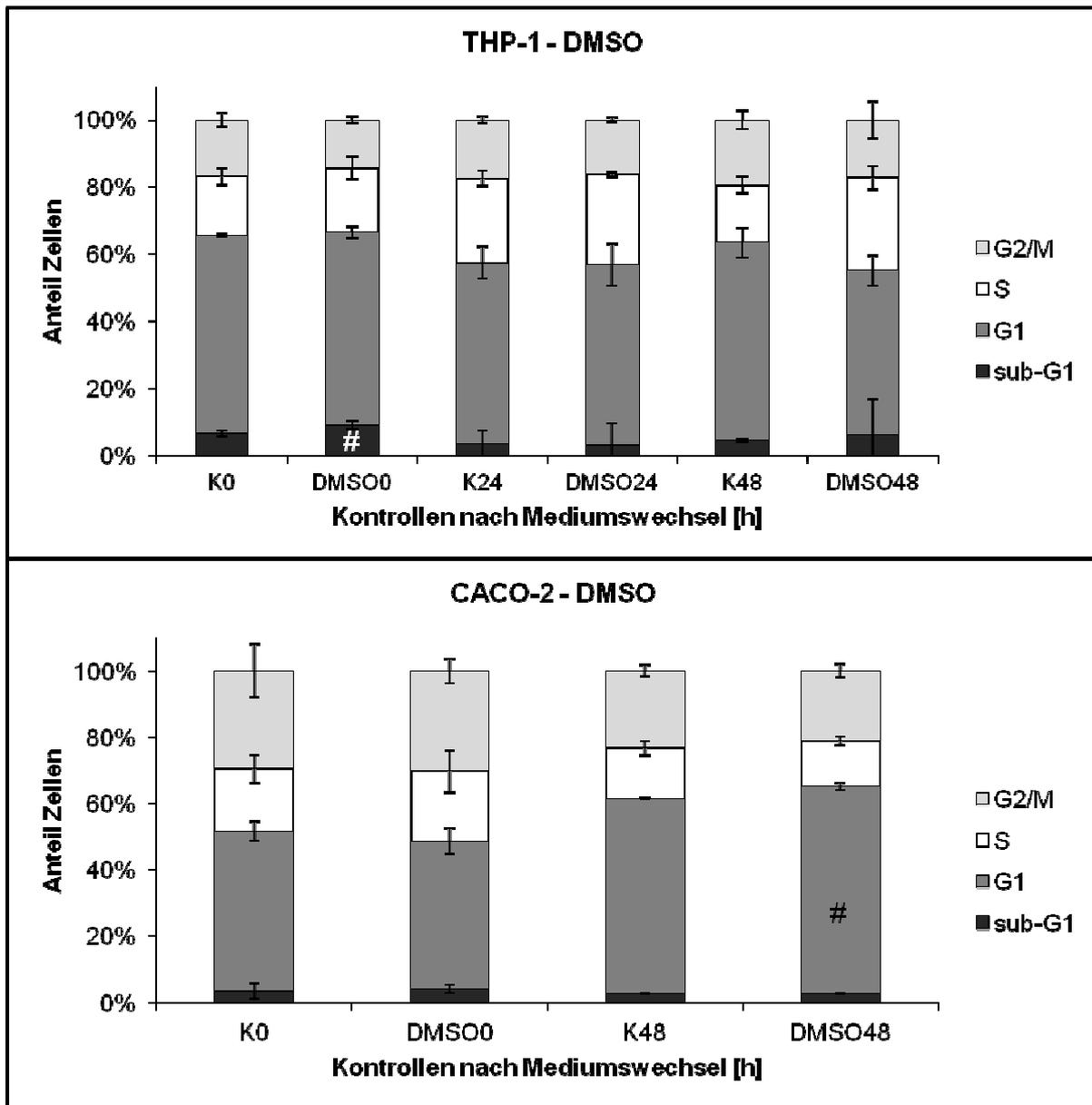


Abb. 20 Zellzyklusanalytik - Einfluss des Lösungsmittels (0,1 DMSO). Vergleich von Kontrollen mit Lösungsmittelkontrollen ($n = 3$; Mittelwerte \pm Standardabweichungen; # = $p \leq 0,05$ gegen die dazugehörige Kontrolle).

Die Ergebnisse der Behandlung mit Etoposid sind in Abb. 21 dargestellt.

In den THP-1-Zellen veränderte sich vor allem der sub-G1-Anteil der THP-1-Zellen. Dieser nahm nach der Etoposid-Inkubation zu und blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum gegenüber der Kontrolle erhöht. Nach 24 h betrug er $47,71 \% \pm 10,34 \%$ ($p = 0,002$) gegen K24 ($3,29 \% \pm 0,54 \%$). Parallel dazu nahm der G1-Anteil ab. Der Anteil der Zellen in der S-Phase schwankte und stieg im Vergleich zur Kontrolle nach 72 h signifikant an (K72: $12,91 \% \pm 10,34 \%$; 72 h: $21,08 \% \pm 2,47 \%$). Drei Stunden und sechs Stunden nach Mediumswechsel war der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase stark reduziert (K0: $16,84 \% \pm 1,95 \%$; 3 h: $3,84 \% \pm 0,92 \%$; $p = 0,0005$; 6 h: $1,87 \% \pm 0,61 \%$; $p = 0,0002$). Anschließend stieg der Wert wieder an.

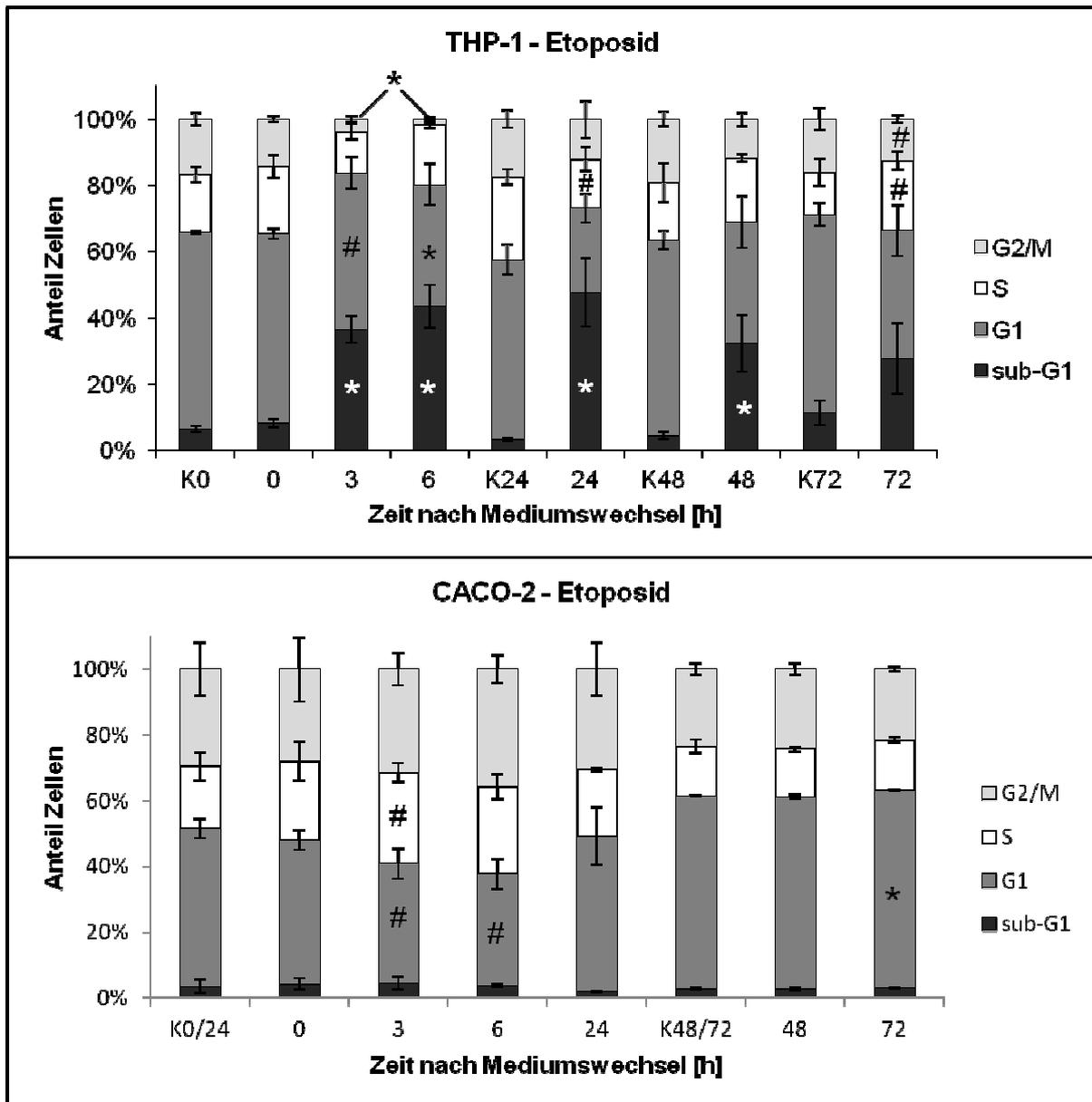


Abb. 21 Zellzyklusanalytik nach Behandlung mit 5 µM Etoposid und anschließender Inkubation in zytostatikafreiem Medium (n=3, Mittelwerte ± Standardabweichungen; * = p ≤ 0,01; # = p ≤ 0,05 gegen die dazugehörige Kontrolle).

Bei den CACO-2-Zellen fielen die Unterschiede zwischen Kontrollen und behandelten Zellen geringer aus und waren von kurzer Dauer. Anders als bei den THP-1-Zellen blieb der sub-G1-Anteil konstant. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen aus der Zelltodanalytik. Der G1-Anteil sank zunächst von 48,28% ± 2,93 % auf 34,15% ± 4,52 % (6 h, p = 0,01). Danach stieg er wieder an, bis er schließlich nach 48 h das Kontrollniveau erreichte. Der Prozentsatz der Zellen, die sich in der S-Phase befinden nahm bis drei Stunden nach Inkubationsende zu (K0: 18,75 % ± 4,27 %; 3 h: 27,75 % ± 2,83 %; p = 0,04). Anschließend fiel der Wert wieder auf das Ausgangsniveau.

Der G2/M-Anteil stieg bis sechs Stunden nach Mediumswechsel leicht an. Diese Veränderung ist allerdings nicht signifikant.

Die Behandlung mit Doxorubicin ergab folgendes Bild (Abb. 22): Auch hier nahm der sub-G1-Anteil der THP-1-Zellen zu. Nach 24 h betrug er $15,68 \% \pm 12,97 \%$ (K24: $3,32 \% \pm 0,42 \%$). Nach 72 h handelte es sich bei $17,45 \% \pm 2,33 \%$ der mit Doxorubicin behandelten Zellen um Zellen mit reduziertem DNA-Gehalt (p gegen K72 = 0,005; K72: $6,46 \% \pm 2,44 \%$). Im Vergleich zur Etoposid-Inkubation war der Anteil an sub-G1-Zellen geringer.

Der G1-Anteil lag zu Beginn bei $51,31 \% \pm 11,85 \%$ (K0). Bis sechs Stunden nach Inkubationsende sank er auf $36,94 \% \pm 6,12 \%$, und näherte sich dann nach 24 h ($42,07 \% \pm 12,99 \%$) wieder der Kontrolle (K24: $46,10 \% \pm 4,67 \%$) an.

Der Anteil der Zellen, die sich in der S-Phase befanden, nahm nur geringfügig zu (1,36fach nach 6 h bzw. 1,32fach nach 24 h bezogen auf K0 bzw. K24).

Der G2/M-Anteil nahm bis 3 h nach Mediumswechsel zu. Nach 24 h war dann ein im Vergleich zur Kontrolle erniedrigter Wert zu verzeichnen (K24: $29,00\% \pm 7,37 \%$; 24 h: $13,87 \pm 11,4 \%$). Zu signifikanten Veränderungen kam es ausschließlich bei den sub-G1-Zellen (6 h, 48h und 72 h; $p \leq 0,01$). Nach 48 h und 72 h konnte nur noch zwischen sub-G1-Zellen und den restlichen Zellen unterschieden werden. Eine genauere Auswertung war nicht möglich.

Die Doxorubicin-Behandlung löste bei den CACO-2-Zellen eine Verschiebung der Zellen in die G2/M-Phase aus. Dieser Effekt war am deutlichsten nach 24 h ausgeprägt (K0/24: $24,67 \% \pm 11,44 \%$; 24 h: $69,46 \% \pm 0,87 \%$; p gegen K0/24 = 0,000003). Danach ging der Anteil zwar zurück, blieb aber gegenüber dem Kontrollniveau signifikant erhöht.

Der sub-G1-Anteil blieb während der gesamten Messung niedrig.

Der Anteil der Zellen, die sich in der G1-Phase befanden, war im Vergleich zur Kontrolle ab sechs Stunden nach Mediumswechsel erniedrigt (6h bis 72h: $p \leq 0,05$ gegen die Kontrolle). Nach 24 h waren nur noch $13,78 \% \pm 1,30 \%$ der Zellen in der G1-Phase. Danach nahm der Wert wieder zu. Der Prozentsatz der S-Phase-Zellen nahm nach 24 h ab (K0/24: $26,22 \% \pm 6,57 \%$; 24 h: $14,21 \% \pm 2,68 \%$) und war signifikant gegen die Kontrolle. Die folgenden Werte unterschieden sich nicht mehr von dem S-Phase-Anteil unbehandelter Zellen.

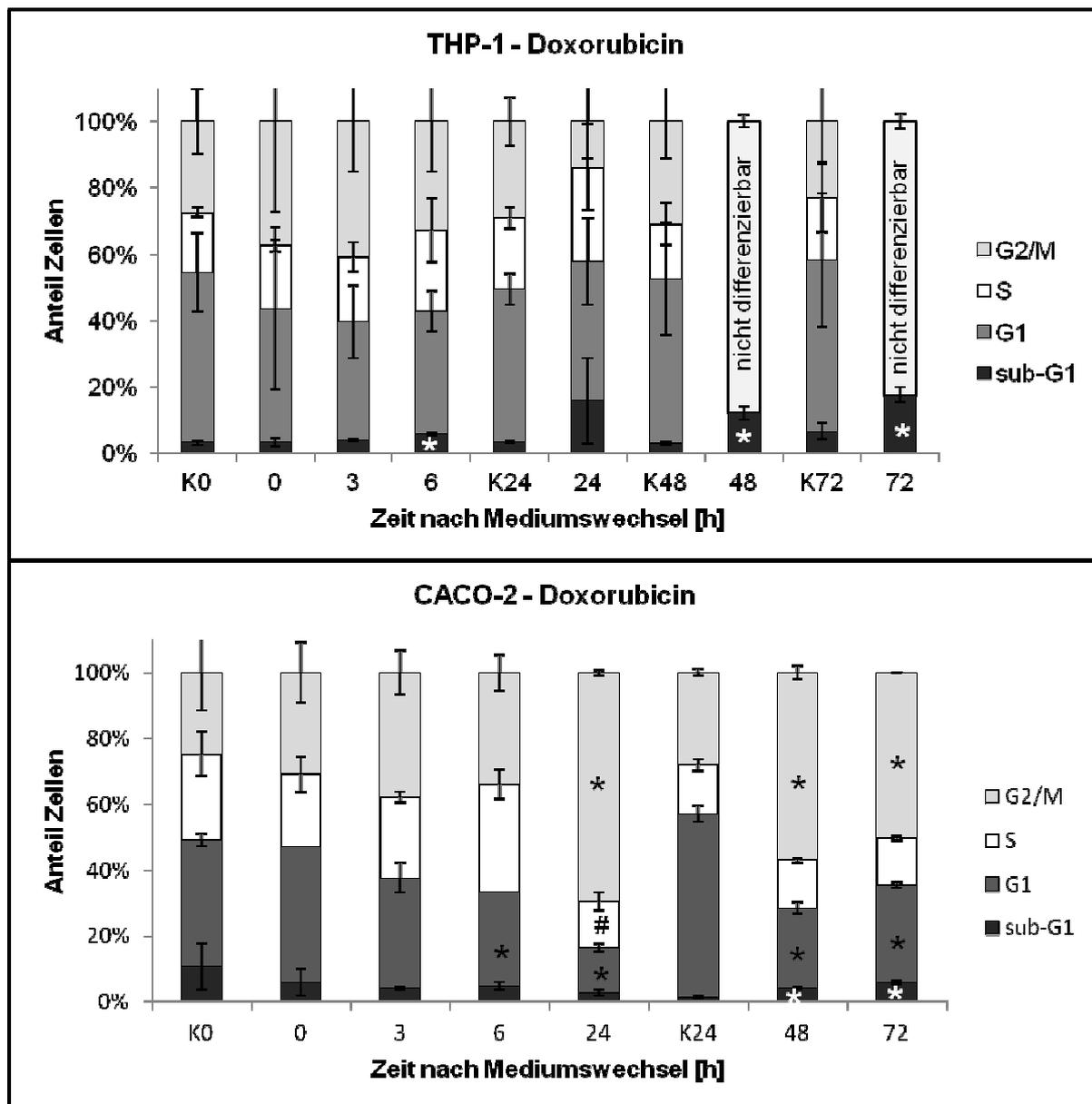


Abb. 22 Zellzyklusanalytik nach Behandlung mit 5 μ M Doxorubicin und anschließender Inkubation in zytostatikafreiem Medium ($n = 3$, Mittelwerte \pm Standardabweichungen; * = $p \leq 0,01$; # = $p \leq 0,05$ gegen die dazugehörige Kontrolle). Die Fehlerbalken der G2/M-Phase sind nach oben abgeschnitten. Die Standardabweichung ist symmetrisch um den Mittelwert verteilt.

4.7 Analyse der Expression ausgewählter Proteine

DNA-Doppelstrangbrüche werden vor allem durch die beiden Hauptreparaturwege NHEJ (non-homologous end joining) und HR (homologous recombination) repariert. Für die Proteinanalytik wurden deshalb zunächst Proteine ausgewählt, die diesen beiden Reparaturwegen angehören. Außerdem wurde das Protein, dessen Funktion durch Etoposid und Doxorubicin gehemmt wird – die Topoisomerase II α – untersucht.

Beide Zelllinien wurden drei Stunden mit 5 μ M Etoposid bzw. 5 μ M Doxorubicin behandelt. Anschließend wurde das zytostatikahaltige Medium durch normales Wachstumsmedium

ersetzt. Die Proteine wurden 0/1/3/4,5/6/12 h und 24 h nach dem Mediumswechsel isoliert (9.5) und anschließend semi-quantitativ bestimmt.

4.7.1 Proteine des NHEJ und Topoisomerase II α

Nach der Behandlung der THP-1 mit Etoposid (Abb. 23 oben) stiegen die NHEJ-Proteine Ku70 und Ku86 nur geringfügig an. Der Gehalt an DNA-PKcs nahm stärker zu und erreichte nach 24 h fast das Achtfache des Kontrollwertes (ohne Signifikanz). Die Menge an Topoisomerase II α -Protein erhöhte sich ebenfalls. Nach 24 h lag sie bei $5,83 \pm 2,08$ ($p = 0,02$).

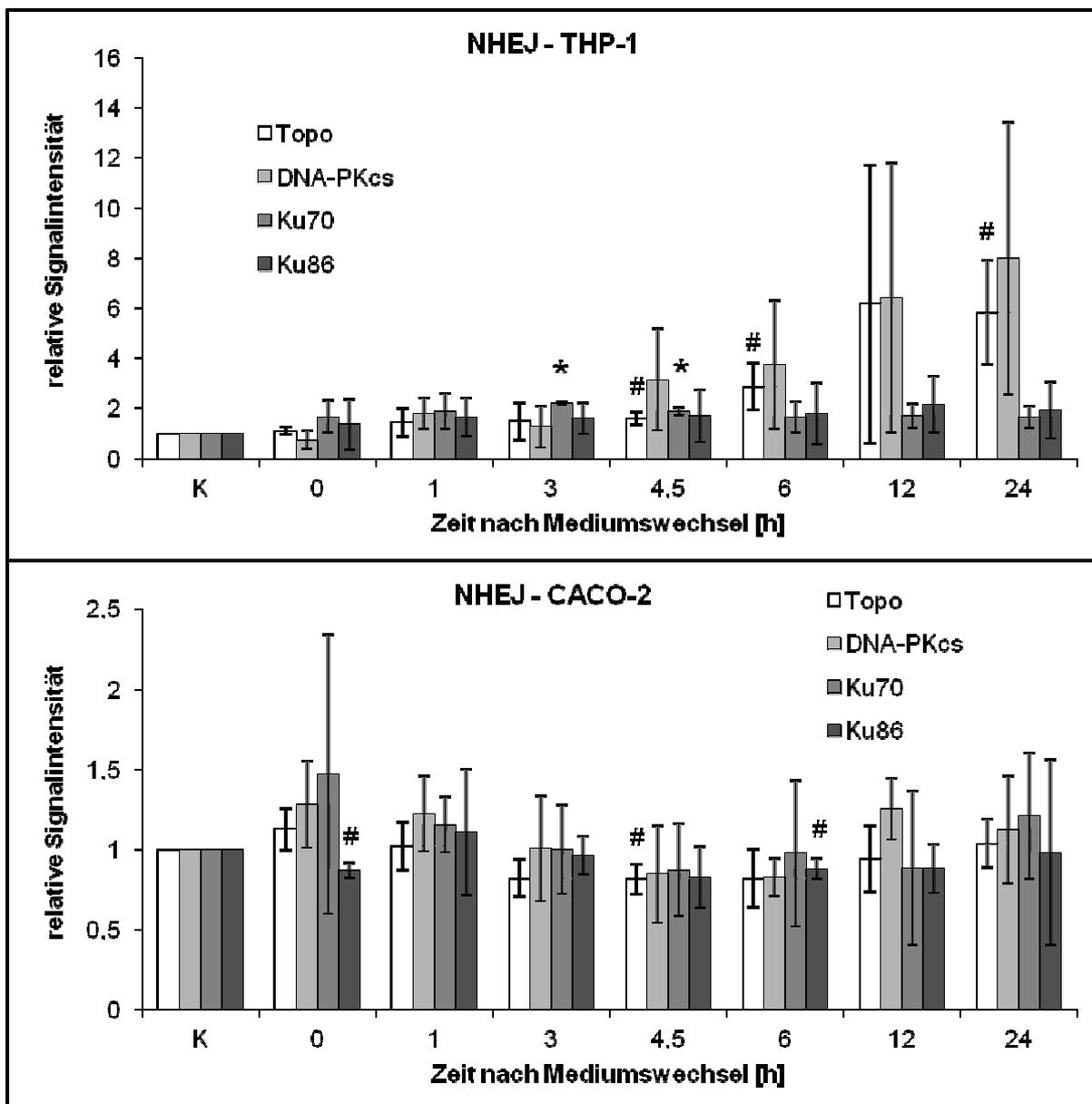


Abb. 23 Proteine des NHEJ nach Behandlung mit Etoposid. Die Werte wurden auf die Kontrolle (K) normiert ($n = 3$, Mittelwerte \pm Standardabweichungen; * = $p \leq 0,01$; # = $p \leq 0,05$ gegen die Kontrolle)

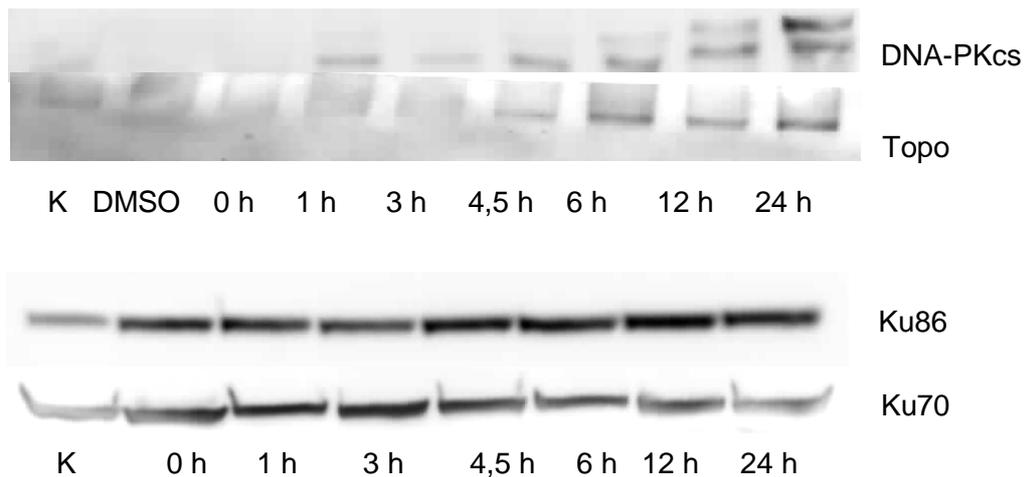


Abb. 24 Western Blot. NHEJ-Proteine und Topoisomerase II α in THP-1-Zellen nach Etoposid-Behandlung. DNA-PKcs: 420 kDa, Topo: 170 kDa, Ku86: 86 kDa, Ku70: 70 kDa.

Die Veränderungen der Proteine der CACO-2-Zellen nach der Inkubation mit Etoposid (Abb. 23 unten) waren nicht von relevantem Ausmaß.

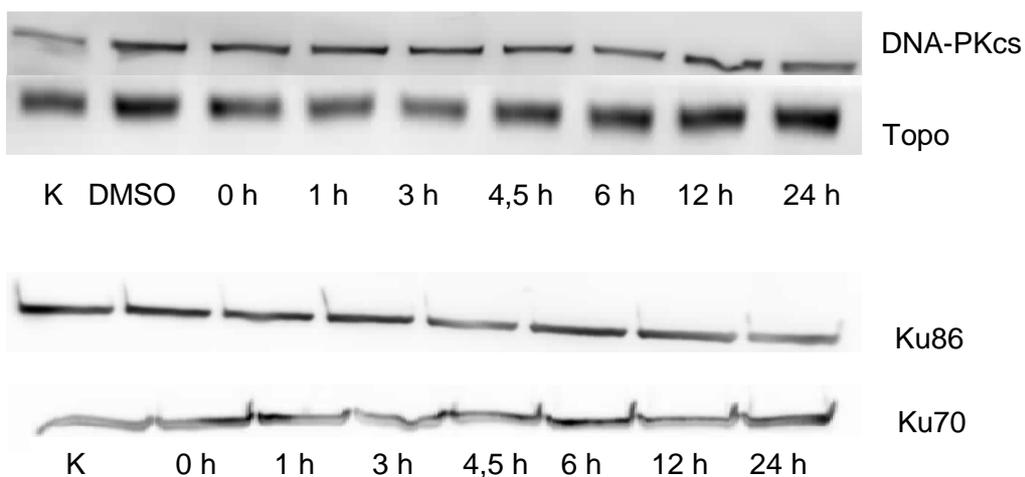


Abb. 25 Western Blot. NHEJ-Proteine und Topoisomerase II α in CACO-2-Zellen nach Etoposid-Behandlung. DNA-PKcs: 420 kDa, Topo: 170 kDa, Ku86: 86 kDa, Ku70: 70 kDa.

Auch nach der Behandlung der Zellen mit Doxorubicin reagierten die THP-1-Zellen mit einer Veränderung ihrer Proteinlevels (Abb. 26 oben). Die stärkste Zunahme war bei der Topoisomerase II α zu beobachten. Die Werte drei Stunden ($4,13 \pm 0,33$; $p = 0,00008$), 4,5 Stunden ($4,53 \pm 1,42$; $p = 0,01$) und sechs Stunden ($5,30 \pm 2,30$; $p = 0,03$) nach Mediumswechsel waren signifikant gegen die Kontrolle. Die NHEJ-Proteine Ku70 und Ku86 stiegen nur leicht an und erreichten ihr Maximum nach 12 h (Ku86: $1,94 \pm 0,35$) bzw. 24 h (Ku70: $1,67 \pm 0,00$). Wie schon nach der Behandlung mit Etoposid reagierten die THP-1-Zellen auch auf das Doxorubicin mit einem erhöhten Gehalt an DNA-PKcs-Protein.

Nach sechs Stunden ergab sich ein gegen die Kontrolle signifikanter Wert von $3,47 \pm 1,16$ ($p = 0,02$). Anschließend sank der DNA-PKcs-Gehalt wieder.

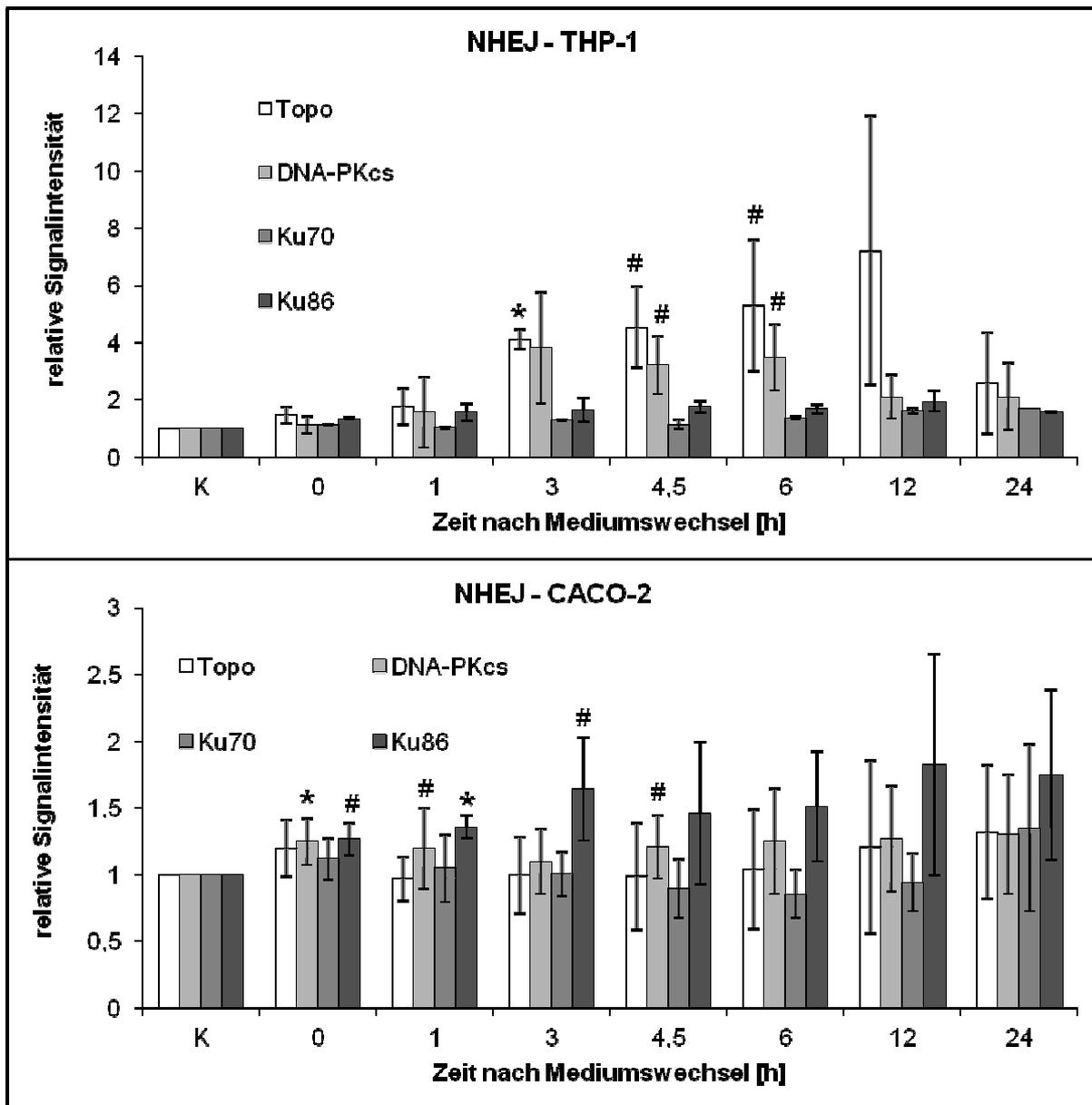


Abb. 26 Proteine des NHEJ nach Behandlung mit Doxorubicin. Die Werte wurden auf die Kontrolle (K) normiert ($n = 3$, Mittelwerte \pm Standardabweichungen; * = $p \leq 0,01$; # = $p \leq 0,05$ gegen die Kontrolle; CACO-2: DNA-PKcs, Topo $n = 4$; THP-1: Ku86 und Ku70 $n=2$).

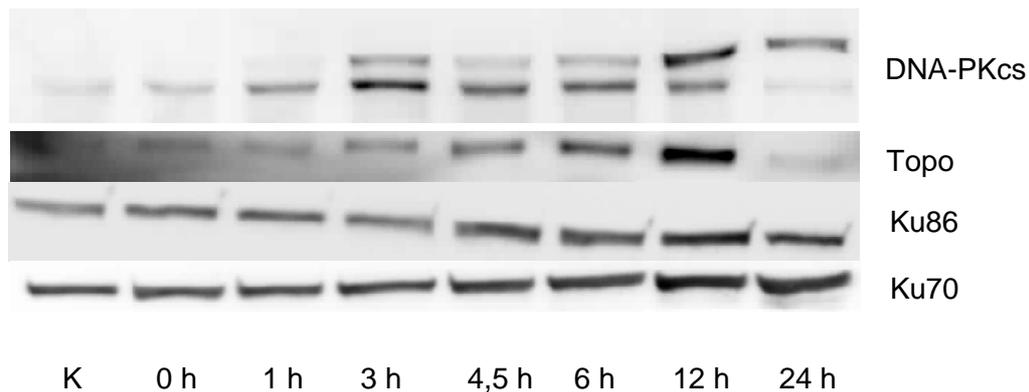


Abb. 27 Western Blot. NHEJ-Proteine und Topoisomerase II α in THP-1-Zellen nach Doxorubicin-Behandlung. DNA-PKcs: 420 kDa, Topo: 170 kDa, Ku86: 86 kDa, Ku70: 70 kDa.

Die CACO-2-Zellen zeigten auch nach der Doxorubicin-Behandlung kaum eine Veränderung (Abb. 26 unten). Lediglich der Gehalt an Ku86 zeigte eine geringfügig steigende Tendenz. Signifikant erhöht waren die Werte nach einer Stunde ($1,36 \pm 0,09$; $p = 0,002$) und nach drei Stunden ($1,64 \pm 0,39$; $p = 0,05$).

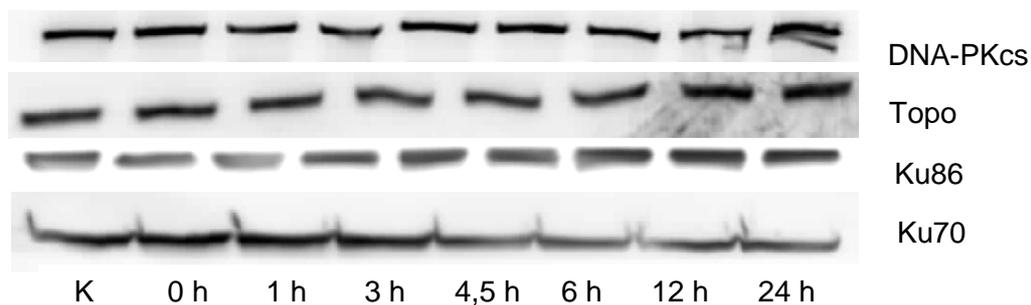


Abb. 28 Western Blot. NHEJ-Proteine und Topoisomerase II α in CACO-2-Zellen nach Doxorubicin-Behandlung. DNA-PKcs: 420 kDa, Topo: 170 kDa, Ku86: 86 kDa, Ku70: 70 kDa.

4.7.2 Proteine der Homologen Rekombination

Während der Rad51-Gehalt in den THP-1-Zellen über die Dauer der Behandlung konstant blieb, stieg der Rad54-Gehalt an. Der Werte nach sechs ($2,66 \pm 0,19$; p gegen K = 0,0001) und zwölf Stunden ($3,27 \pm 0,51$; $p = 0,001$) sind hoch signifikant gegen den der Kontrolle.

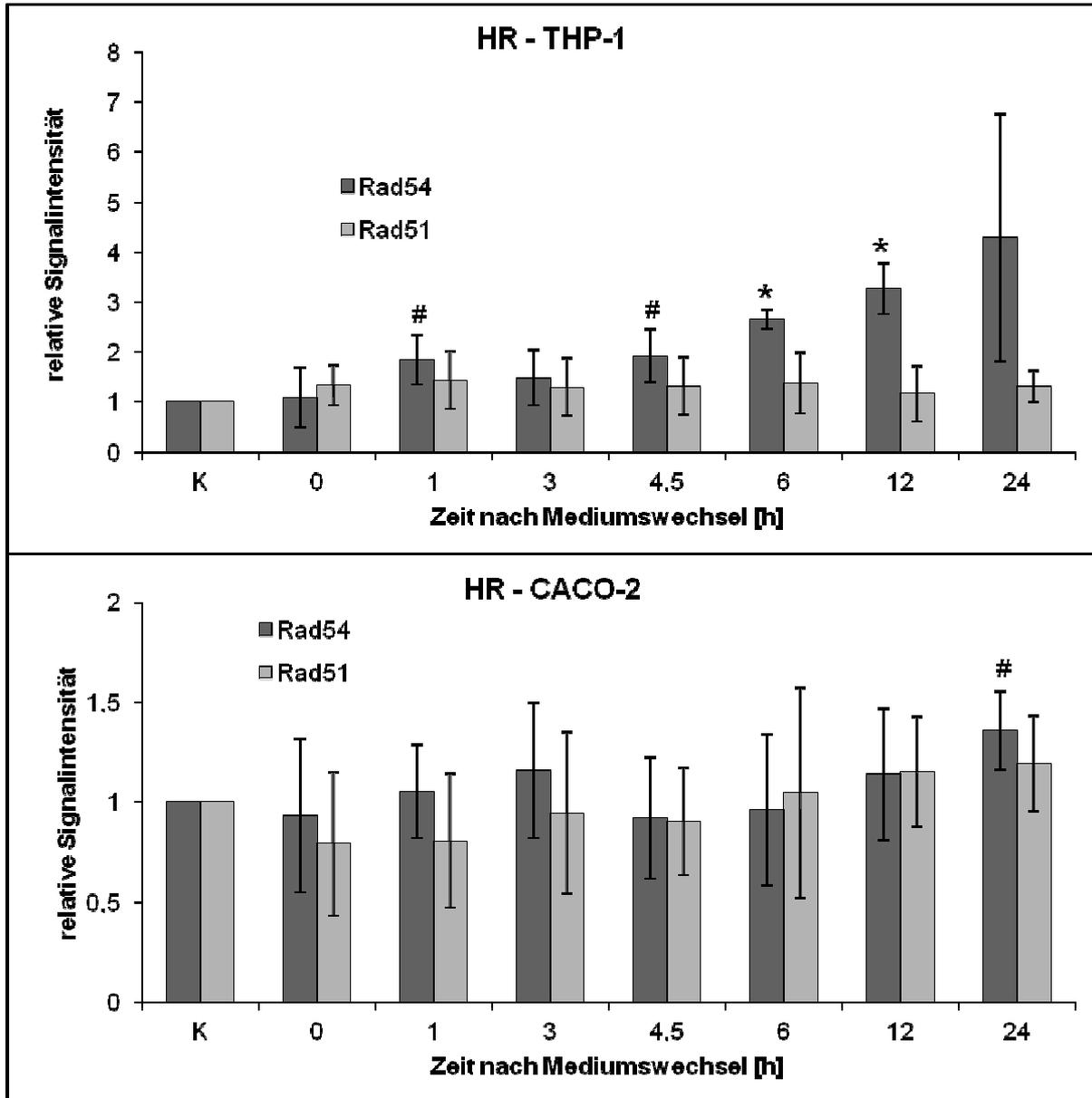


Abb. 29 Proteine der HR nach Behandlung mit Etoposid. Die Werte wurden auf die Kontrolle (K) normiert ($n = 3$, Mittelwerte \pm Standardabweichungen; * = $p \leq 0,01$; # = $p \leq 0,05$ gegen die Kontrolle).

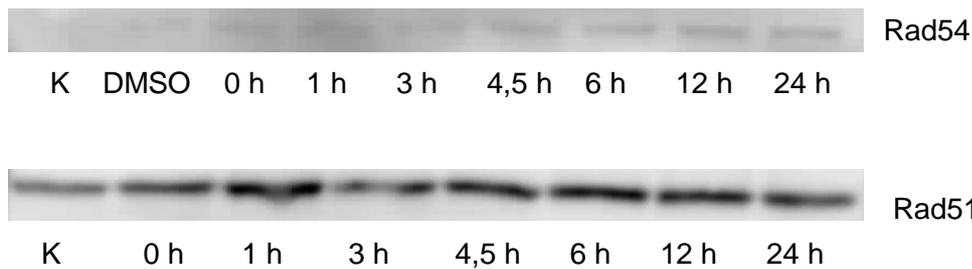


Abb. 30 Western Blot. HR-Proteine und Topoisomerase II α in THP-1-Zellen nach Etoposid-Behandlung. Rad54: 84 kDa, Rad51: 37 kDa.

Der Gehalt der HR-Proteine der CACO-2 änderte sich nach der dreistündigen Inkubation mit Etoposid nicht relevant.

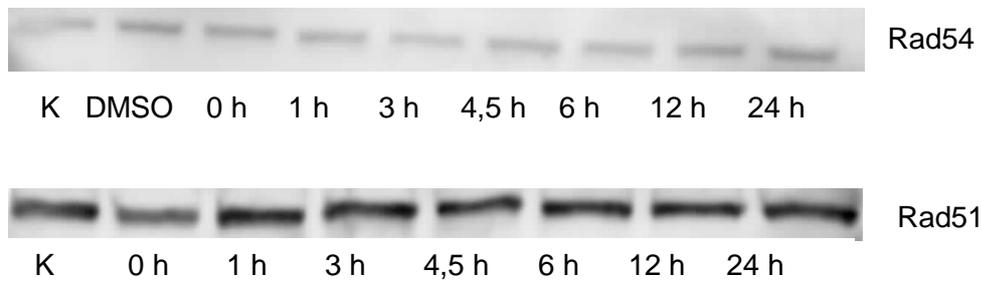


Abb. 31 Western Blot. HR-Proteine und Topoisomerase II α in CACO-2-Zellen nach Etoposid-Behandlung. Rad54: 84 kDa, Rad51: 37 kDa.

Die Doxorubicin-Inkubation führte bei den THP-1-Zellen (Abb. 32 oben) zu einer Verdopplung des Rad54-Gehalts im Vergleich zur Kontrolle (4,5h: $1,98 \pm 0,60$; $p = 0,05$; 6 h: $2,10 \pm 0,71$; $p = 0,055$). Nach 24 h lag der Gehalt der behandelten Zellen wieder auf dem Niveau un behandelter Zellen. Doxorubicin hatte zunächst keinen bedeutenden Einfluss auf die Menge des Rad51-Proteins. Nach 12 h und 24 h fielen die Werte unter den Kontrollwert (24 h: $0,25 \pm 0,06$; $n = 2$).

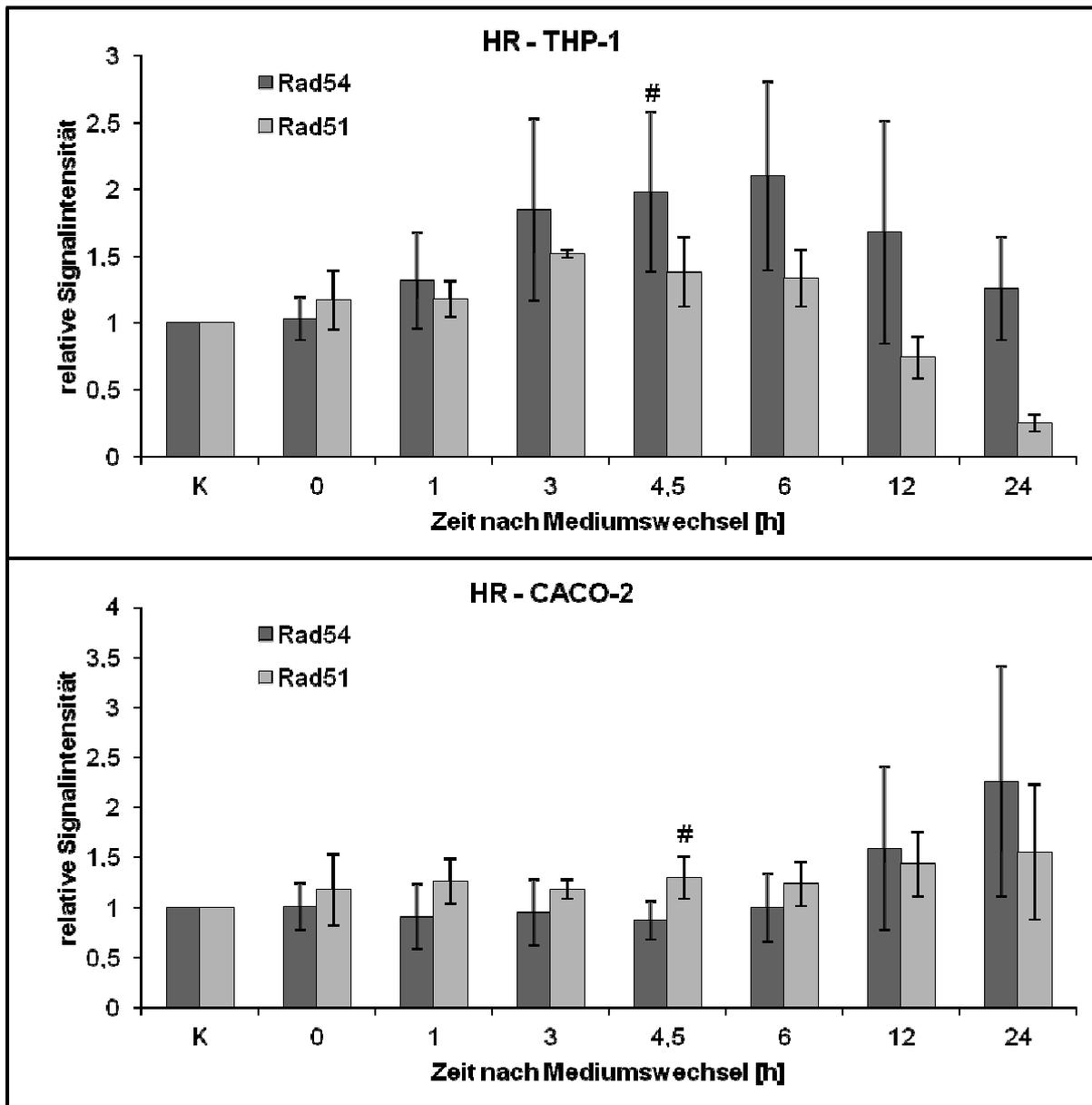


Abb. 32 Proteine der HR nach Behandlung mit Doxorubicin. Die Werte wurden auf die Kontrolle (K) normiert ($n = 3$, Mittelwerte \pm Standardabweichungen; * = $p \leq 0,01$; # = $p \leq 0,05$ gegen die Kontrolle; CACO-2: Rad54 $n = 4$; THP-1: Rad51 $n=2$).

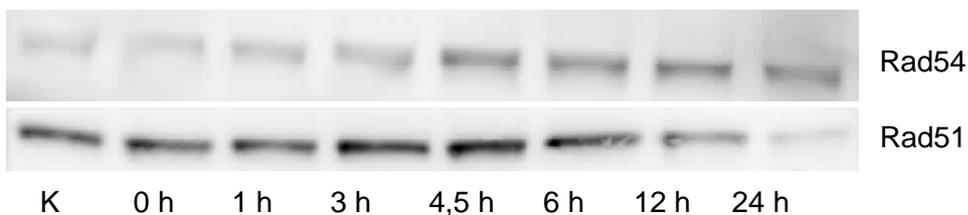


Abb. 33 Western Blot. HR-Proteine und Topoisomerase IIa in THP-1-Zellen nach Doxorubicin-Behandlung. Rad54: 84 kDa, Rad51: 37 kDa.

Die CACO-2-Zellen reagierten auch hier unempfindlich. Der Rad51-Gehalt stieg nicht relevant an. Der Rad54-Gehalt nimmt etwas stärker zu (24 h: $2,26 \pm 1,15$) – allerdings ohne Signifikanz.

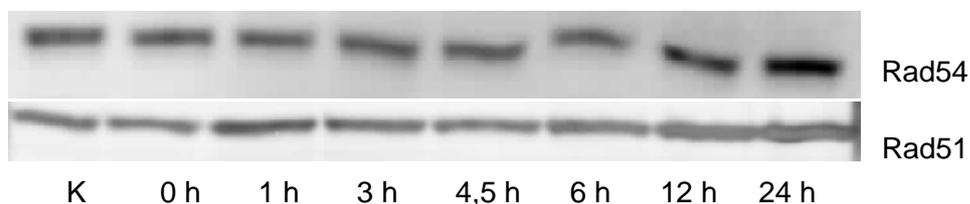


Abb. 34 Western Blot. HR-Proteine und Topoisomerase II α in CACO-2-Zellen nach Doxorubicin-Behandlung. Rad54: 84 kDa, Rad51: 37 kDa.

Um zu überprüfen, ob die gesteigerte Proteinexpressionen von DNA-PKcs, Topoisomerase II α und Rad54 nach der Etoposid-Behandlung durch Effekte des Lösungsmittels des Etoposids verursacht wurden, wurde eine dreistündige Behandlung mit 0,1 % DMSO durchgeführt und anschließend für 24 h in normalem Wachstumsmedium inkubiert. Dabei konnten keine Effekte des Lösungsmittels festgestellt werden.

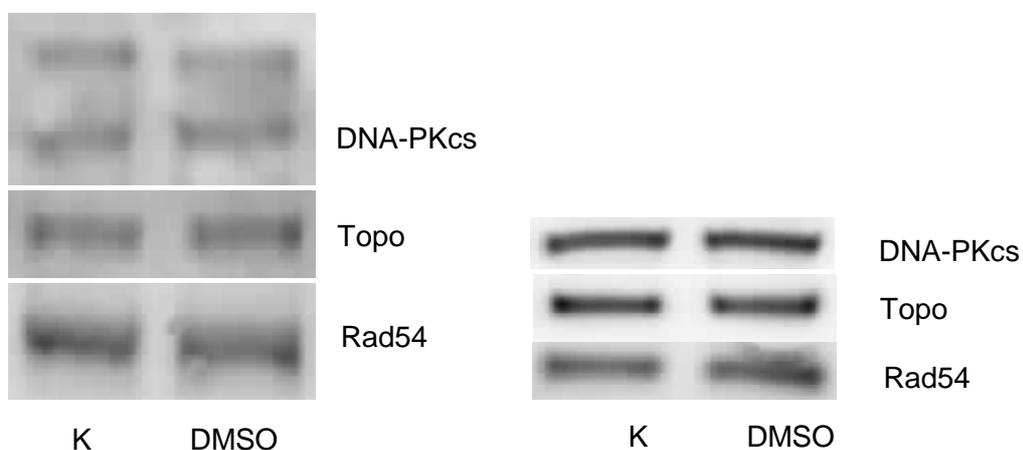


Abb. 35 Western Blot. Dreistündige Behandlung mit DMSO (THP-1 (links) und CACO-2 (rechts) und anschließende Inkubation in normalem Wachstumsmedium für 24 h.

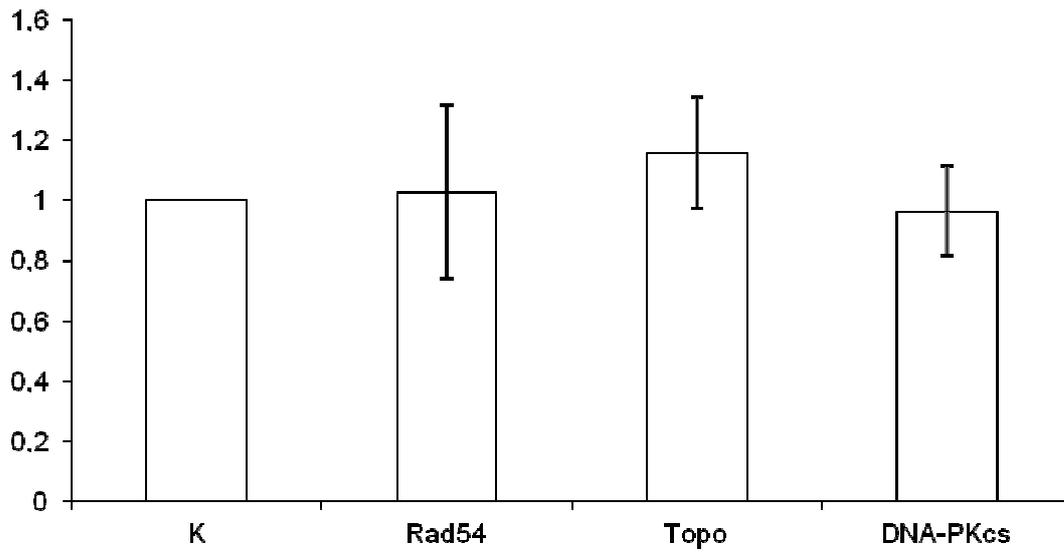


Abb. 36 Western Blot. Einfluss von 0,1 % DMSO (3 h mit anschließendem DMSO-freien Intervall von 24 h) auf die Proteinexpression von Rad54, Topoisomerase IIa und DNA-PKcs in THP-1-Zellen.

4.8 Vergleich des Topoisomerase II α -Gehalts in THP-1 und CACO-2-Zellen

Da Unterschiede im Topoisomerase II α -Gehalt zu einem unterschiedlichen Ansprechen der verwendeten Zelllinien auf Topoisomerase II α -Inhibitoren beitragen können, wurden die isolierten Proteine unbehandelter Kontrollen auf demselben Tris-Acetat-Gel (3-8 %) elektrophoretisch aufgetrennt (15 μ g Proteinlösung/10 μ l). Die Proteine wurden mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen und die Topoisomerase II α detektiert (Proteinanalytik9.5).

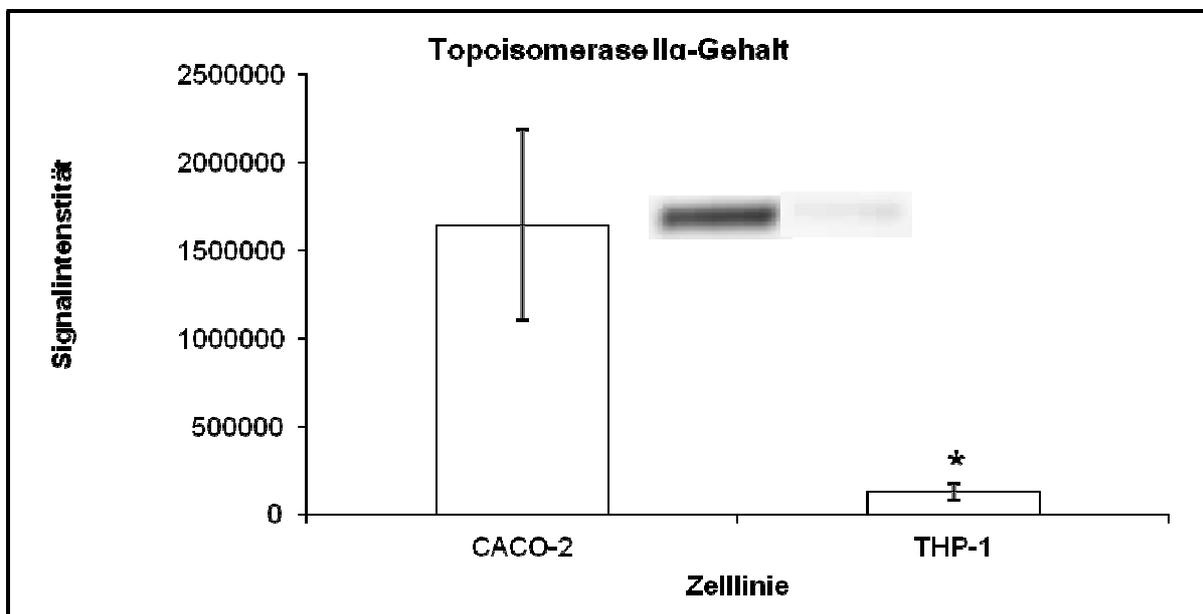


Abb. 37 Topoisomerase II α -Gehalt unbehandelter THP-1 und CACO-2. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Bestimmungen. * = $p \leq 0,01$ gegen CACO-2.

Der Gehalt in den THP-1-Zellen war signifikant niedriger als in den CACO-2-Zellen ($p = 0,008$).

4.9 Genexpressionsanalyse

Neben klassischen HR- und NHEJ-Genen wurden hier weitere für die Behebung des DNA-Schadens wichtige Kandidaten untersucht, um einen Hinweis darauf zu bekommen, welche Proteine außerdem näher betrachtet werden könnten. Diese sind beispielsweise Teil der Schadenserkennung und Signalweiterleitung (ATM) oder kontrollieren den Zellzyklus (CHK1). Die Zellen wurden für drei Stunden mit 5 μ M Etoposid bzw. Doxorubicin behandelt. Anschließend wurde das zytostatikahaltige Medium durch normales Wachstumsmedium

ersetzt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und gemäß der beschriebenen Methode aufgearbeitet und analysiert (9.7).

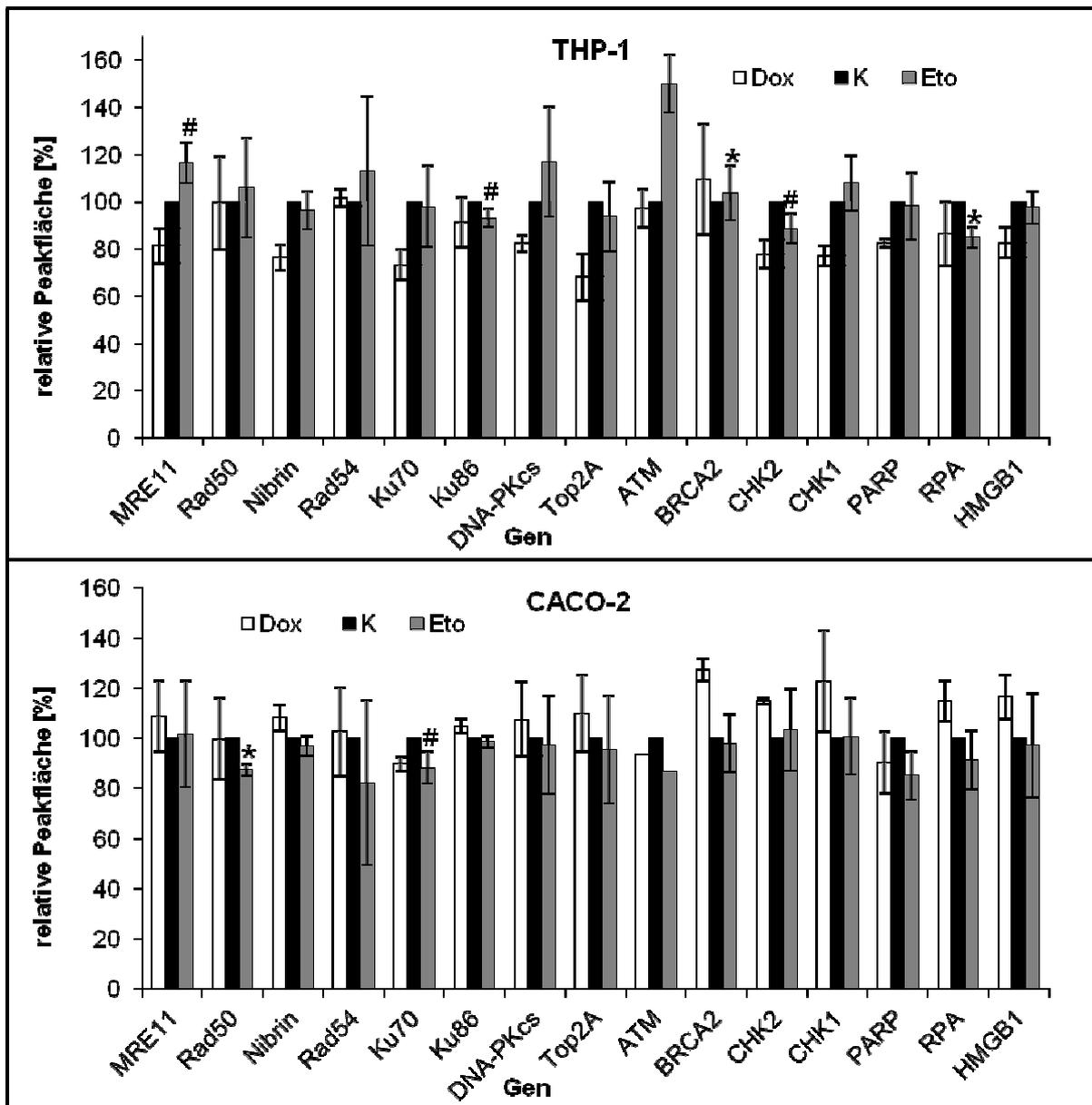


Abb. 38 Multiplex- Genexpressionsanalyse. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Die Werte wurden auf die Kontrollwerte normiert (K = 100 %). Etoposid: n = 3 (THP-1 Etoposid: CHK1 und ATM n = 2; CACO-2 Etoposid: ATM n = 1); Doxorubicin: n = 2 (CACO-2 Doxorubicin: ATM n = 1); * = p \leq 0,01; # = p \leq 0,05 gegen die Kontrolle.

Die stärkste Veränderung der Genexpression war eine Zunahme von ATM nach Behandlung der THP-1-Zellen mit Etoposid (150,07 % \pm 12,45 %). Weitere Zunahmen fielen deutlich geringer aus oder zeigten hohe Standardabweichungen (DNA-PKcs, Rad54). MRE11 lag bei 116,49 % \pm 8,59 % (p = 0,03 gegen die Kontrolle). Die mit Doxorubicin inkubierten THP-1 tendierten zu verminderten Expressionslevels. So waren bei Nibrin (76,49 % \pm 5,43 %),

Ku70 (73,33 % ± 6,43 %), Topoisomerase II α (68,24 % ± 9,84 %), CHK2 (77,83 % ± 5,78 %) und CHK1 (77,25 % ± 4,22 %) Abnahmen über 20 % zu sehen.

Die CACO-2-Zellen zeigten eine verstärkte Expression von BRCA2 nach Behandlung mit Doxorubicin (127,62 % ± 3,98 %). Auch CHK1 (120,39 % ± 16,93 %) stieg an. Etoposid bewirkte keine relevanten Veränderungen.

4.10 Proteinanalytik von CHK1 und ATM

4.10.1 ATM

Da ATM nach der Behandlung der THP-1-Zellen mit Etoposid in der Genexpressionsanalyse anstieg, wurde anschließend ein Western Blot durchgeführt, um zu untersuchen, ob sich auch auf Proteinebene eine Veränderung zeigt. Die Zellen wurden dafür drei Stunden mit 5 μ M Etoposid behandelt und nach einem Mediumswechsel 24 h in zytostatikafreiem Medium inkubiert. Die isolierten Proteine wurden gemäß der beschriebenen Methoden (9.5) isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und detektiert.

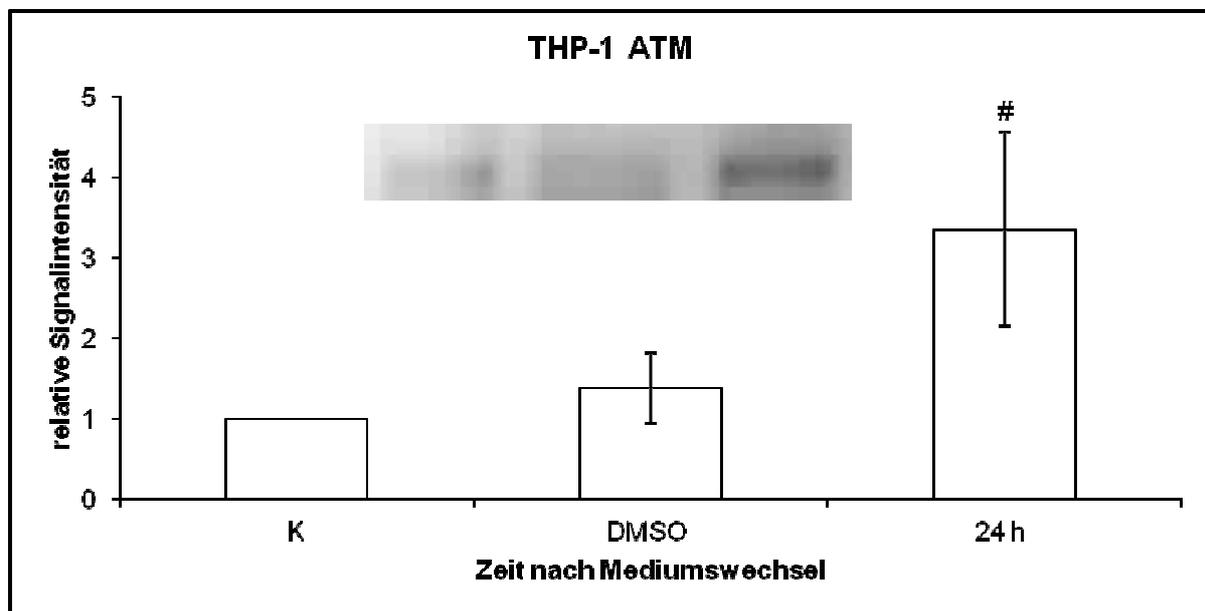


Abb. 39 Proteinanalytik von ATM in THP-1-Zellen in etoposidbehandelten THP-1 (3 h 5 μ M Etoposid + 24 h zytostatikafreie Inkubation). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen. DMSO ist die Lösungsmittelkontrolle (3 h 0,1 % DMSO, dann 24 h in normalem Wachstumsmedium). # = $p \leq 0,05$ gegen die Kontrolle.

Auch auf Proteinebene war nach der Inkubation mit Etoposid ein Anstieg des ATM-Levels zu beobachten (3,36 \pm 1,21; p gegen K = 0,03). Die Behandlung mit dem Lösungsmittel (DMSO) führte nicht zu nennenswerten Veränderungen (1,38 \pm 0,44).

4.10.2 CHK1

Die Behandlung mit Doxorubicin führte in der Genexpressionsanalyse bei beiden Zelllinien zu einer Veränderung von CHK1 (THP-1: Abnahme; CACO-2: Zunahme). Um zu sehen, ob Doxorubicin auch den Gehalt von CHK1-Protein beeinflusst, wurden die Proteine nach entsprechender Behandlung der Zellen (3 h 5 μ M Doxorubicin + 24 h zytostatikafreie Inkubation) isoliert und analysiert (9.5).

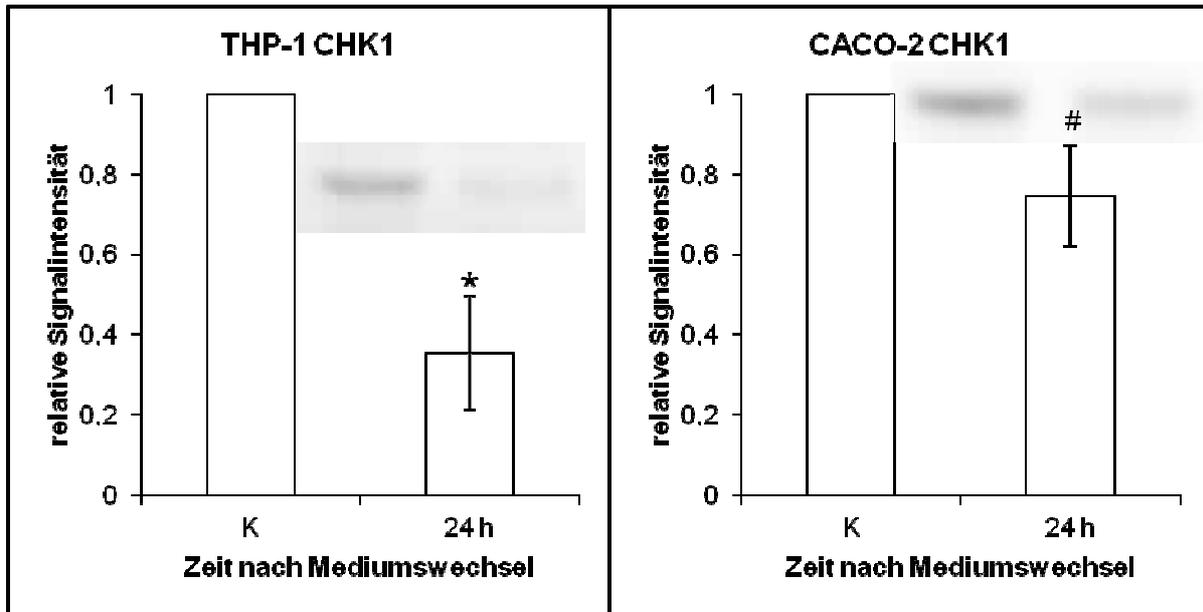


Abb. 40 Proteinanalytik von CHK1 in doxorubicinbehandelten THP-1 und CACO-2 (3 h 5 μ M Doxorubicin + 24 h zytostatikafreie Inkubation). Das Diagramm zeigt Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. * = $p \leq 0,01$; # = $p \leq 0,05$ gegen die Kontrolle.

In beiden Zellen nahm der CHK1-Proteingehalt im Vergleich zur Kontrolle (K = 1) ab. Bei den THP-1 zeigte sich eine stärkere Abnahme ($0,35 \pm 0,15$; p gegen K = 0,001). Der CHK1-Gehalt in den CACO-2-Zellen sank auf $0,75 \pm 0,13$ (p gegen K = 0,03).

4.11 Einfluss pharmakologischer Inhibitoren auf die Etoposid-Sensitivität von THP-1-Zellen

Mit den Inhibitoren (1.8) ATM Kinase Inhibitor, L189, NU7026 und TCS 2312 kann die Funktion der Proteine ATM, Ligase I/III/IV, DNA-PKcs und CHK1 gehemmt werden. ATM und CHK1 und DNA-Pkcs kamen aufgrund der Ergebnisse der Western Blots der THP-1-Zellen in Frage. Der Ligase-Inhibitor ist eine neue Komponente. Er soll eine hemmende Wirkung auf die Ligation der DNA-Enden eines Doppelstrangbruches ausüben [87].

Die THP-1-Zellen konnten die durch Etoposid verursachten DNA-Doppelstrangbrüche schnell beheben. Daher sollte untersucht werden, ob dies durch die Kombination mit einem pharmakologischen Inhibitor, der in für die Reparatur entscheidende Schritte eingreift,

unterbunden werden kann. Auf diesem Weg könnte die Wirksamkeit von Etoposid erhöht werden.

Zunächst wurde der Einfluss der Inhibitoren auf die Viabilität der Zellen bei verschiedenen Konzentrationen mit dem CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (9.4) untersucht. Anschließend wurde eine Inhibitorkonzentration ausgewählt, die alleine nicht zu toxisch war, zusammen mit Etoposid aber stärker wirksam war als Etoposid alleine. Diese Konzentration wurde dann für die sich anschließenden Untersuchungen zum Einfluss des Inhibitors auf den zeitlichen Verlauf der DNA-Strangbrüche (Comet-Assay) verwendet. Der Schadensverlauf unter Einfluss des Inhibitors wurde mit dem Verlauf der inhibitorfreien 5 µM Etoposid-Behandlung (3 h + 0/1/3/6/24 h) verglichen.

Der jeweilige Inhibitor blieb über die gesamte Inkubation in dem Medium. Das Zytostatikum wurde nach der Vorinkubation mit dem Inhibitor zugesetzt und nach drei Stunden wieder entfernt.

Tab. 6 Zeitschemata Inhibitoren

	Dauer der Vorinkubation mit Inhibitor	Dauer der Inkubation mit 5 µM Etoposid + Inhibitor	Dauer der Inkubation in zytostatikafreiem Medium + Inhibitor
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay – 5 µM Etoposid + Inhibitor	1 h	3 h	24 h
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay – Inhibitor			28 h
Comet-Assay -5 µM Etoposid + Inhibitor	1 h	3 h	1/3/6/24 h
Comet-Assay - Inhibitor			28 h

4.11.1 DNA-PKcs-Inhibitor NU7026

4.11.1.1 Bestimmung der Zytotoxizität des DNA-PKcs-Inhibitors auf THP-1-Zellen

Die Inkubation mit dem DNA-PKcs-Inhibitor NU7026 war bei allen untersuchten Konzentrationen (5/10/20 μM) deutlich weniger toxisch als Etoposid oder die Kombinationen aus Etoposid und dem Inhibitor (20 μM NU7026: $0,77 \pm 0,13$).

Die Kombination aus 5 μM Etoposid und NU7026 führte zu einer reduzierten Viabilität. Hier waren 10 μM ($0,29 \pm 0,03$; $p = 0,01$) und 20 μM ($0,25 \pm 0,01$; $p = 0,005$) signifikant gegen die Inkubation mit Etoposid alleine (Abb. 41).

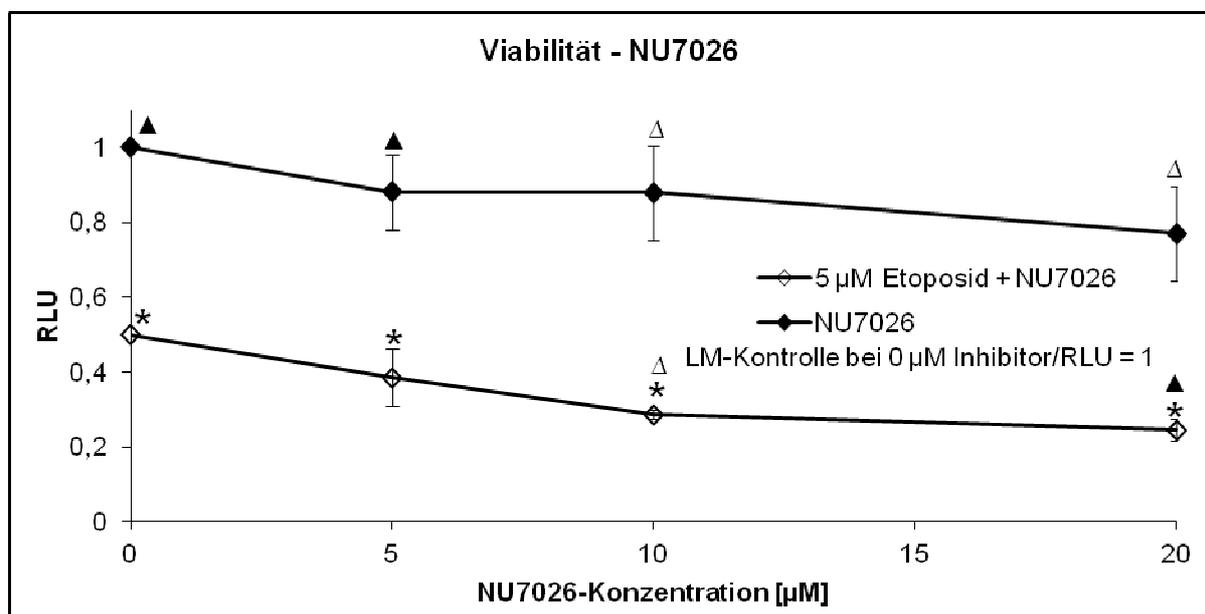


Abb. 41 Viabilität der THP-1-Zellen nach Behandlung mit 5 μM Etoposid und/oder verschiedenen Konzentrationen des DNA-PKcs-Inhibitors NU7026 gemäß dem Schema in Tab. 6 ($n = 3$; Mittelwerte \pm Standardabweichungen; $*$ = $p \leq 0,01$; $\#$ = $p \leq 0,05$ - NU7026 gegen 5 μM Etoposid + NU7026; \blacktriangle = $p \leq 0,01$; \triangle = $p \leq 0,05$ gegen 5 μM Etoposid). Die Werte wurden auf die Lösungsmittelkontrolle normiert (0,5 % DMSO).

Für die Untersuchung des Einflusses des Inhibitors auf das Reparaturverhalten nach der Behandlung mit 5 μM Etoposid wurde eine Konzentration von 20 μM NU7026 gewählt. Der Effekt nach Behandlung mit der Kombination entsprach ungefähr der Summe der Wirkung der einzelnen Komponenten, ist also additiv.

4.11.1.2 Einfluss des DNA-PKcs-Inhibitors auf den Verlauf der DSB-Reparatur

Mithilfe des Comet-Assays wurde untersucht, ob der Inhibitor einen Effekt auf die Reparatur des durch Etoposid induzierten DNA-Schadens hat. Dabei wurde gemäß der beschriebenen Methode vorgegangen (9.8.2).

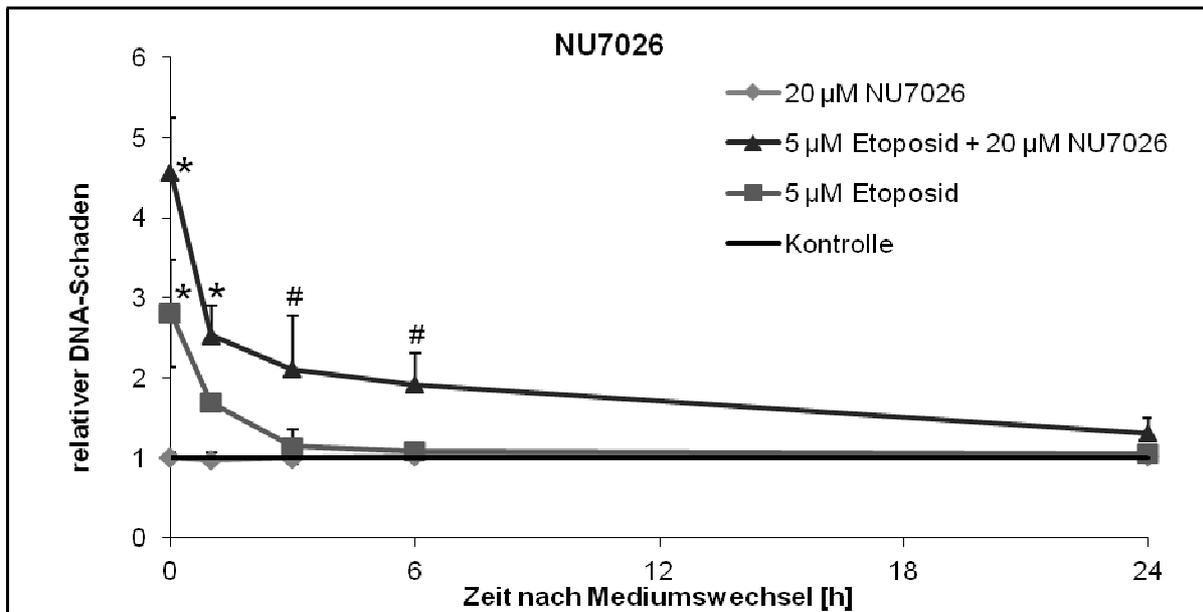


Abb. 42 Einfluss des DNA-PKcs-Inhibitors NU7026 auf die DNA-Reparatur (n=3; Mittelwerte und Standardabweichungen – aus Gründen der Übersichtlichkeit nur in eine Richtung aufgetragen; * = $p \leq 0,01$; # = $p \leq 0,05$ gegen die Kontrolle; 1 h 5 µM Etoposid: n = 2). Inkubationsschema gemäß Tabelle Tab. 6.

Durch den Inhibitor alleine entstanden keine DNA-Doppelstrangbrüche. Die Kombination aus Etoposid und dem DNA-PKcs-Inhibitor führte zu einem relativen DNA-Schaden von $4,56 \pm 0,69$ (p gegen die Kontrolle = 0,0009). Auch eine Stunde ($2,53 \pm 0,38$; $p = 0,002$), drei ($2,11 \pm 0,67$; $p = 0,05$) und sechs Stunden ($1,91 \pm 0,39$; $p = 0,02$) nachdem das etoposidhaltige Medium gegen zytostatikafreies Medium gewechselt wurde, waren die Werte noch signifikant gegen den Kontrollwert erhöht. Die Werte nach 1/3/6/24 h waren jeweils signifikant niedriger als der Initialschaden ($p = 0,01/0,01/0,004/0,001$). Direkt nach Mediumswechsel und sechs Stunden später führte der Inhibitor zusammen mit Etoposid zu einem signifikant höheren Schaden als die reine Etoposid-Inkubation mit $2,81 \pm 0,67$ ($p \leq 0,05$).

Vergleicht man den Verlauf der DSB nach Inkubation mit der Kombination beider Wirkstoffe mit dem Verlauf der DSB nach Behandlung mit 5 µM Etoposid, so fällt auf, dass sich ersterer viel später dem Kontrollniveau nähert. Dies könnte eine Folge des höheren Initialschadens sein. Dagegen spricht, dass die Kurve nach einer dreistündigen Inkubation mit 50 µM Etoposid (4.2), die einen ähnlich hohen Initialschaden aufwies ($4,39 \pm 0,30$), bereits nach drei Stunden wieder das Level der Kontrolle erreichte. Der DNA-Pkcs-Inhibitor hatte also einen Einfluss auf den Verlauf der Reparatur.

4.11.2 ATM Kinase Inhibitor

4.11.2.1 Bestimmung der Zytotoxizität des ATM-Inhibitors auf THP-1-Zellen

Der ATM-Kinase-Inhibitor zeigte mit steigender Konzentration eine zunehmend starke Toxizität. Die Viabilität der THP-1-Zellen nach der Inkubation mit 25 μM Inhibitor unterscheidet sich nicht mehr von der nach der Behandlung mit der Kombination aus Etoposid und 25 μM Inhibitor (Eto + Inhibitor: $0,08 \pm 0,06$; Inhibitor: $0,09 \pm 0,03$). Da die Viabilitäten nach der Inkubation mit Etoposid + 10 μM ATM-Kinase-Inhibitor und Etoposid + 5 μM ATM-Kinase-Inhibitor sehr ähnlich waren, 5 μM des Inhibitors alleine aber weniger toxisch wirkten als 10 μM , wurde diese Konzentration für die folgenden Reparaturversuche gewählt.

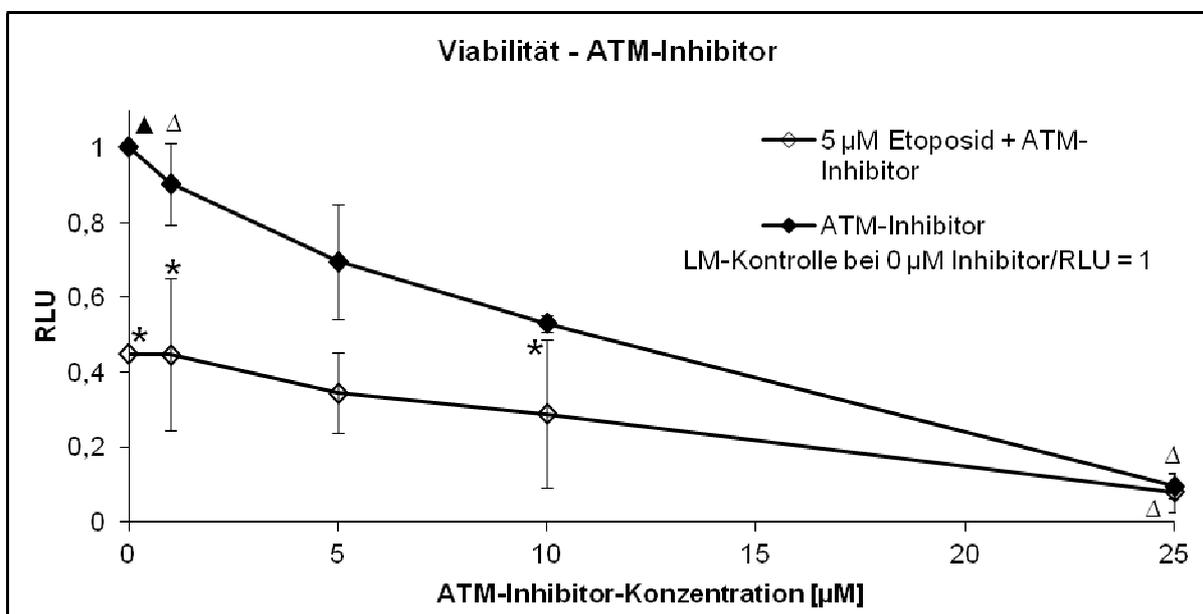


Abb. 43 Viabilität der THP-1-Zellen nach Behandlung mit 5 μM Etoposid und/oder verschiedenen Konzentrationen des ATM-Kinase-Inhibitors gemäß dem Schema in Tab. 6 ($n = 3$; Mittelwerte \pm Standardabweichungen; * = $p \leq 0,01$; # = $p \leq 0,05$ – 5 μM Etoposid + ATM-Inhibitor gegen ATM-Inhibitor; \blacktriangle = $p \leq 0,01$; Δ = $p \leq 0,05$ gegen 5 μM Etoposid). Die Werte wurden auf die Lösungsmittelkontrolle normiert (0,35 % DMSO).

4.11.2.2 Einfluss des ATM-Inhibitors auf den Verlauf der DSB-Reparatur

Der Initialschaden unmittelbar nach der dreistündigen Behandlung mit der Kombination aus Etoposid und dem ATM-Kinase-Inhibitor ($4,49 \pm 0,15$) war höher als der nach der Inkubation nur mit Etoposid ($2,81 \pm 0,67$). Dieser Unterschied hielt jedoch nicht lange an. Bereits drei Stunden nach Mediumswechsel lagen beide Kurven wieder auf dem Niveau der Kontrolle. Mit dem Zusatz von 5 μM ATM-Kinase-Inhibitor konnte die Reparatur der Doppelstrangbrüche nicht verhindert werden.

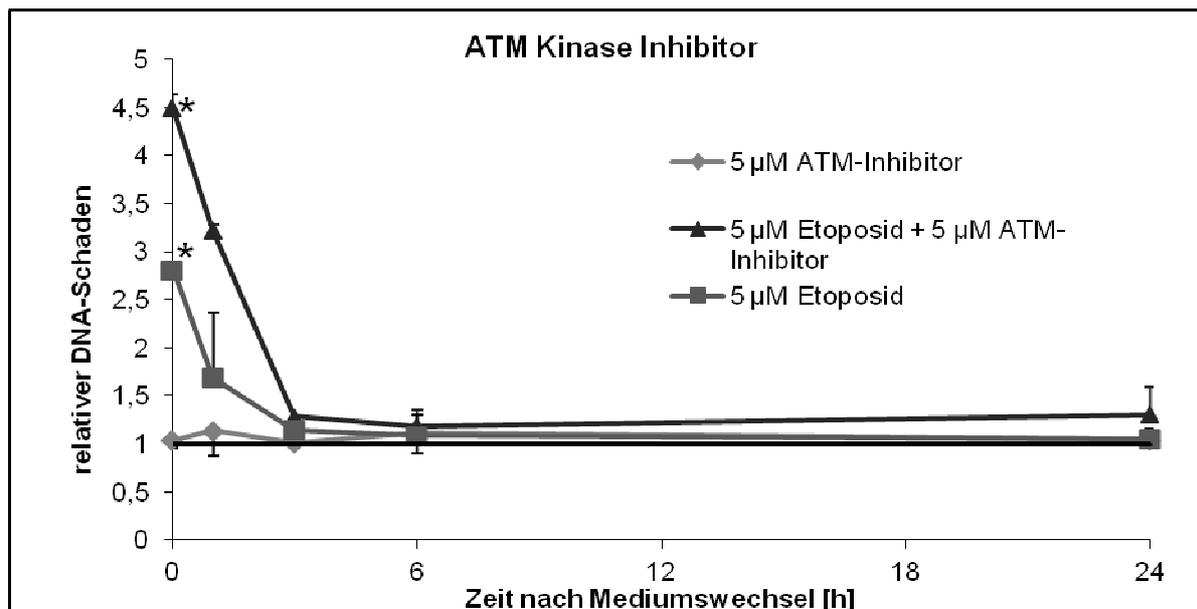


Abb. 44 Einfluss des ATM-Kinase-Inhibitors auf die DNA-Reparatur. $n=3$; Mittelwerte und Standardabweichungen – aus Gründen der Übersichtlichkeit nur in eine Richtung aufgetragen; $*=p \leq 0,01$; gegen die Kontrolle; 1 h 5 μM Etoposid, 3 h/6 h 5 μM Etoposid + ATM-Inhibitor, 3 h Inhibitor: $n=2$). Inkubationsschema gemäß Tabelle Tab. 6.

4.11.3 CHK1-Inhibitor TCS 2312

4.11.3.1 Bestimmung der Zytotoxizität des CHK1-Inhibitors auf THP-1-Zellen

Der CHK1-Inhibitor zeigte in den getesteten Konzentrationen eine konzentrationsabhängige Toxizität, die nicht besonders stark ausfiel (Abb. 45). 250 nM führten zu einer Abnahme der Viabilität der THP-1-Zellen auf $0,68 \pm 0,12$ (p gegen Lösungsmittelkontrolle = 0,01). Jede verwendete Konzentration unterschied sich signifikant von ihrer Kombination mit 5 μM Etoposid. Erst die Kombination aus 250 nM Inhibitor und Etoposid führte 24 h nach dem Mediumswechsel gegen den Inhibitor enthaltendes zytostatikafreies Medium zu einer signifikant niedrigeren Viabilität ($0,20 \pm 0,15$; $p = 0,05$) als die Etoposid-Inkubation ohne den Inhibitor ($0,56 \pm 0,17$).

Die Wirkung auf die Viabilität nach der Behandlung mit der Kombination aus Inhibitor und Etoposid entspricht näherungsweise der Summe aus den Effekten der einzelnen Komponenten.

Für die Reparaturuntersuchungen wurde die Inhibitorkonzentration von 250 nM verwendet.

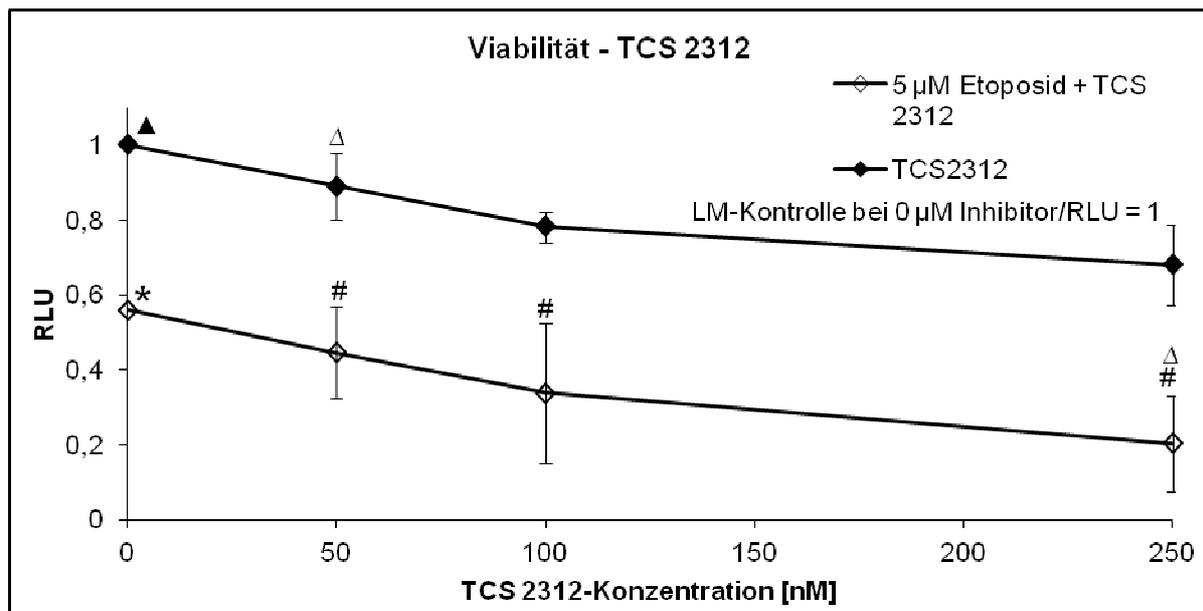


Abb. 45 Viabilität der THP-1-Zellen nach Behandlung mit 5 µM Etoposid und/oder verschiedenen Konzentrationen von TCS 2312 gemäß dem Schema in Tab. 6 ($n=3$; Mittelwerte \pm Standardabweichungen; * = $p \leq 0,01$; # = $p \leq 0,05$ TCS 2312 gegen 5 µM Etoposid + TCS 2312; \blacktriangle = $p \leq 0,01$; \triangle = $p \leq 0,05$ gegen 5 µM Etoposid). Die Werte wurden auf die Lösungsmittelkontrolle normiert (0,01 % DMSO).

4.11.3.2 Einfluss des CHK1-Inhibitors auf den Verlauf der DSB-Reparatur

Der relative DNA-Schaden unmittelbar nach der dreistündigen Behandlung mit 5 µM Etoposid + 0,25 µM TCS 2312 betrug $3,27 \pm 0,95$ und lag damit im Bereich des Schadens nach der Inkubation mit Etoposid alleine ($2,81 \pm 0,67$). Während die DNA-Doppelstrangbrüche aber nach der Inkubation mit 5 µM Etoposid schnell entfernt werden konnten (3 h nach Mediumswechsel: $1,14 \pm 0,21$), blieb der Schaden unter dem zusätzlichen Einfluss des CHK1-Inhibitors bis 24 h nach Mediumswechsel leicht erhöht ($1,64 \pm 0,52$; p gegen die Kontrolle = 0,05). Der Unterschied zwischen beiden Kurven (5 µM Etoposid + 0,25 µM TCS 2312 und 5 µM Etoposid) war nach sechs Stunden signifikant ($1,64 \pm 0,28$ und $1,08 \pm 0,10$; $p = 0,02$).

Der Inhibitor beeinflusste demnach das Reparaturvermögen der THP-1-Zellen, die den durch Etoposid verursachten Schaden nicht mehr vollständig beheben konnten.

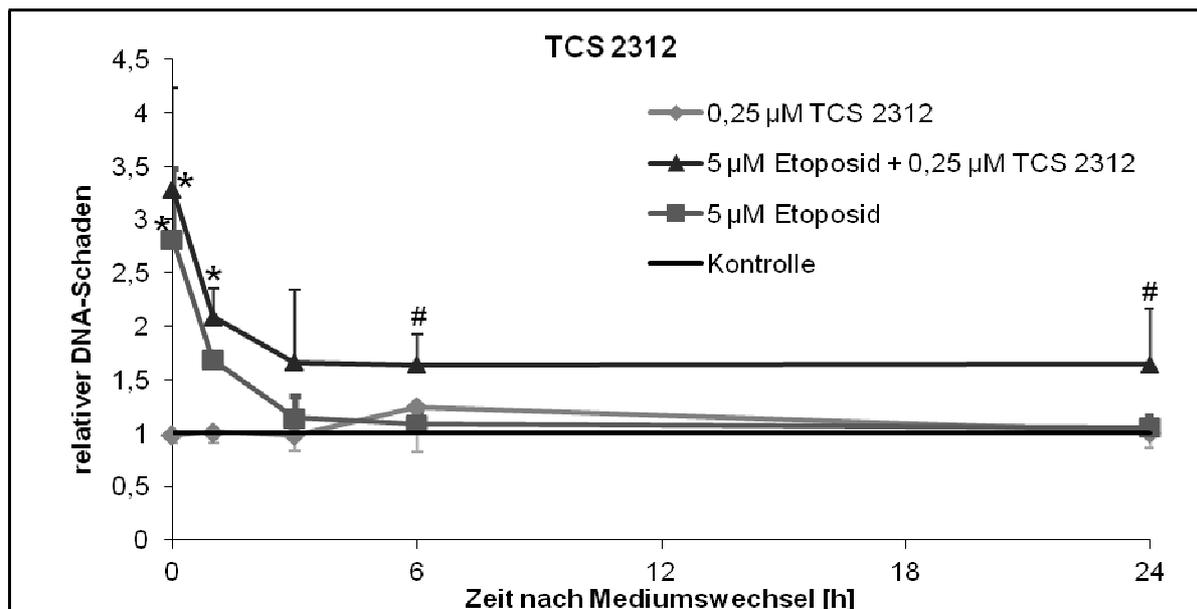


Abb. 46 Einfluss des CHK1-Inhibitors TCS 2312 auf die DNA-Reparatur. $n = 4$; Mittelwerte und Standardabweichungen – aus Gründen der Übersichtlichkeit nur in eine Richtung aufgetragen; * = $p \leq 0,01$; # = $p \leq 0,05$; gegen die Kontrolle; 1 h 5 μM Etoposid: $n = 2$; 1 h Etoposid + TCS 2312, 3 h TCS 2312: $n = 3$). Inkubationsschema gemäß Tabelle Tab. 6.

4.11.4 Ligase-Inhibitor L189

4.11.4.1 Bestimmung der Zytotoxizität des Ligase-Inhibitors auf THP-1-Zellen

Der Einfluss des Inhibitors L189 auf die Viabilität der THP-1-Zellen war gering. Die Inkubation mit 25 μM L189 führte zu einer Abnahme der Viabilität auf $0,81 \pm 0,11$ (Abb. 47). Dieser Wert war signifikant gegen die Lösungsmittelkontrolle ($p = 0,01$). Die dreistündige Behandlung mit 5 μM Etoposid und 5/10/25 μM des Inhibitors und anschließender zytostatikafreien Inkubation mit Inhibitor führte zu einer signifikant niedrigeren Viabilität als mit dem Inhibitor alleine. Für die folgenden Reparaturbeobachtungen wurde eine Inhibitorkonzentration von 25 μM verwendet. Hier war die metabolische Aktivität der Zellen nach zytostatischer Behandlung stark reduziert (5 μM Etoposid + 25 μM L189: $0,22 \pm 0,16$; p gegen 5 μM Etoposid = 0,054; 5 μM Etoposid: $0,64 \pm 0,32$). Die Kombination bewirkte eine Reduktion der Viabilität um 78 %, Etoposid führte zu einer 36%igen Abnahme und durch den Inhibitor alleine sank der Wert um fast 19 %. Der Effekt der Kombination aus Inhibitor und Etoposid überstieg demnach die Wirkung der Summe der Einzeleffekte.

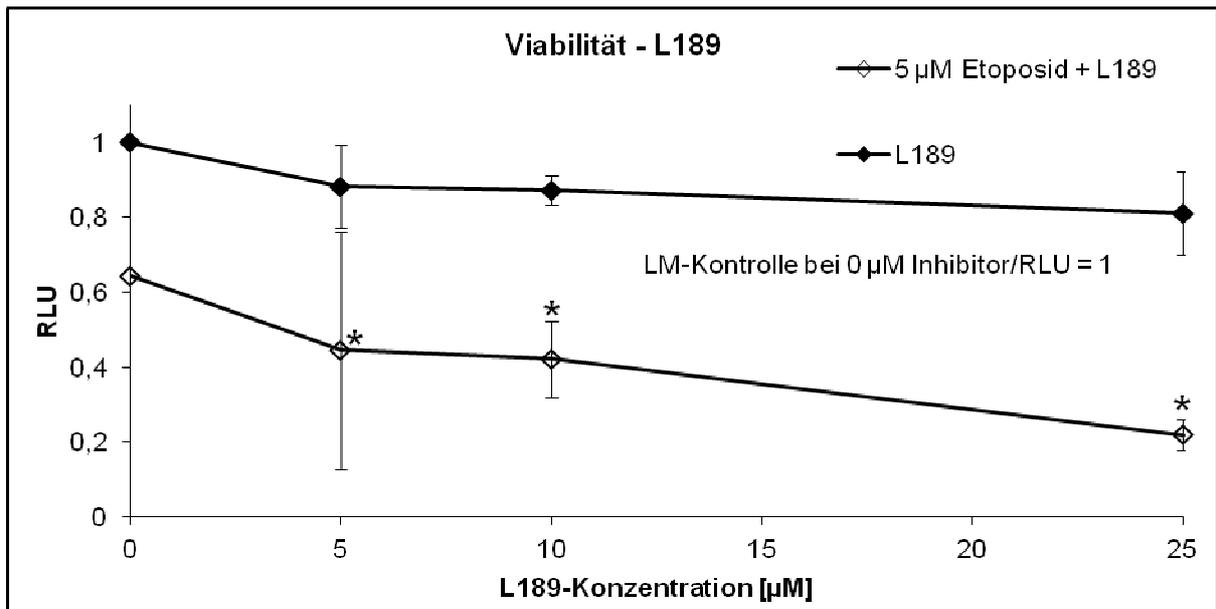


Abb. 47 Viabilität der THP-1-Zellen nach Behandlung mit 5 μM Etoposid und/oder verschiedenen Konzentrationen von L189 gemäß dem Schema in Tab. 6 ($n=4$; Mittelwerte \pm Standardabweichungen; $*$ = $p \leq 0,01$; $\#$ = $p \leq 0,05$ L189 gegen 5 μM Etoposid + L189; 10 μM L189/ 5 μM Etoposid + 5 μM /10 μM L189: $n=3$; 5 μM L189: $n=2$). Die Werte wurden auf die Lösungsmittelkontrolle normiert (0,35 % DMSO).

4.11.4.2 Einfluss des Ligase-Inhibitors auf den Verlauf der DSB-Reparatur

Im Vergleich zu der Kurve nach Etoposid-Behandlung gab es durch die zusätzliche Inkubation mit 25 μM Inhibitor L189 keine relevanten Veränderungen. Zwar war der Initialschaden etwas erhöht ($3,88 \pm 0,44$) und der Wert drei Stunden nach Mediumswechsel zeigte noch eine signifikante Abweichung vom Kontrollwert. Diese ist aber gering ($1,26 \pm 0,16$ $p = 0,04$) und die Kurven verlaufen insgesamt sehr ähnlich. Der Ligase-Inhibitor L189 hatte demnach keinen relevanten Einfluss auf das Reparaturvermögen der THP-1-Zellen nach der Behandlung mit 5 μM Etoposid.

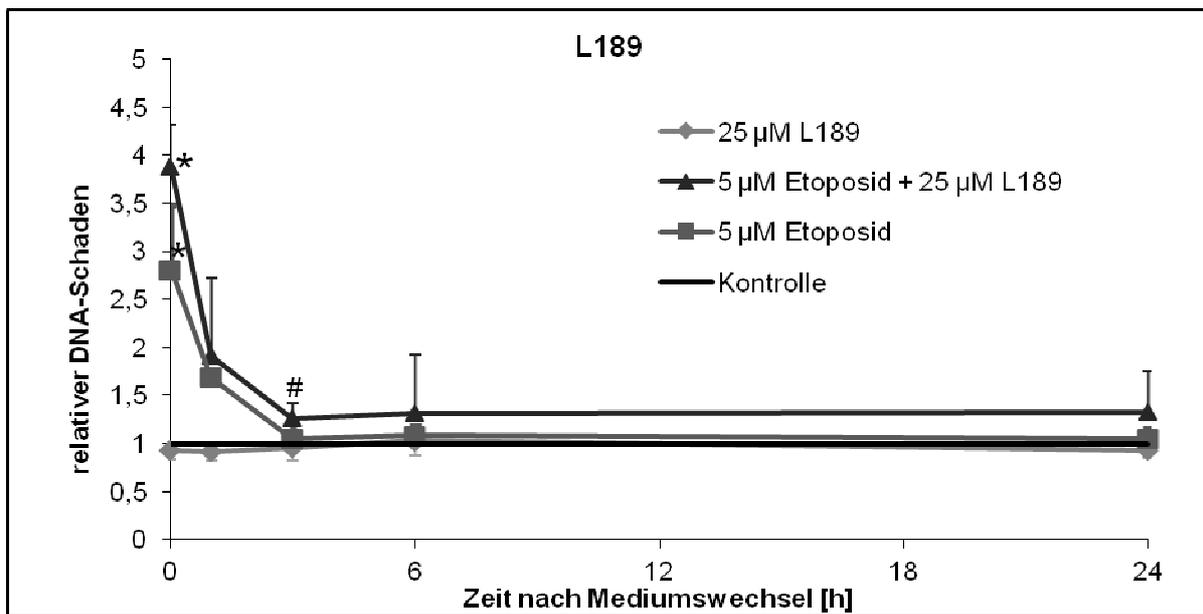


Abb. 48 Einfluss des Ligase-Inhibitors L189 auf die DNA-Reparatur. $n=3$; Mittelwerte und Standardabweichungen – aus Gründen der Übersichtlichkeit nur in eine Richtung aufgetragen; $*=p \leq 0,01$; $\#=p \leq 0,05$ gegen die Kontrolle; 6 h 25 μM L189: $n=2$). Inkubationsschema gemäß Tabelle Tab. 6.

4.12 Ergebnisüberblick

- Für beide Zytostatika konnten Bedingungen gefunden werden, unter denen in den THP-1- und den CACO-2-Zellen DSB induziert wurden.
- Die durch 5 μM Etoposid verursachten DNA-Doppelstrangbrüche konnten in beiden Zelllinien rasch entfernt werden. Die Inkubation mit 50 μM Etoposid verursachte in den THP-1-Zellen einen signifikant höheren Schaden als in den CACO-2-Zellen. Trotzdem konnten nur die THP-1-Zellen die entstandenen Doppelstrangbrüche beheben.
- Etoposid führte in den THP-1-Zellen zu vermehrtem Zelltod. Der Anteil vitaler Zellen blieb bei den CACO-2-Zellen weitgehend konstant.
- Der durch Doxorubicin verursachte Schaden konnte nicht repariert werden.
- Doxorubicin war für beide Zelllinien toxisch. Die THP-1-Zellen reagierten sensitiver, gemessen als schnellere Abnahme ihres ATP-Gehalts. Bei den CACO-2-Zellen war auch sechs Tage nach der Inkubation noch ein Rest ATP detektierbar.
- Doxorubicin hemmte konzentrationsabhängig die Bildung von Kolonien in den CACO-2-Zellen. Schon 0,5 μM hatten einen negativen Einfluss auf die Proliferation. Etoposid erzielte erst ab 50 μM eine signifikante Abnahme der Kolonienzahl.
- Der Zellzyklus wurde am stärksten nach der Behandlung der CACO-2-Zellen mit Doxorubicin beeinflusst. Hier kam es 24 h nach Mediumswechsel zu einer deutlichen Zunahme des G2/M-Anteils.
- Die THP-1-Zellen reagierten im Vergleich zu den CACO-2-Zellen mit stärkeren Veränderungen ihrer Proteinexpression. Die Behandlung mit Etoposid führte zu einem relevanten Anstieg des Gehalts folgender Proteine: Rad54, DNA-PKcs, Topoisomerase II α . Nach der Doxorubicin-Behandlung stiegen die Proteingehalte der DNA-PKcs und der Topoisomerase II α . Die Proteinexpression von Rad51 sank.
- Der Topoisomerase II α -Gehalt war in den CACO-2-Zellen signifikant höher als in den THP-1-Zellen.
- Die Genexpressionsanalyse zeigte geringe Veränderungen in der Expression weniger Gene. Deutliche und für weitere Untersuchungen interessante Veränderungen betrafen ATM (Etoposid, THP-1 \uparrow) und CHK1 (Doxorubicin THP-1 \downarrow /CACO-2 \uparrow).
- Auf Proteinebene wurde eine Zunahme des ATM-Gehalts in THP-1-Zellen nach der Etoposid-Inkubation detektiert. In beiden Zelllinien nahm der CHK1-Gehalt nach der Doxorubicin-Behandlung signifikant gegen die Kontrolle ab.

- Der ATM-Kinase-Inhibitor verstärkte die Toxizität von Etoposid. Auf die Reparatur von durch Etoposid induzierten DSB hatte er keinen relevanten Einfluss. Initial entstanden mehr DSB als nach der Inkubation nur mit Etoposid.
- Die Inkubation der THP-1-Zellen mit Etoposid und 25 μ M Ligase-Inhibitor (L189) verstärkte die Toxizität gegenüber der Inkubation mit Etoposid alleine. Die Reparatur der DSB konnte nicht relevant beeinflusst werden. Auch hier war die anfängliche Menge an DSB verglichen zu der reinen Etoposid-Inkubation erhöht.
- Die Kombination aus DNA-Pkcs-Inhibitor NU7026 und Etoposid war in der gewählten Konzentration signifikant stärker toxisch als Etoposid alleine. Auch der Verlauf der Reparatur konnte dadurch gehemmt werden.
- Der CHK1-Inhibitor TCS2312 konnte in der gewählten Konzentration die Toxizität von Etoposid verstärken. Auch die Reparatur der DSB konnte gehemmt werden.

5 Diskussion

5.1 DNA-Schaden nach Behandlung mit Topoisomerase II α -Inhibitoren

Die durch Etoposid induzierten DNA-Strangbrüche konnten – mit Ausnahme der Inkubation der CACO-2-Zellen mit 50 μ M Etoposid - rasch repariert werden. Im Gegensatz dazu blieben die durch Doxorubicin induzierten Strangbrüche bestehen.

In der Literatur findet man zahlreiche Beispiele dafür, dass die meisten der durch Etoposid verursachte DNA-Strangbrüche nach Beenden der Zytostatika-Behandlung schnell entfernt werden können [86, 88-92]. Auch die Persistenz der durch Doxorubicin induzierten Strangbrüche unter verschiedenen Bedingungen wurde schon beschrieben [92-95].

Welche wirkstoffbezogenen Unterschiede könnten zu dem unterschiedlichen Reparaturergebnis beitragen?

Während Doxorubicin zwischen die DNA-Basen interkaliert, hat Etoposid diese Fähigkeit nicht. Es bindet nicht-kovalent und vorübergehend an die Topoisomerase, deren Enzymaktivität schnell wiederhergestellt ist, wenn es wieder von Etoposid befreit ist. Die Ligation der DNA kann bald darauf wieder stattfinden [90, 96]. Da sich die intrazelluläre Etoposid-Konzentration schnell an die der extrazellulären Umgebung angleicht [90], diffundiert nicht oder nicht mehr an die Topoisomerase gebundenes Etoposid nach dem Mediumswechsel zu zytostatikafreiem Medium aus der Zelle und kann demnach keine Wirkung mehr entfalten.

In die DNA interkalierte Doxorubicin-Moleküle werden hingegen zurückgehalten und können dort auch nach Austausch des zytostatikahaltigen Mediums einen Cleavage Complex stabilisieren und einen DNA-Strangbruch erzeugen. Auch eine Behinderung von Helikasen oder die Erzeugung oxidativen Schadens ist weiterhin möglich. Zudem könnte interkaliertes Doxorubicin in der Nähe des Strangbruchs die Interaktion von Reparaturproteinen und der DNA stören. Erst, wenn das Doxorubicin nach einem Strangbruch wieder aus der DNA gelöst wird, kann es aus der Zelle abwandern [92]. Das ungefähr gleich bleibende Niveau des DNA-Schadens im Comet-Assay kann somit bedeuten, dass durch die Retention des Doxorubicins noch neuer Schaden entsteht, parallel dazu aber auch ein kleiner Teil des zuvor entstandenen Schadens repariert wird.

Topoisomerase II α -Inhibitoren können sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche erzeugen. Ein Einzelstrangbruch entsteht dann, wenn nur ein Monomer der Topoisomerase ein Molekül des Zytostatikums bindet [9, 13] und dadurch blockiert wird. Im alkalischen Comet-Assay werden beide Strangbruch-Arten erfasst. Soubeyrand et al. [90] und Muslimovic et al. [89] konnten unter verschiedenen Bedingungen feststellen, dass Etoposid

mehrheitlich Einzelstrangbrüche erzeugt. Soubeyrand et al. [90] beobachteten mit Hilfe des alkalischen Comet-Assays, dass diese im Vergleich zu Doppelstrangbrüchen schnell wieder legiert wurden [90]. Da Anthracycline ein größeres Verhältnis von Doppel- zu Einzelstrangbrüchen als Etoposid aufweisen [2], ist anzunehmen, dass auch dies zu den Unterschieden im Reparaturverlauf zwischen Doxorubicin und Etoposid beiträgt.

Auch der Ort des Doppelstrangbruchs kann darüber entscheiden, ob dieser reversibel ist oder bestehen bleibt. So ist die Wahrscheinlichkeit größer, dass ein Strangbruch in Regionen aktiver Gene aufgrund von DNA-abhängigen Prozessen wie der Replikation oder der Transkription in einen bleibenden Strangbruch umgewandelt wird, als ein Strangbruch im Heterochromatin [97]. Möglicherweise bestehen hier Unterschiede zwischen Etoposid und Doxorubicin.

Es gab keine allgemeingültige Korrelation zwischen der Höhe des ermittelten DNA-Schadens oder dem Anteil besonders stark geschädigter DNA direkt nach Behandlung und dem Reparaturergebnis. Der fehlende Zusammenhang zwischen Initialschaden und Ligation der DNA-Strangbrüche wurde auch an anderer Stelle beobachtet [97].

5.2 Korrelation der Zytotoxizität von Topoisomerase II α -Inhibitoren und der DNA-Reparatur

Die Behandlung der THP-1-Zellen mit 5 μ M Etoposid führte während des zytostatikafreien Intervalls zunächst zu einer Zunahme apoptotischer und schließlich nekrotischer Zellen, bei gleichzeitiger Abnahme apoptotischer Zellen (Abb. 16). Dieser Verlauf resultiert daraus, dass apoptotische Körperchen, die nicht phagozytiert werden, in eine sekundäre Nekrose übergehen [98]. Dass die Behandlung mit Etoposid zu apoptotischem Zelltod führt, ist bekannt [7, 99]. Auch die Korrelation mit dem sub-G1-Anteil, der oft als Kriterium für Apoptose herangezogen wird [100], unterstützt das Ergebnis der Doppelfärbung mit Propidiumiodid und Annexin V. Bei der Beurteilung des sub-G1-Peaks sollte jedoch beachtet werden, dass auch im Laufe der Nekrose eine Fragmentierung der DNA stattfindet – wenn auch weniger gleichmäßig [76]. Zudem gibt es auch die Möglichkeit, dass Apoptose ohne die typische DNA-Fragmentierung stattfindet [101].

Ungefähr 50 % der THP-1-Zellen überlebten den Angriff durch Etoposid. Dies entspricht in etwa dem Prozentsatz der Zellen, die wenige bis gar keine DNA-Strangbrüche aufwies. Es ist zu vermuten, dass die Fraktion stärker geschädigter Zellen den Anteil ausmacht, der in den Zelltod ging. Das würde bedeuten, dass die Reparatur in diesen Zellen nicht erfolgreich war. Es ist bekannt, dass kurze Behandlungen mit Etoposid auch dann den Zelltod herbeiführen können, wenn eine Ligation der DNA-Enden stattgefunden hat. Die Toxizität von Etoposid steht in Zusammenhang mit der Unfähigkeit, die entstandenen

DNA-Strangbrüche korrekt zu beheben [90]. Es ist anzunehmen, dass unter den gewählten Bedingungen eine schnelle Ligation der DNA-Enden stattfand – sichtbar als Abnahme des Schadens im Comet-Assay. Da NHEJ sehr schnell repariert [45], ist dieser Reparaturweg hier wahrscheinlich. NHEJ wiederum gilt als tendenziell unzuverlässig und kann zu fehlerhaft reparierter DNA führen. In der Literatur findet sich dazu die Theorie, dass anschließend durch die HR eine Korrektur möglich ist [45, 102]. Offensichtlich konnte dieser Mechanismus die DNA der THP-1-Zellen nicht korrekt regenerieren, was letzten Endes zu einer schnellen Einleitung der Apoptose führte.

Eine weitere Möglichkeit, die Toxizität trotz der schnellen vermeintlichen Reparatur zu erklären, ist die Annahme, dass nur ein sehr geringer Teil der Strangbrüche für die letale Wirkung von Etoposid verantwortlich ist. In diesem Fall würden weniger komplizierte DNA-Strangbrüche – vor allem Einzelstrangbrüche, aber auch reparable Doppelstrangbrüche – korrekt zusammengefügt werden. Ein geringer Anteil der DNA-Strangbrüche, der nicht repariert werden kann und sich mengenmäßig im Comet-Assay nicht bemerkbar macht, reicht dann aus, um eine letale Wirkung zu entfalten. Eine Analyse von Mulsimovic et al. [89] hat ergeben, dass unter den dort gewählten Bedingungen nur 3 % der Strangbrüche Doppelstrangbrüche darstellten und nur 10 % dieser Strangbrüche, insgesamt demnach 0,3 %, für die von Etoposid vermittelte Toxizität verantwortlich waren.

Die Behandlung mit 5 μ M Etoposid führte bei den CACO-2 Zellen nur zu einer geringen und nicht signifikanten Zunahme toter Zellen. Dieses Ergebnis wird durch das nach dreistündiger Inkubation mit 5 μ M Etoposid kaum beeinträchtigte Koloniebildungsvermögen im Colony Formation Assay unterstützt. Das klonogene Überleben gilt als solider Langzeitparameter für die Sensitivität auf Zytostatika [103]. Eine erst später durchschlagende Toxizität kann daher ausgeschlossen werden. Die hier zu verzeichnende niedrige Toxizität korreliert mit der schnellen Abnahme der DNA-Strangbrüche im Comet-Assay. Es scheint, dass die CACO-2-Zellen aufgrund der gelungenen DNA-Reparatur überleben können. Grundsätzlich ist die Reparatur von DNA-Strangbrüchen ein möglicher Resistenzfaktor. So können Proteine der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur die Sensitivität gegenüber Etoposid herabsetzen [80]. Die Beteiligung solcher Proteine an der in den CACO-2-Zellen stattgefundenen Reparatur wird an anderer Stelle diskutiert. Da die DNA-Strangbrüche sehr schnell entfernt wurden, kann zumindest eine Beteiligung von Proteinen des NHEJ angenommen werden.

Die höhere Konzentration von 50 μ M Etoposid war zytotoxisch, was sich in einer starken Reduktion des Koloniebildungsvermögens äußerte. Dass Etoposid mit steigender Konzentration stärkere Toxizität aufweist, ist nicht überraschend und findet sich auch an anderer Stelle [91, 104]. Die unter dieser Bedingung auch nur geringe Reduktion der DNA-Strangbrüche im Comet-Assay, ließ schon vermuten, dass hier ausreichend nicht

reparable DNA-Strangbrüche vorlagen, die den Zelltod auslösten. So könnte eine solch hohe Konzentration vermehrt Doppelstrangbrüche erzeugen [90]. Da für einen DNA-Doppelstrangbruch zwei Moleküle Etoposid nötig sind – für einen Einzelstrangbruch jedoch nur eines [9] – scheint dies plausibel.

Die dreistündige Inkubation mit Doxorubicin verursachte in den THP-1-Zellen im Laufe des darauf folgenden zytostatikafreien Intervalls von sechs Tagen eine starke Abnahme ihrer Viabilität, gemessen als Reduktion ihrer metabolischen Aktivität. Schon nach zwei Tagen konnte fast kein ATP mehr detektiert werden. Nach sechs Tagen gab es keine Viabilität mehr. Diese Behandlung war demnach hoch toxisch. Betrachtet man einen weiteren Parameter, der Zytotoxizität widerspiegeln kann, den sub-G1-Peak, so sieht man im untersuchten Zeitraum von drei Tagen nur eine geringe Zunahme fragmentierter DNA. Eine Fragmentierung der DNA wurde lange als Charakteristikum der Apoptose beschrieben. Wie schon beschrieben, kann die Apoptose auch ohne dieses Ereignis stattfinden [72, 101]. Zudem können sich die morphologischen Veränderungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten manifestieren [75]. Ein weiterer Punkt ist, dass auch während der Nekrose DNA abgebaut wird [76]. Aus diesem Grund wird hier vermieden, den Zelltod einem bestimmten Muster zuzuordnen. Es wird nur festgestellt, dass die THP-1-Zellen die hier gewählten Bedingungen nicht überlebten. Für Anthracycline wird oft beschrieben, dass sie Apoptose induzieren [105, 106]. Das gilt auch für Doxorubicin. Allerdings wurde gerade bei höheren Konzentrationen, zu welchen man die hier verwendeten 5 µM zählen kann, ebenso nicht-apoptotischer Zelltod beobachtet [29].

Aufgrund des Fortbestands der DNA-Strangbrüche war unter den gewählten Bedingungen – anders als nach der Behandlung mit Etoposid - ein Sterben der Zellen zu erwarten. Dass die Persistenz der durch Doxorubicin induzierten DNA-Strangbrüche Zytotoxizität vermittelt, ist bereits bekannt [107, 108].

Die Viabilität der CACO-2-Zellen im Anschluss an die dreistündige Behandlung mit Doxorubicin nahm ab. Eine relevante Zunahme des sub-G1-Peaks konnte nicht festgestellt werden. Zu diesem Aspekt wurde hier bereits ausgeführt, dass ein Fehlen der DNA-Fragmentierung alleine nicht ausreicht, um eine genauere Aussage zum Zelltodmodus zu treffen. Verglichen mit den THP-1-Zellen war die Reduktion der Viabilität in den CACO-2-Zellen schwächer ausgeprägt und ging langsamer vonstatten. Unter der gewählten Bedingung war bis zum Ende der Messung noch ein Rest an Viabilität zu sehen. Betrachtet man das Koloniebildungsvermögen, so war dies deutlich, aber nicht komplett eingeschränkt. Da sowohl das initiale Niveau der DNA-Strangbrüche als auch der Verlauf der Reparaturkurven im Comet-Assay bei beiden Zelllinien nach der Inkubation mit Doxorubicin sehr ähnlich war, scheinen die Unterschiede zu den THP-1-Zellen nicht darauf zu beruhen. Möglicherweise ist der zytotoxische Effekt des Doxorubicins auf die CACO-2-Zellen gar nicht

schwächer als auf die THP-1-Zellen, sondern erst später sichtbar. Brown et al. [103] schreiben, dass Zellen nicht sofort nach einer Behandlung sterben, sondern dieser Prozess Stunden bis mehrere Tage dauern kann und stark zelltypabhängig ist. Eine zu frühe Beurteilung der Zytotoxizität spiegelt eher die Geschwindigkeit des Eintritts des Zelltods wider, als die Gesamtheit toter Zellen. Die hier als Parameter für die Zytotoxizität herangezogenen sinkenden ATP-Levels wurden über eine Dauer von sechs Tagen gemessen. Die Viabilität der CACO-2 nahm bis dahin ab. Möglicherweise wäre sie zu einem späteren Zeitpunkt auf das Niveau der THP-1-Zellen gesunken, die kein messbares ATP mehr aufwiesen. Da die CACO-2-Zellen jedoch noch zur Koloniebildung fähig waren, ist davon auszugehen, dass tatsächlich ein geringer Teil der Zellen den Angriff durch Doxorubicin – im Gegensatz zu den THP-1-Zellen - überlebt hat.

5.3 Veränderungen des Zellzyklus nach Behandlung mit Topoisomerase II α -Inhibitoren

Zellen können auf eine Zytostatikabehandlung mit einem reduzierten Anteil oder mit einer Akkumulation in bestimmten Zellzyklusphasen reagieren. Eine Blockade im Zellzyklus kann der Zelle Zeit für die Reparatur geschädigter DNA geben oder verhindert ihre weitere Proliferation, sollte eine Reparatur nicht möglich sein [109]. Sowohl Etoposid als auch Doxorubicin wurden in verschiedenen Veröffentlichungen als Auslöser für einen Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase beschrieben [110-113].

Unter den gewählten Bedingungen konnte eine merkliche Akkumulation in der G2/M-Phase ausschließlich in den mit Doxorubicin behandelten CACO-2-Zellen beobachtet werden. Obwohl eine Zellzyklusblockade ein protektiver Mechanismus ist und Reparatur begünstigt, konnten die DNA-Strangbrüche nach der Behandlung mit Doxorubicin nicht behoben werden und sowohl die Viabilität als auch das klonogene Überleben waren stark beeinträchtigt. Eine G2/M-Blockade kann aber auch eine Art Endstation bedeuten, aus der die Zellen in den Zelltod gehen, wenn der Schaden zu groß ist. Auch an anderer Stelle wurde bereits beschrieben, dass im Falle des Doxorubicins eine Korrelation zwischen Zytotoxizität und einem G2/M-Arrest besteht [111, 114]. Die THP-1-Zellen zeigten unter der gleichen Bedingung keinen Zellzyklusarrest, sondern gingen ohne in der G2/M-Phase zu akkumulieren in den Zelltod, was bestätigt, dass eine solche Antwort zelltypabhängig ist [115]. Auf molekularer Ebene könnte der im Vergleich zu den CACO-2-Zellen stärker reduzierte Gehalt des CHK1-Proteins für das Abwenden des G2/M-Blocks verantwortlich sein. Das CHK1-Protein vermittelt einen G2/M-Arrest. Durch reduzierte CHK1-Levels wird der Zellzyklus weiter durchlaufen [116]. Zudem wird über eine verminderte Interaktion von CHK1 und Rad51 die HR unterdrückt [117]. Der Rad51-Gehalt nahm unter den

angewendeten Bedingungen in den THP-1-Zellen deutlich ab, was für eine Hemmung der HR-Aktivität spricht. In den THP-1-Zellen korrelierte das Ausbleiben des G2/M-Arrest mit einer im Vergleich zu den CACO-2-Zellen schnelleren Reduktion der Viabilität.

Die Etoposid-Inkubation führte zu keinen relevanten Veränderungen der Zellzyklusphasen. Beide Zelllinien konnten die DNA-Strangbrüche entfernen, ohne dass ein Zellzyklusarrest beansprucht wurde. Dies spricht – neben der raschen Reparatur der Strangbrüche - für NHEJ als Hauptreparaturweg, da dieser Mechanismus in jeder Phase des Zellzyklus agieren kann. Da die HR bevorzugt Schwesterchromatide als Template nutzt, ist deren Aktivität in der S- und G2-Phase verstärkt [34, 37]. Auch die THP-1-Zellen entfernten die DNA-Strangbrüche ohne einen Arrest. Im Gegensatz zu den CACO-2-Zellen stieg hier aber der Anteil toter Zellen. Ishiyama et al. [112] konnten in anderen als die hier gewählten Bedingungen in den THP-1-Zellen einen G2/M-Arrest feststellen. Diese waren durch niedrigere Konzentrationen und längere Inkubationszeiten von 24 h und 48 h gekennzeichnet und waren dabei ebenfalls toxisch.

Insgesamt waren die Korrelationen zwischen der Verteilung der Zellzyklusphasen, der Reparatur und dem Überleben der Zellen von wirkstoff- und zelltypabhängigen Unterschieden geprägt.

5.4 Reparaturproteine und Reparaturmechanismus

Die Gehalte der Proteine des NHEJ in den CACO-2-Zellen blieben während der gewählten Inkubationen konstant. Weder die in einen Zellzyklusarrest mündende Behandlung mit Doxorubicin, noch die Behandlung mit Etoposid, die mit erfolgreicher DNA-Reparatur und Überleben assoziiert war, waren mit relevanten Veränderungen dieser Proteine verbunden.

Die Untereinheiten des DNA-PK-Komplexes werden in Säugetierzellen in großen Mengen exprimiert [118]. Zudem scheint die Expression über den Zellzyklus hinweg konstant zu bleiben [119]. Für die Regulation der Aktivität der DNA-PK machen Lee et al. [119] eher post-translationale Ereignisse verantwortlich. Die durchgängig hohe Expression steht in Zusammenhang mit der zentralen Funktion in der Schadensantwort. Die konstanten Levels der NHEJ-Proteine der CACO-2-Zellen - unabhängig von Zellzyklusarrest oder Reparaturergebnis - sind mit diesen Ausführungen konform. Im Gegensatz dazu steigt der Gehalt an DNA-PKcs in den THP-1-Zellen unter den beiden hier gewählten Bedingungen. In diesen Fällen war die Proteinexpression also doch induzierbar. Shen et al. [120] stellten fest, dass eine erworbene Resistenz auf Doxorubicin in HL-60-Zellen mit einer Zunahme der mRNA- und Proteinlevels von DNA-PKcs einherging. Medunjanin et al. [121] fanden in ihren Untersuchungen heraus, dass die DNA-PKcs durch den Estrogenrezeptor- α transkriptional und translational hochreguliert wird. In der für diese Arbeit durchgeführten

Genexpressionsanalyse (GeXP) wurde eine leichte Zunahme (Etoposid) bzw. Reduktion (Doxorubicin) der mRNA-Levels der DNA-PKcs registriert. Ob diese zu der Änderung der Proteinexpression beitragen, soll schon aufgrund der starken Schwankungen um den Mittelwert nicht beurteilt werden. Grundsätzlich steht die Induktion der Proteinexpression, wie sie unter den angewendeten Bedingungen in den THP-1-Zellen vorkam, nicht im Gegensatz zur Literatur. Die verstärkte DNA-PKcs-Proteinexpression nach der Behandlung mit Etoposid spricht für eine verstärkte Aktivierung des NHEJ. Allerdings war die Reparatur schon abgeschlossen, als der Anstieg der DNA-PKcs erst sichtbar wurde. Es wurde auch keine Resistenz vermittelt, wie sie Shen et al. [120] nach Induktion der DNA-PKcs-Proteinexpression unter Doxorubicin fanden, denn die geschädigten THP-1-Zellen gingen in die Apoptose. Gemäß Song et al. [122] wäre aufgrund der Apoptose ein Abbau der DNA-PKcs-Proteine zu erwarten gewesen. Jedoch gibt es auch einen Hinweis auf persistierende DNA-PKcs-Foci in apoptotischen Zellen, in welchen noch DNA-Strangbrüche bestehen [123]. Folgt man der Theorie von Muslimovic et al. [89], dass nur sehr wenige – in dem dort beschriebenen Fall 0,3 % - der durch Etoposid induzierten Strangbrüche toxische Doppelstrangbrüche sind, so wäre es möglich, dass trotz der Ligation im Comet-Assay noch geringe Mengen Strangbrüche vorhanden sind. Die erhöhten DNA-PKcs-Levels könnten dann eine anhaltende Bemühung der THP-1 bedeuten, den noch bestehenden Schaden zu beheben, wie es de Campos-Nebel et al. [123] beschreiben.

Der anfängliche Anstieg der DNA-PKcs-Proteinkonzentration nach der Behandlung mit Doxorubicin in den THP-1-Zellen könnte in dem Versuch begründet sein, die DNA-Strangbrüche zu beheben. Das DNA-PKcs-Protein wird daraufhin wieder abgebaut. Die nach 24 h beobachtete starke Abnahme der Viabilität und der Abbau des Proteins passen daher in das Bild von Song et al., nachdem die DNA-PKcs im Laufe des Zelltods degradiert wird [122].

Die Proteine Rad51 und Rad54, die der Homologen Rekombination angehören, werden zellzyklusabhängig exprimiert und zeigen die höchsten Levels in der S- und G2-Phase [80, 124]. Die Expression des Rad54-Gens wird durch Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie kontrolliert. Auch post-translational findet eine Regulation statt. Mazin et al. [124] schreiben, dass in Säugetierzellen keine Induktion der Proteinexpression aufgrund eines DNA-Schadens festzustellen sei. Schonn et al. [91, 92] hingegen beschreiben einen Anstieg von Rad51 nach der Behandlung einer Kolonkarzinom-Zelllinie mit Doxorubicin oder Etoposid. Koehn et al. [115] kamen zu dem Schluss, dass die Regulation des Rad51 nach Doxorubicin-Inkubation in verschiedenen Tumorzellen unterschiedlich ausfällt. Obwohl in den CACO-2-Zellen nach der Inkubation mit Doxorubicin ein G2/M-Arrest ausgelöst wurde, blieb die Höhe der Expression des zentralen HR-Proteins Rad51 konstant und wurde demnach nicht durch die DNA-Strangbrüche beeinflusst.

Die mangelnden Veränderungen der Proteingehalte der HR, das Fehlen einer Zellzyklusblockade und die schnelle Reparatur nach Etoposid-Behandlung der CACO-2-Zellen weisen auf eine fehlerfreie Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche durch NHEJ hin. Für eine Beteiligung der HR gab es keine Anhaltspunkte.

In den THP-1-Zellen ist nach beiden Behandlungen eine verstärkte Rad54-Proteinexpression sichtbar, wobei der durch Doxorubicin ausgelöste Effekt schwach ist. Dies könnte ein Hinweis auf eine Beteiligung der HR an der Reparatur des durch Etoposid induzierten Schadens sein. Die Expression von Rad51 bleibt nach der Etoposid-Inkubation allerdings konstant.

Die Behandlung mit Doxorubicin führte hingegen zu einer starken Abnahme des Rad51-Proteingehalts. Diese Reduktion von Rad51 steht im Zusammenhang mit der später noch diskutierten CHK1-Abnahme. So verhindern niedrige CHK1-Level einen G2/M-Arrest und führen zur Verminderung von Rad51-Foci [122, 125].

5.5 Veränderung des Topoisomerase II α -Gehalts

Der Topoisomerase II α -Gehalt der THP-1-Zellen stieg sowohl nach der Etoposid- als auch nach der Doxorubicin-Inkubation an. Möglicherweise soll mit dieser Reaktion ein Ausgleich für das durch den Inhibitor blockierte Enzym geschaffen werden. Koehn et al. [115] vermuten, dass dies entweder eine Kompensation für an den Wirkstoff gebundenes Protein bedeute oder der Anstieg des Topoisomerase II α -Gehalt dem gesteigerten Bedarf aufgrund topologischer Reorganisation geschuldet ist.

Außerdem beschreiben sie, dass niedrige Doxorubicin-Konzentrationen in manchen Zelllinien Topoisomerase II α induzieren können. Auch, wenn 5 μ M keine niedrige Konzentration ist, so könnte es doch sein, dass nach dem Mediumswechsel in der Zelle verbleibendes Doxorubicin zu einer Induktion führt.

Da der Anstieg des Enzyms nach beiden Behandlungen eintrat, in den CACO-2-Zellen in beiden Fällen aber ausblieb, kann diese Veränderung nicht auf eine Eigenart des jeweiligen Topoisomerase II α -Inhibitors zurückgeführt werden, sondern scheint eher eine Eigenschaft der THP-1-Zellen zu sein. Da diese im Vergleich zu den CACO-2-Zellen niedrigere Topoisomerase II α -Spiegel aufweisen (Abb. 37), ist eine kompensatorische Antwort, wie sie Koehn et al. [115] beschreiben, eher zu erwarten.

5.6 Einfluss weiterer Proteine auf die Schadensantwort

Die Genexpressionsanalyse diente der Auswahl weiterer Proteine. Da erhöhte mRNA-Mengen nicht zwangsläufig mit einem Anstieg des betreffenden Proteingehalts korrelieren, wurde anschließend eine Proteinanalytik durchgeführt, denn für einen Einfluss

auf die Schadensantwort ist relevant, dass sich eine Veränderung auf Proteinebene bemerkbar macht.

Zur Korrelation von mRNA und Proteingehalt gibt es verschiedene Beobachtungen. Da mRNAs in Proteine translatiert werden, kann man zumindest eine gewisse Abhängigkeit des Gehalts von mRNA und Protein vermuten [126]. Insgesamt kamen die Studien, die dies in humanen oder Hefezellen untersuchten, zu unterschiedlichen Ergebnissen [127] und konnten in manchen Fällen positive Korrelationen zwischen mRNA- und Proteingehalt feststellen, in anderen wiederum nicht. Da verschiedene post-transkriptionelle Mechanismen in die Entstehung eines Proteins aus mRNA involviert sind, korrelieren quantitative Veränderungen der mRNA nicht zwangsläufig mit denen des entsprechenden Proteins. Zudem hängt der messbare Proteingehalt von der Halbwertszeit ab, die von Protein zu Protein sehr unterschiedlich sein kann. Ein weiterer Grund ist, dass sowohl Methoden der mRNA- als auch der Proteinanalytik störanfällig sind [126]. Der Gehalt der mRNA ist demnach hilfreich, nicht aber grundsätzlich geeignet, Voraussagen über Proteinmengen zu treffen [127].

Untersucht wurden im Anschluss an die GeXP das Protein ATM nach Behandlung der THP-1-Zellen mit Etoposid (GeXP: Anstieg) und das Protein CHK1 nach Behandlung der THP-1 (GeXP: Abnahme) und der CACO-2 (GeXP: Zunahme) mit Doxorubicin.

5.6.1 ATM

Der Gehalt an ATM-Protein der THP-1-Zellen nach Etoposid-Behandlung stieg hoch signifikant an. In diesem Fall war also eine Korrelation der Veränderung von mRNA- und Proteingehalt gegeben, was auf eine Beteiligung der Transkription an der Kontrolle des ATM-Levels hinweist. Der Proteingehalt von ATM bleibt normalerweise über den Zellzyklus hin weitgehend konstant. Durch ionisierende Strahlung wird schon bereitstehendes Protein aktiviert [128]. Nach Bestrahlung konnten Brown et al. [129] keine Zunahme der ATM-Proteinexpression feststellen, was auf eine post-translationale Regulation der Aktivierung schließen ließ. Es finden sich allerdings auch Hinweise darauf, dass der Proteingehalt von ATM durch eine Veränderung der Transkription beeinflusst wird. Dabei scheint der Transkriptionsfaktor E2F-1 erhöhte mRNA- und Proteinlevels zu verursachen [128].

Unter der Voraussetzung, dass der unter der gewählten Bedingung erfolgte Anstieg des ATM-Proteingehalts mit einem Anstieg des phosphorylierten Proteins (pATM) einhergeht, kann eine Beteiligung von ATM an der Schadensantwort angenommen werden. Es ist bekannt, dass ATM unmittelbar nach der Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen aktiviert wird [68, 99]. Dies ist auch für durch Etoposid induzierte Strangbrüche beschrieben

[13]. Die Proteinkinase ATM steht weit oben in der Signalkaskade und beeinflusst daher viele Bereiche der Schadensantwort, wie Zellzyklus, Zelltod und DNA-Reparatur. Riballo et al. [130] vermuten, dass ATM dann an der Reparatur eines Doppelstrangbruchs beteiligt ist, wenn dieser geschädigte DNA-Basen oder DNA-Zucker beinhaltet, also kompliziert ist. Dann kommt die Nuklease Artemis zum Einsatz, die diese DNA-Enden bearbeitet. Artemis wird dazu von ATM phosphoryliert und aktiviert. Da Etoposid hauptsächlich unkompliziertere Strangbrüche erzeugt, wird eine Beteiligung von ATM an der Reparatur dieser Strangbrüche angezweifelt [130, 131]. Hingegen beschreiben neuere Untersuchungen [132], dass ATM auch für die volle Aktivierung von DNA-PKcs notwendig ist. So führt die Unterbindung der Phosphorylierung von DNA-PKcs an Thr-2609, die durch ATM gesteuert wird, zu erhöhter Radiosensitivität und verminderter Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen. Auf diese Art ist ATM direkter in das NHEJ involviert, da die DNA-PKcs ein zentrales Protein dieses Reparaturwegs ist. Vor diesem Hintergrund steht die in den THP-1 beobachtete Zunahme von ATM in Zusammenhang mit der schnellen Reparatur der durch Etoposid induzierten Doppelstrangbrüche durch NHEJ. Allerdings kann ATM über die Phosphorylierung verschiedener Proteine auch an der Aktivierung der HR beteiligt sein (Abb. 9). Es interagiert zudem mit dem MRN-Komplex. Dieser ist kein exklusiver Faktor der HR, ist dort aber wichtig für die Prozessierung der DNA-Enden [133]. Da die Aktivierung von ATM ein frühes Ereignis der Schadensantwort darstellt und ATM auch an der Vermittlung der Apoptose beteiligt ist [133], steht die gesteigerte Expression von ATM auch in Bezug zu der initialen Zunahme apoptotischer THP-1-Zellen.

5.6.2 CHK1

In beiden Zelllinien führte Doxorubicin zu einem reduzierten Gehalt an CHK1-Protein. In den CACO-2-Zellen war dies deutlich geringer ausgeprägt als in den THP-1-Zellen. Bei den THP-1-Zellen korrelierte die Abnahme der mRNA mit dem verringerten Proteingehalt. Die CACO-2-Zellen zeigten keine Abnahme der mRNA-Levels.

Die Serin/Threonin-Kinase CHK1 reguliert sowohl den S- als auch den G2-Checkpoint [117, 125]. Zudem ist sie am Ablauf der Homologen Rekombination beteiligt [125]. Eine Abnahme des Proteingehalts von CHK1 kann demnach zu reduzierter Aktivität in diesen Bereichen führen.

Die parallele Abnahme von mRNA- und Proteingehalt der THP-1-Zellen, weisen auf eine Regulation der Proteinmengen auf Transkriptionsebene hin. Transkriptionskontrollierte Veränderungen von CHK1-Protein sind bekannt [128]. Eine verminderte Expression von CHK1 kann p21-abhängig durch p53 erfolgen [134]. Eine Reduktion von CHK1-Protein scheint jedoch nicht grundsätzlich transkriptionskontrolliert zu sein. Die Abnahme kann auch durch vermehrten Abbau bedingt sein [135, 136].

Den Abbau von CHK1-Protein nach Inkubation mit einem neuartigen Topoisomerase II-Inhibitor beschreiben Feng et al. [135]. Auch Camptothecin, ein Topoisomerase I-Inhibitor, induzierte eine Degradation von CHK1 über das Ubiquitin-Proteasom-System [136], wobei eine Phosphorylierung durch ATR sowohl die Aktivierung als auch den Abbau von CHK1-Protein einleitete. Zhang et al. [136] halten den Abbau des Proteins unter normalen Bedingungen für das Auflösen eines Zellzyklus-Arrests für wichtig. So soll eine unangemessene Verzögerung der Replikation vermieden werden. Feng et al. [135] beschreiben, dass die Degradation von CHK1-Protein ein Wirkmechanismus ihres Topoisomerase II-Inhibitors R16 ist und zu dessen zytotoxischer Aktivität beiträgt. Die Reduktion von CHK1 nach Doxorubicin-Behandlung in den THP-1-Zellen könnte also zu der starken ViabilitätseinbuÙe beigetragen haben.

Interessant ist, dass in den THP-1-Zellen mit dem CHK-1-Gehalt auch das Rad51-Protein abnimmt. In der Literatur ist beschrieben, dass eine Hemmung des CHK1 mittels siRNA oder chemischer Inhibitoren zu einer Abnahme von Rad51-DNA-Reparatur-Foci führte [137] und folglich die Homologe Rekombination beeinflusste. Die hier beobachtete Abnahme von Rad51 könnte also auf die Wechselwirkung mit CHK1 zurückzuführen sein.

Im Gegensatz zu den CACO-2-Zellen wurde in den THP-1-Zellen keine Zellzyklus-Blockade ausgelöst. Auch dies könnte auf den Abbau von CHK1-Protein zurückzuführen sein.

Der Rückgang des CHK1-Levels in den CACO-2-Zellen fiel deutlich geringer aus und schien nicht transkriptionsreguliert zu sein. Eine Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase wurde nicht verhindert. Anders als bei den THP-1-Zellen gab es hier auch keine Hinweise auf eine Beeinflussung der Homologen Rekombination via CHK1 und Rad51.

Die unterschiedlich starke Abnahme des Gehalts an CHK1-Protein ging demnach mit den abweichenden Reaktionen beider Zelllinien nach der Behandlung mit Doxorubicin einher.

5.7 Bedeutung des Topoisomerase II α -Gehalts für die Sensitivität gegenüber Topoisomerase II α -Inhibitoren

Die beiden Zelllinien unterschieden sich in ihrem Topoisomerase II α -Gehalt. Da Etoposid und Doxorubicin durch die Bindung der Topoisomerase II α DNA-Doppelstrangbrüche erzeugen, sollte die Empfindlichkeit der Tumorzellen mit der Menge dieses Targets zusammenhängen. Auch in der Literatur wird diese Korrelation beschrieben [138, 139]. Da die CACO-2-Zellen höhere Topoisomerase II α -Levels zeigten, müssten sie stärker geschädigt gewesen sein und die durch Doxorubicin und Etoposid vermittelte Zytotoxizität sollte ausgeprägter sein. Ein allgemeiner Zusammenhang zwischen der Sensitivität und dem Topoisomerase II α -Level der Zellen konnte jedoch nicht festgestellt werden. Nach Behandlung mit 50 μ M Etoposid war der in den THP-1-Zellen induzierte Schaden sogar

deutlich höher als in den CACO-2-Zellen. Letztere reagierten auch auf beide Zytostatika mit einer geringeren Zunahme toter Zellen bzw. einer geringeren Abnahme ihrer Viabilität. Mit der zur Proteinisolierung hier verwendeten Methode werden Proteine unabhängig von ihrer Lokalisation erfasst. Auch eine Unterscheidung zwischen DNA-gebundener und ungebundener Topoisomerase II α ist nicht möglich. Grundsätzlich könnte also auch ein höherer Gesamtgehalt des Enzyms mit einem vergleichsweise niedrigen Anteil DNA-gebundenen Enzyms einhergehen. Dies würde die Empfindlichkeit senken. Eine reduzierte Topoisomerase II α -Aktivität kann außerdem durch eine Modulation der katalytischen Aktivität durch Phosphorylierung oder auch durch verschiedene Mutationen im codierenden Gen entstehen [140].

5.8 Einfluss pharmakologischer Inhibitoren auf die Zytotoxizität von Etoposid und den Reparaturverlauf in THP-1-Zellen

Mittels pharmakologischer Inhibitoren können Proteine, deren Wirken der Entfernung des Schadens und dem Überleben der Zelle dient, gehemmt werden. Sie sind potentiell therapeutisch nutzbar. In Kombination mit Topoisomerase II α -Inhibitoren könnten sie verhindern, dass DNA-Doppelstrangbrüche repariert werden und somit die zytotoxischen Effekte von Doxorubicin und Etoposid verstärken. Im besten Falle könnte somit bei gleicher Dosierung eine bessere Wirkung erzielt werden oder aber die Dosis reduziert werden, um Nebenwirkungen abzuschwächen.

5.8.1 Faktoren des NHEJ

5.8.1.1 DNA-PKcs-Inhibitor NU7026

Die nach Etoposid-Behandlung erfolgte Zunahme des DNA-PKcs-Gehalts, ließ dieses Protein als geeigneten Kandidaten für eine gezielte Hemmung erscheinen. In verschiedenen Modellen wurde bereits beschrieben, dass eine Reduktion der DNA-PKcs-Aktivität zu einer Abnahme der DNA-Reparatur-Rate und erhöhten Radiosensitivität bzw. einer verstärkten Sensitivität gegenüber Topoisomerase II α -Inhibitoren führt [39, 141-143]. Der in dieser Arbeit verwendete Inhibitor NU7026 hemmt die DNA-PKcs selektiv und kompetitiv [141, 143].

Die Kombination von Etoposid und dem DNA-PKcs-Inhibitor NU7026 führte in THP-1-Zellen zu einer verstärkten Abnahme der Viabilität im Vergleich zu der Behandlung ohne den Inhibitor (Abb. 41). Außerdem veränderte sie den Verlauf der Reparatur. Der Schaden wurde langsamer behoben als nach der Behandlung nur mit Etoposid. Die Reparatur konnte demnach in ihrer Effizienz reduziert werden. Auch Willmore et al. [143] kamen zu dem

Schluss, dass NU7026 das Verschließen von durch Etoposid induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen hemmt und stellt eine Verstärkung des zytotoxischen Effekts von Etoposid fest. Die Gruppe um Iliakis und Wang [45] konnte sowohl in mit Wortmannin gehemmten Zellen als auch in DNA-PKcs-defizienten Zellen, eine verlangsamte Reparatur beobachten. Da diese in Mutanten, die defizient in verschiedenen zur HR gehörenden Genen waren, nicht zusätzlich verändert ablief, wurde daraus geschlossen, dass ein zweites, von der DNA-PKcs unabhängiges NHEJ (B (backup)-NHEJ), existiert. Die unter dem Einfluss des DNA-PKcs-Inhibitors verlangsamte Reparatur in den THP-1-Zellen könnte sowohl durch einen Wechsel zur Reparatur durch HR als auch zum B-NHEJ bedeuten. Es ist aber auch genauso möglich, dass von dem Inhibitor nicht erfasstes DNA-PKcs-Protein weiterhin an der Reparatur beteiligt ist. Um dies abschließend zu beurteilen, wäre es hilfreich, Proteine der genannten Mechanismen unter dem Einfluss von NU7026 zu analysieren. Unter der Anwendung anderer DNA-PKcs-Inhibitoren wurde beobachtet, dass eine katalytische Hemmung der DNA-PKcs gleichzeitig die HR unterdrückt. Dabei verhindert der Inhibitor das Ablösen der DNA-PKcs von der DNA und blockiert dabei den Zugang für Proteine der HR [144, 145].

Die unter den hier gewählten Bedingungen verlangsamte Reparaturkinetik unterstreicht noch einmal die Bedeutung der DNA-PKcs für die Behebung des DNA-Schadens und zeigt, dass NHEJ als Reparaturweg konsultiert wurde.

Zudem kann festgehalten werden, dass die durch Verminderung der DNA-PKcs-Aktivität verstärkte Etoposid-Wirkung bei gleichzeitig geringer Eigentoxizität des Inhibitors ein Indiz dafür ist, dass die Kombination aus DNA-PKcs-Hemmung und einem Topoisomerase II α -Inhibitor in der Tumorthherapie erfolgreich sein könnte.

5.8.1.2 Ligase-Inhibitor L189

Ligasen können zwei DNA-Enden miteinander verbinden. Im NHEJ wird diese Aufgabe von der Ligase IV – im Zusammenspiel mit anderen Reparaturproteinen – übernommen. Dadurch wird der zuvor gebrochene Doppelstrang wiederhergestellt. Eine Hemmung dieses Vorgangs boykottiert daher den letzten Schritt des NHEJ. Da aufgrund der schnellen Reparaturkinetik davon auszugehen ist, dass die durch Etoposid induzierten DNA-Doppelstrangbrüche in den THP-1-Zellen vor allem durch das NHEJ repariert wurden, könnte die Ligase-Hemmung die Toxizität von Etoposid erhöhen. Der Ligase-Inhibitor L189 inhibiert neben der Ligase IV auch die Ligasen I und III [87, 146]. Ligase I verbindet Okazaki-Fragmente während der DNA-Replikation [147]; Ligase III ist an der BER (base excision repair) beteiligt. Zudem wird beschrieben, dass sie die Ligase des B-NHEJ ist [148].

Unter dem Einfluss des kompetitiven Ligase-Inhibitors L189 kam es nach der Etoposid-Inkubation zu einer starken Abnahme der Zellviabilität, deren Ausmaß größer war

als die Summe der Einzeleffekte von Etoposid und des Inhibitors. Trotzdem verlief die Reparatur ohne relevante Veränderungen im Vergleich zur Etoposid-Behandlung ohne den Inhibitor. L189 war demnach zelltoxisch, ohne dass es den Ligationsschritt beeinträchtigte. Möglicherweise war die Konzentration des kompetitiven Inhibitors nicht hoch genug, um die Aktivität der Ligase ausreichend herabzusetzen. In der Literatur wurde für Zytotoxizitätsuntersuchungen ebenfalls eine konzentrationsabhängige Wirkung von L189 festgestellt [87]. Mit einer subtoxischen Konzentration von 20 μM konnte dort in machen Zelllinien die Wirkung von Methylmethansulfonat oder ionisierender Strahlung – konzentrationsabhängig bzw. in Abhängigkeit der verwendeten Strahlendosis – beträchtlich gesteigert werden. In Zellextrakten konnten 1 kb große DNA-Fragmente bei Anwesenheit von 100 μM L189 nicht zu Dimeren oder Multimeren zusammengefügt werden, was auf die Ligase IV-Hemmung zurückzuführen war. In diesem Versuchsaufbau war die Inhibitor-Konzentration also viel größer als in dieser Arbeit. Da Vorversuche allerdings gezeigt hatten, dass die Eigentoxizität des Inhibitors bei 100 μM sehr groß war und bei 50 μM neben einer ebenfalls erhöhten Eigentoxizität kein verstärkter zytotoxischer Effekt der Kombination aus dem Inhibitor und Etoposid im Vergleich zu 25 μM zu sehen war, wurden 25 μM gewählt.

Chen et al. [87] beschreiben, dass eine selektive Wirkung von L189 auf Krebszellen im Vergleich zu gesunden Zellen auf die unterschiedlichen Ligase-Levels zurückzuführen ist. So haben Krebszellen einen niedrigeren Ligase IV-Gehalt. Die Wirkung von L189 ist demnach vom Ligase-Gehalt abhängig. Ein im Vergleich zu den in [87] verwendeten Krebszellen höherer Gehalt an Ligase IV-Protein in den THP-1-Zellen könnte demnach zu der mangelnden Beeinflussung der Ligation beitragen.

Die unter den hier gewählten Bedingungen vermittelte Abnahme der Viabilität kann offensichtlich nicht auf die Hemmung der für die Ligation im NHEJ verantwortlichen Ligase IV zurückgeführt werden. Da ein für Ligase I spezifischer Inhibitor im Gegensatz zu L189 nicht zytotoxisch, sondern nur zytostatisch wirkt, vermuten Chen et al. [87], dass Ligase III – bei normaler oder gerade bei reduzierter Aktivität der Ligase I - für die Viabilität der Zelle erforderlich ist. Somit könnte die Reduktion der Viabilität mit der parallelen Hemmung der Ligase III in Zusammenhang stehen.

5.8.2 Weitere Faktoren der Schadensantwort

5.8.2.1 CHK1-Inhibitor TCS2312

Der CHK1-Inhibitor zeigte in der gewählten Konzentration eine gemäßigte Eigentoxizität und konnte die Zytotoxizität von Etoposid verstärken. Auch die Reparatur der durch Etoposid

verursachten DNA-Strangbrüche wurde durch den eingesetzten CHK1-Inhibitor abgeschwächt.

Wie bereits in Kapitel 5.6.2 beschrieben, reguliert CHK1 die S- und die G2/M-Phase des Zellzyklus und ist über Rad51 in den Prozess der Homologen Rekombination involviert [137]. Da die in den THP-1-Zellen untersuchten Proteine der HR nur einen leichten Anstieg von Rad54 zeigten und die Reparatur sehr schnell abgeschlossen war, wird hier das NHEJ als Hauptreparaturweg angesehen, der durch die HR ergänzt wird. Bedingungen, die eine größere Beteiligung der Homologen Rekombination in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen auslösen, müssten durch eine CHK1-Hemmung eine stärkere Beeinträchtigung erfahren.

Zellzyklus-Checkpoints geben Krebszellen die Möglichkeit, ihre durch Chemotherapeutika oder Bestrahlung geschädigte DNA zu reparieren und können auf diesem Weg den Zellen helfen zu überleben [149]. Aus diesem Grund bieten sie sich als therapeutische Angriffspunkte an. Zellen mit nicht reparierter DNA, die aufgrund gehemmter Checkpoints in die Mitose eintreten, sterben [149]. Krebszellen, die Defekte in der Funktion von p53 zeigen, könnten besonders empfindlich auf eine Hemmung des CHK1-Proteins reagieren [117]. Da p53 über die Aktivierung nachgeschalteter Targets einen Arrest in der G1-Phase vermitteln kann, sind durch eine zusätzliche Hemmung von CHK1 alle drei Checkpoints – und somit die Option zur DNA-Reparatur – beeinträchtigt (Abb. 49).

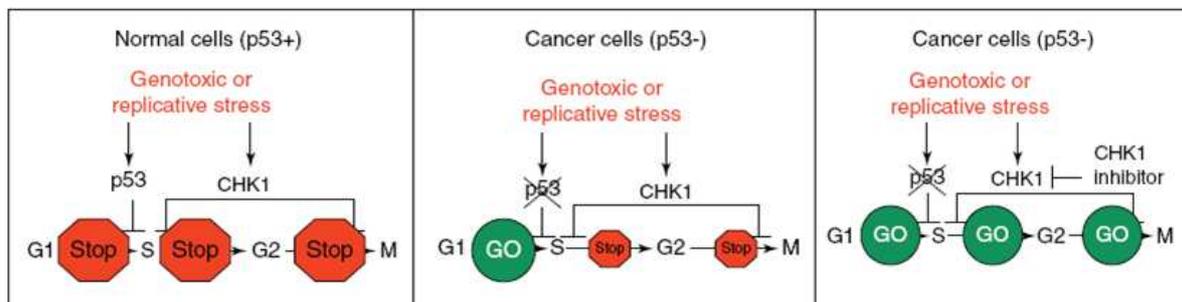


Abb. 49 Beeinflussung des Zellzyklus durch CHK1-Hemmung in Abhängigkeit der Funktion von p53 aus Ma et al.[117].

Auch in den THP-1-Zellen wurden Mutationen in p53 festgestellt, die zu Einbußen in dessen Funktion führen [150, 151]. Dies könnte zu ihrem Ansprechen auf TCS2312 beitragen.

Untersuchungen zu Kombinationen von CHK1-Inhibitoren mit Krebstherapeutika betrafen vor allem solche, die Replikationsgabeln blockieren oder Einzelstrangbrüche erzeugen [117]. Vermutlich beruht dies darauf, dass Doppelstrangbruch erzeugende Wirkstoffe erst nach erfolgter Resektion der DNA-Enden den ATR/CHK1-Weg aktivieren und nicht direkt, wie es beispielsweise bei den durch den Topoisomerase I-Inhibitor Irinotecan erzeugten Einzelstrangbrüchen der Fall ist [116, 117]. Studien mit Topoisomerase II α -Inhibitoren könnten trotz allem interessant sein. So zeigen auch der reduzierte CHK1-Proteingehalt

nach Behandlung der THP-1-Zellen mit Doxorubicin und die damit assoziierte Zytotoxizität sowie die Veröffentlichung von Feng et al. [135], die einen Abbau von CHK1 durch einen neuen Topoisomerase II-Inhibitor (R16) mit vermehrtem Zelltod in Zusammenhang bringt, dass niedrige Proteinlevels von CHK1 für die zytotoxischen Effekte von Topoisomerase II-Inhibitoren von Bedeutung sind.

Der von Chen et al. [152] durchgeführte Knockdown von CHK1 mit siRNA beeinträchtigte weder den Zellzyklus noch die Apoptoserate unbehandelter Zellen. Hingegen führte der Knockdown in Gegenwart von Doxorubicin oder Etoposid zu einer Verringerung der zytostatikainduzierten Akkumulation von Zellen in der G2-Phase und vermehrtem Zelltod, also einer Verstärkung der zytotoxischen Wirkung des Topoisomerase II α -Inhibitors.

Klinische Phase I-Studien mit dem CHK1-Inhibitor UCN-01, einem nicht-selektiven CHK1-Inhibitor, als Monotherapie oder in Kombination z. B. mit Irinotecan oder Topotecan, führten aufgrund ungünstiger Pharmakokinetik dazu, die weitere Entwicklung einzustellen [117]. In präklinischen Versuchsreihen mit neueren und selektiveren CHK1-Inhibitoren wurde auch eine potenzierende Wirkung auf ionisierende Strahlung oder Doxorubicin festgestellt. Für klinische Studien wurde dann jedoch keine Kombination mit einer Doppelstrangbruch erzeugenden Behandlung berücksichtigt. Klinische Phase I-Studien zu PF477736, SCH900776 und AZD7762 wurden bereits durchgeführt. Die Weiterentwicklung PF477736 wurde ebenfalls abgebrochen [117]. SCH900776 befand sich bereits in Phase II [153].

5.8.2.2 ATM-Kinase-Inhibitor

Ataxia telangiectasia (AT) ist eine genetische Störung, die durch eine Mutation im ATM-Protein gekennzeichnet ist und in Patienten unter anderem zu einer Immundefizienz und einer hohen Inzidenz bösartiger Tumoren führt. Auf zellulärer Ebene zeigt sich eine erhöhte Radiosensitivität [133]. Diese Beobachtungen und die Tatsache, dass ATM eine zentrale Funktion in der Schadensantwort auf DNA-Doppelstrangbrüche einnimmt, sprechen für ATM als geeignetes Target. Seine Hemmung könnte zu einer Sensitivierung von Tumorzellen gegenüber Topoisomerase II α -Inhibitoren führen. Auch aufgrund des Anstiegs der Proteinexpression nach Etoposid-Behandlung, erschien ATM für Hemmversuche interessant.

ATM ist über die Aktivierung der Nuklease Artemis an der Prozessierung von DNA-Enden komplizierterer DNA-Doppelstrangbrüche beteiligt [131], bevor diese im Rahmen des NHEJ wieder verschlossen werden. Riballo et al. [130] nehmen an, dass ATM keinen Einfluss auf die Reparatur von Doppelstrangbrüchen [89] hat, die durch Etoposid erzeugt wurden. Sie begründen das damit, dass die Strangbrüche unkompliziert seien und ohne eine

Prozessierung verschlossen würden. Auch in den THP-1-Zellen konnte die Reparatur nicht verhindert werden. Eine anfängliche Beeinträchtigung des Verlaufs der DNA-Strangbrüche im Comet-Assay hat jedoch stattgefunden. Dies spricht für die in 5.6.1 beschriebene Theorie, nachdem ATM über die Phosphorylierung der DNA-PKcs zu deren vollständigen Aktivierung benötigt wird. Durch die ATM-Inhibition wird die vollständige Aktivierung der DNA-PKcs gehemmt und die schnelle Ligation der DNA-Enden durch das NHEJ gebremst. Durch die verbleibende Aktivität der DNA-PKcs kann die Ligation schlussendlich aber doch stattfinden [132].

Auf den ersten Blick erklärt sich der höhere Schaden unmittelbar nach Beenden der Inkubation mit der Kombination aus Etoposid und dem ATM-Inhibitor nicht über eine Hemmung von Reparaturfaktoren, da die Reparatur erst nach dem Entstehen eines Schadens relevant wird. Auch kann kein additiver Effekt angenommen werden, da der Inhibitor alleine keine Strangbrüche erzeugt. Auf methodischer Seite besteht die Möglichkeit, dass die Zellen nicht schnell genug aufgearbeitet wurden und dadurch ein Teil der DSB nach der alleinigen Etoposid-Behandlung schon repariert werden konnte. Die zusätzliche ATM-Inhibition hingegen verlangsamte die Reparatur wie eben beschrieben, so dass hier ein vermeintlich höherer Initialschaden in Erscheinung trat. Die Höhe des Initialschadens hatte in den THP-1-Zellen bisher jedoch keinen negativen Einfluss auf den Reparaturverlauf. So wurde der höhere Schaden nach der 50 μM Behandlung mit Etoposid (Abb. 14) sogar rascher behoben als nach der 5 μM Behandlung (Abb. 21).

Die Zytotoxizität der Kombination aus Etoposid und Inhibitor scheint mit der starken Eigentoxizität des ATM-Inhibitors einherzugehen. Da ATM in die Regulation einer Vielzahl von Proteinen involviert ist, sind durch eine Hemmung unspezifische Effekte zu erwarten. Möglicherweise spielen aber auch Faktoren eine Rolle, die die Reparatur betreffen aber im Comet-Assay nicht sichtbar werden. Hierzu wird noch einmal die Beobachtung von Muslimovic et al. [89] herangezogen, nach der nur ein ganz geringer Teil der DSB toxische Doppelstrangbrüche sind. Es ist wahrscheinlich, dass diese einer Prozessierung über den ATM/Artemis-Weg oder im Rahmen der HR bedürfen. Da beide Wege durch die Hemmung von ATM beeinflusst werden, könnte auf diesem Weg eine erhöhte Toxizität entstehen.

6 Fazit und Ausblick

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass die zelluläre Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche sowohl von dem verwendeten Topoisomerase II α -Inhibitor als auch von der verwendeten Zelllinie abhängt.

Während Doxorubicin persistierende DNA-Strangbrüche (DSB) verursacht, werden durch Etoposid induzierte DSB schnell repariert. Dieser Unterschied ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Doxorubicin in die DNA interkaliert. Auch ein höheres Verhältnis von Doppelstrangbrüchen zu Einzelstrangbrüchen kann zu dem irreparablen DNA-Schaden beitragen. Dies könnte durch die Detektion von γ H2AX nach beiden Behandlungen festgestellt werden. Weitere mögliche Einflussfaktoren sind die Komplexität und die Lokalisation der DNA-Strangbrüche.

Die Toxizität von Doxorubicin wird durch die Persistenz seiner Doppelstrangbrüche vermittelt. Im Falle von Etoposid scheint weniger die Reparatur an sich als deren korrekte Ausführung zu bestimmen, ob vermehrter Zelltod eintritt oder nicht. Werden die Strangbrüche nicht erfolgreich repariert, sterben die Zellen trotz augenscheinlicher Ligation der DNA-Enden. Eine korrekte Reparatur hingegen kann Resistenz vermitteln. Aufgrund der schnellen Reparaturkinetik wird NHEJ als Hauptreparaturweg angenommen.

Versuche mit pharmakologischen Inhibitoren weisen darauf hin, dass die Hemmung der DNA-PKcs und von CHK1 die Wirkung von Etoposid verstärken kann. Um diese Ergebnisse besser beurteilen zu können, sollte zunächst untersucht werden, ob diese Effekte auch in anderen Zelllinien zu beobachten sind.

Zum genaueren Verständnis der Inhibitoren kann die Analyse weiterer Proteine beitragen. So könnte zum Beispiel festgestellt werden, ob durch eine DNA-PKcs-Hemmung verstärkt Proteine anderer Reparaturwege exprimiert werden.

Interessant könnten auch Kombinationen aus verschiedenen Inhibitoren sein. Die parallele Anwendung eines CHK1- und eines DNA-PKcs-Inhibitors setzt an zwei unterschiedlichen Stellen der Schadensantwort an und könnte damit stärkere Effekte erzielen.

7 Zusammenfassung

Diese Arbeit handelt von der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen. Im Besonderen soll der Einfluss von Inhibitoren der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur auf die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Topoisomerase II α -Inhibitoren untersucht werden. Als Vertreter dieser Gruppe wurden die Zytostatika Etoposid und Doxorubicin eingesetzt. Die Experimente wurden in der AML-Zelllinie THP-1 und der Kolonkarzinomzelllinie CACO-2 durchgeführt.

Unter den gewählten Bedingungen konnten durch Etoposid induzierte DNA-Strangbrüche fast immer schnell entfernt werden, wohingegen nach Behandlung mit Doxorubicin entstandene DNA-Strangbrüche wegen dessen Interkalation in die DNA bestehen blieben. Die Korrelation des Reparaturgeschehens mit den zytotoxischen Effekten fiel dabei unterschiedlich aus. Während die Reparatur nach der Behandlung mit 5 μ M Etoposid in den CACO-2-Zellen mit einem fast unverändert hohen Anteil vitaler Zellen einherging, stieg unter den gleichen Bedingungen der Anteil toter THP-1-Zellen. Die Persistenz der durch Doxorubicin induzierten DNA-Strangbrüche korrelierte mit einer Reduktion der Viabilität, wobei die THP-1-Zellen stärker reagierten. Als bestimmende Parameter für die zytotoxische Wirkung von DNA-Strangbrüchen werden die Komplexität des Strangbruchs, das Verhältnis von Doppelstrangbrüchen zu Einzelstrangbrüchen und deren Lokalisation angenommen.

Im Falle der Inkubation mit Etoposid kann bei den CACO-2-Zellen von einer resistenzvermittelnden Wirkung der DNA-Reparatur gesprochen werden. Es fand eine schnelle Ligation der Strangbrüche statt, ohne dass es unter den gewählten Bedingungen zu weiteren relevanten Veränderungen kam. Aufgrund der schnellen Kinetik der Reparatur wird auf NHEJ als Hauptweg geschlossen.

Die Zunahme toter Zellen in den THP-1-Zellen nach der Behandlung mit Etoposid zeigt, dass die DNA-Reparatur hier keine resistenzvermittelnde Wirkung hatte. Der Anstieg sowohl der DNA-PKcs-Levels als auch der Expression von Rad54 spricht dafür, dass die Doppelstrangbrüche durch das NHEJ alleine nicht korrekt behoben werden konnten. Ein Modell für diesen Fall ist die rasche, aber ungenaue, Ligation der DNA-Enden mit einem sich anschließenden Versuch der Überarbeitung durch Proteine der HR. Da der Zelltod allerdings sehr rasch eintrat, konnte dieser langsamere Reparaturweg nicht mehr erfolgreich arbeiten. Zudem war der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase im Vergleich zu den CACO-2-Zellen geringer, so dass nicht genügend geeignete Templates für die HR zur Verfügung standen.

Während die CACO-2-Zellen nach Doxorubicin-Behandlung in der G2/M-Phase akkumulierten, schritten die THP-1-Zellen weiter voran. Der im Vergleich zu den CACO-2-Zellen stärker erniedrigte CHK1-Gehalt verhinderte einen G2/M-Arrest. Gleichzeitig führte er zu reduzierten Rad51-Levels und stand somit einer Bearbeitung der DNA-Enden durch die HR entgegen. Die Zellen starben. Grundsätzlich kann ein solcher Arrest der Zelle Zeit zur Reparatur geben. Wenn niedrige CHK1-Levels mit einer verminderten Fähigkeit zur Reparatur und einer Unterdrückung von Kontrollpunkten einhergehen, so sollte eine Hemmung von CHK1 die Wirkung von Topoisomerase II α -Inhibitoren verstärken können. Aus diesem Grund wurden Untersuchungen mit einem CHK1-Inhibitor durchgeführt.

Um den Beitrag weiterer Proteine zur DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur zu beurteilen, wurden Versuche mit einem DNA-PKcs-, einem ATM- und einem Ligase-Inhibitor durchgeführt. Dabei wurde ausschließlich mit den THP-1-Zellen nach Etoposid-Inkubation gearbeitet.

Relevante Einflüsse auf den Reparaturverlauf ergaben sich aus den Versuchen mit dem CHK1-Inhibitor und dem DNA-PKcs-Inhibitor.

Durch die CHK1-Hemmung blieb das Niveau der DNA-Strangbrüche bis zum Ende erhöht. Da reduzierte CHK1-Levels zu einer Abschwächung der HR führen können, stellt dies ein Indiz dafür da, dass die HR an der Reparatur beteiligt ist. Auch die zytotoxische Wirkung von Etoposid wurde verstärkt. Dieses Ergebnis spricht für CHK1 als therapeutisches Target zur Verbesserung der Etoposid-Wirkung.

Die Inhibition der DNA-PKcs konnte die Reparatur verlangsamen. Die Toxizität von Etoposid wurde dabei verstärkt. Dies bestätigt den Beitrag der DNA-PKcs am Reparaturgeschehen.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Einfluss der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen auf die Sensitivität von Topoisomerase II α -Inhibitoren von der verwendeten Zelllinie abhängt. Die Zusammenhänge zwischen gesteigerter Proteinexpression, Zellzyklusarrest, Reparatur und Zytotoxizität fielen dabei sehr unterschiedlich aus. Außerdem konnte die Empfindlichkeit von Zellen gegenüber Etoposid durch gezielte Hemmung von Proteinen der Schadensantwort gesteigert werden.

8 Summary

This thesis investigates the influence of inhibitors of DNA double-strand break repair on the sensitivity of tumour cells to topoisomerase II α inhibitors. The anticancer agents etoposide and doxorubicin were used as representatives of this drug type. The experiments were carried out in THP-1 cells (AML cell line) and in CACO-2 cells (colon carcinoma cell line).

The results showed that DNA strand breaks induced by etoposide were rapidly removed, whereas DNA strand breaks produced by doxorubicin persisted, presumably due to its DNA intercalation. There was no universal correlation between DNA repair after etoposide treatment and cell survival. CACO-2 showed no increase of dead cells. In contrast, analysis of THP-1 cells revealed a decrease in living cells. The persistence of strand breaks induced by doxorubicin correlated with cytotoxicity.

Possible determinants of cytotoxicity of DNA strand breaks are the complexity of strand breaks, the ratio of single to double-strand breaks and the localisation of break sites.

Etoposide resistance in CACO-2 cells seemed to be a consequence of DNA repair. DNA ends were rapidly re-ligated without any other relevant response, e.g. cell cycle arrest or protein expression. It can be concluded from the fast repair kinetics that most of the strand breaks were successfully repaired by NHEJ (non-homologous end joining).

As there was an increase in dead THP-1 cells after etoposide treatment, resistance could obviously not be achieved by strand re-ligation in this case. Rising Rad54 levels in addition to increased DNA-PKcs levels indicated that NHEJ could not cope with the induced double-strand breaks alone. This can be described by the following model: NHEJ rejoined the two DNA ends in a fast but error-prone way. Therefore, homologous recombination proteins were applied to rework the ligation. As cell death occurred very soon, HR (homologous recombination) proteins could not complete their task. In addition, the percentage of cells in G2/M stage was lower than in CACO-2 cells which indicates a lack of adequate templates for repair through HR.

Doxorubicin caused CACO-2 cells, but not THP-1 cells to accumulate at G2/M. This difference might result from the more pronounced decrease of CHK1 protein levels in THP-1 cells. Low CHK1 levels work against a cell cycle arrest. Further, reduced CHK1 protein levels led to a decrease in Rad51 levels thereby hindering HR. The cells died. Basically, a cell cycle arrest may allow for repair. If low CHK1 levels are associated with suppressed checkpoints and a reduced repair capacity the effects of topoisomerase II α inhibitors will be increased through inhibition of CHK1. For this reason, experiments were conducted with a CHK1 inhibitor.

In order to assess the contribution of further proteins to the DNA double-strand break repair experiments were carried out with inhibitors of DNA-PKcs, ATM, and Ligase. These assays were performed on THP-1 cells after etoposide treatment. The CHK1 inhibitor and the DNA-PKcs inhibitor were able to influence the repair course. The inhibition of CHK1 led to elevated levels of strand breaks until the end of the experiment. As reduced CHK1 levels are able to attenuate repair through HR, this result implies that HR was part of the answer towards etoposide-induced double-strand breaks. Moreover, the cytotoxic effect of etoposide was potentiated by the CHK1 inhibitor. Altogether, these observations indicate that CHK1 could be a target in combination therapy with etoposide.

The DNA-PKcs inhibitor reduced the repair rate. The toxicity of etoposide increased. These results underline the importance of DNA-PKcs in DNA double-strand break repair.

This study could demonstrate that the influence of DNA double strand break repair on the sensitivity to topoisomerase II α inhibitors is cell type-dependent. Correlations between changes in protein expression, cell cycle shifts, repair and cytotoxicity were cell type and drug-dependend.

The specific inhibition of damage response proteins could improve the sensitivity of tumour cells to Etoposide.

9 Material und Methoden

9.1 Geräte

Elektrophorese

Mini-V 8.10 System, Fa. Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland

FACS

FACScalibur, Fa. BD, Franklin Lakes, NJ, USA

Fluoreszenz- und Lichtmikroskop

Olympus IX51, Fa. Olympus Optical GmbH, Hamburg, Deutschland

Geldokumentation

UVIchemi 12.1

Software UVIprochemi 12.1, Fa. Uvitec Ltd, Cambridge, UK

GeXP

GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System, Fa. Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland

Inkubator

HeraCell, Fa. Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland

Luminometer

Anthos Lucy2 mit Software Lucysoft 1.6, Fa. Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld, Deutschland

ph-Meter

Metrohm 605 mit Glaselektrode Metrohm 6.0233.100, Deutsche Metrohm GmbH & Co.KG, Filderstadt, Deutschland

Power-Supply

Biometra Standard Power Pack P25, Biometra GmbH, Göttingen, Germany

Sterilwerkbank

Gelaire BSP 72, mikrobiologische Sicherheitswerkbank Klasse 2, Fa. GelairePTY LTD, Sydney, Australien

Thermoblock

Thermomixer comfort, Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Thermocycler

T personal, Fa. Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland

Ultraschallgerät

Ultraschall-Desintegrator UP100H , Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Germany

UV/VIS-Spektrometer

Genesys 10uv scanning, Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

NanoDrop @ND- T personal 1000 Spectrophotometer, Fa. PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

Western-Blot-Apparatur

Mini-V 8.10 Blot Module, Fa. Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland

Zentrifugen

Heraeus Labofuge 400R, Fa. Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland

Mini Spin, Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

9.2 Kultivierung der beiden Zelllinien THP-1 und CACO-2

9.2.1 THP-1

Bei den THP-1-Zellen handelt es sich um eine Suspensionskultur die 1978 etabliert wurde. Sie wurde aus dem Blut eines einjährigen Jungen mit akuter monozytärer Leukämie gewonnen [154]. Die Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO₂ in RPMI Medium 1640 - GlutaMAX™-I (Firma life technologies), versetzt mit 10 % FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin-Glutamin-Lösung, kultiviert und alle drei bis vier Tage passagiert. Dabei werden sie im Verhältnis 1:8 - 1:10 geteilt und in 20 ml frisches Medium gegeben (1-2 x 10⁵ Zellen/ml). Die Verdopplungszeit beträgt ca. 30 h.

Um sich einen Vorrat in flüssigem Stickstoff anzulegen, werden ca. 5 x 10⁶ THP-1-Zellen in 1,8 ml Wachstumsmedium, das 10 % DMSO enthält, in ein Kryoröhrchen pipettiert und zunächst über Nacht bei -80 °C eingefroren. Anschließend werden die Kulturen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Nach dem Auftauen der Zellen werden diese in auf 37 °C temperiertes Kulturmedium gebracht. Nach 24 h kann die Zellsuspension das erste Mal passagiert werden.

Für die Versuche wurden Zellen der Passagen 9 - 40 benutzt.

Tab. 7 Reagenzien Zellkultur THP-1

Penicillin-Streptomycin-Glutamin-Lösung	10000 I.E. Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin, 29,2 mg/ml L-Glutamine in einem 10 mM Citrat-Puffer
---	--

9.2.2 CACO-2-Zellen

Bei CACO-2-Zellen handelt es sich um eine adhärent wachsende Kultur die 1974 etabliert wurde. Sie entstammt dem Kolonkarzinom (Adenokarzinom) eineszweiundsiebzigjährigen Mannes [155]. Die Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO₂ in DMEM, High Glucose, GlutaMAX™-I (Firma life technologies), versetzt mit 10 % FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin-Glutamin-Lösung, kultiviert und alle drei bis vier Tage passagiert. Dabei werden sie im Verhältnis 1:6 - 1:10 geteilt und in 20 ml frisches Medium gegeben (0,8-

1 x 10⁵ Zellen/ml). Die Verdopplungszeit beträgt ca. 24-29 h. Die angegebene Zeit ist demnach deutlich schneller, als die Angabe des DMSZ, das eine Kultivierung mit 80 % MEM mit Earle's Salzen + 20 % FBS + 1 x nicht-essentielle Aminosäuren empfiehlt und dabei eine Verdopplungszeit von ca. 80 h angibt. Vermutlich begründet sich das schnelle Wachstum der CACO-2-Zellen in dem GlutaMAX™-Medium, dass eine kontinuierliche L-Glutamin-Zugabe gewährleistet und einen positiven Einfluss auf das Zellwachstum und die Viabilität von Zellen haben soll [156].

Um sich einen Vorrat in flüssigem Stickstoff anzulegen, werden ca. 5 x 10⁶ THP-1-Zellen in 1,8 ml Wachstumsmedium, das 10 % DMSO enthält, in ein Kryoröhrchen pipettiert und zunächst über Nacht bei -80 °C eingefroren. Anschließend werden die Kulturen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Nach dem Auftauen der Zellen werden diese in auf 37 °C temperiertes Kulturmedium gebracht. Nach 24 h kann die Zellsuspension das erste Mal passagiert werden.

Für die Versuche wurden Zellen der Passagen 9-40 benutzt.

PBS	135 mM NaCl, 9 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 2,7 mM KCl
Penicillin-Streptomycin-Glutamin-Lösung	10000 I.E. Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin, 29,2 mg/ml L-Glutamine in einem 10 mM Citrat-Puffer
0,5% Trypsin-EDTA (10x),	0,5 % Trypsin; 0,2 % EDTA in 0,9 % NaCl

9.3 Detektion der DNA-Strangbrüche

9.3.1 Comet-Assay

Die Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen erfolgt mithilfe des alkalischen Comet-Assays, basierend auf der Methode von Singh et al. [157]. Je Zellkulturschale (60 mm) werden 3 x 10⁵ CACO-2-Zellen in 5 ml Medium ausplattiert und für 24 h inkubiert. Anschließend erfolgt die Behandlung mit Etoposid beziehungsweise Doxorubicin. 4-5 x 10⁵ THP-1-Zellen werden der Kulturflasche entnommen und in 5 ml zytostatikahaltigem Medium ausplattiert. Nach Ablauf der Behandlung wird das wirkstoffhaltige Medium nach Zentrifugation (5 min, 1800 rpm) durch normales Wachstumsmedium ersetzt, in welchem die Zellen weiter inkubiert werden.

Zur Aufbereitung werden die CACO-2-Zellen zunächst mit Trypsin-EDTA-Lösung von der Platte abgelöst. Die Trypsinierung wird mit dem zuvor abgenommenen Medium gestoppt, damit eventuell abgelöste Zellen nicht verloren gehen. Anschließend wird zentrifugiert (5 min, 1800 rpm) und zweimal mit PBS gewaschen. Die THP-1-Suspensionszellen werden lediglich abzentrifugiert und ebenfalls zweimal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wird in 100 µl PBS resuspendiert und mit 300 µl 0,5 %iger LMPA-Lösung (37 °C) vermischt. 150 µl dieser Suspension werden auf einen mit 1,2 %iger Agarose beschichteten, zuvor gekühlten Objektträger pipettiert. Diese Schicht wird daraufhin mit einem Deckglas abgedeckt und bei 4 °C für 10 min erstarren gelassen. Das Deckglas wird dann vorsichtig abgenommen, um eine weitere Schicht LMPA-Lösung aufzutragen. Anschließend wird es erneut auf den Objektträger aufgebracht. Auch diese Schicht lässt man bei 4 °C erstarren. Damit die DNA später im elektrischen Feld wandern kann, muss zunächst die Zellmembran aufgeschlossen werden. Hierfür werden die Objektträger – ohne Deckglas – für mindestens eine Stunde bei 4 °C unter Lichtausschluss in Final-Lysing-Solution gelagert. Bei den nun folgenden Schritten wird direktes Licht vermieden, um eine zusätzliche Schädigung der DNA zu verhindern. Nach zweimaligem Waschen mit kaltem Neutralisationspuffer werden die Objektträger in die mit Elektrophoresepuffer (pH13) gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Diese steht im Kühlschrank, damit eine ausreichende und gleichmäßige Kühlung gewährleistet ist. In den darauffolgenden 45 min wird der DNA die Möglichkeit gegeben, sich in dem stark alkalischen Milieu zu entwinden. Danach erfolgt die Elektrophorese (20 min, 0,7 V/cm, 150 mA). Die DNA-Bruchstücke wandern nun größenabhängig zur Anode. Je mehr Doppelstrangbrüche vorhanden sind, desto weiter wandert die DNA, was dieser ein kometenartiges Aussehen verleiht: Im „Kometenkern“ befindet sich DNA ohne Strangbrüche, im „Kometenschweif“ gebrochene DNA.

Nach der Elektrophorese werden die Objektträger zweimal mit Neutralisationspuffer gewaschen und 5 min in kaltem Ethanol 96 % fixiert. Nachdem die Träger an der Luft getrocknet sind (ca. 10 min), werden sie mit je 70 µl SYBR Green ITM-Lösung gefärbt.

Zur Auswertung werden je Objektträger 100 Nukleotide analysiert. Zunächst wird der gesamte Objektträger bei 100-facher Vergrößerung betrachtet, um seine Homogenität festzustellen. Dann wird die eigentliche Analyse bei 400-facher Vergrößerung durchgeführt.

Die „Kometen“ werden nach ihrer Diffusität und der Länge ihres „Schweifes“ charakterisiert und in sechs Kategorien eingeteilt. Nukleotide, deren DNA keine Schädigung erfahren hat, werden der Kategorie 1 zugeteilt. Kategorie 6 steht für sehr stark geschädigte DNA. Hier ist die DNA diffus und kein „Kometenkern“ mehr zu erkennen.

Zur Darstellung des Gesamtschadens wird ein Score gebildet, der sich wie folgt berechnet:

$$\text{Score [au]} = \sum(1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3 + 4 \times n_4 + 5 \times n_5 + 6 \times n_6)$$

au: arbitrary units

n_x : Summe der Zellen der jeweiligen Kategorie

Zur besseren Vergleichbarkeit der Experimente wird der Score auf den Wert der Kontrolle normiert.

Tab. 8 Reagenzien Comet-Assay

Agarose zur Beschichtung der Objektträger	1,2 % in PBS
Elektrophoresepuffer	300 mM NaOH, 0,1 mM Na ₂ EDTA, pH 13
Final-Lysing-Solution	2,5 M NaCl, 100 mM Na ₂ EDTA, 10 mM Tris, 1 % Triton X-100, pH10
LMPA (Low-melting-point Agarose)	0,5 % Agarose LMPA in PBS
Neutralisationspuffer	400 mM Tris, pH 7,5
PBS	135 mM NaCl, 9 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 2,7 mM KCl
SYBR Green ITM-Lösung	1:10000 SYBR Green ITM in TE-Puffer
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,5

9.4 Methoden zur Bewertung der Zytotoxizität

9.4.1 CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay

Die Untersuchung der Zellviabilität nach Behandlung mit Doxorubicin erfolgt mit dem CellTiter-GLO® Luminescent Cell Viability Assay. Als Parameter für die Viabilität wird hier die ATP-Menge der Zellen mittels Biolumineszenz bestimmt. ATP ist in allen metabolisch aktiven Zellen präsent. Bei Zellschädigung kommt es zu einer raschen Abnahme des zytoplasmatischen ATP-Levels[158]. Zum einen können nicht vitale Zellen kein ATP synthetisieren. Zum anderen bauen endogene ATPasen noch vorhandenes ATP ab. Neben Zelltod führt auch eine verminderte Zellteilungsrate zur Reduktion des ATP-Gehalts [159].

Das CellTiter-Glo®-Reagenz lysiert die Zellmembranen, um ATP frei zu setzen und hemmt endogene ATPasen. Es enthält alle für die Erzeugung des Bioluminszenzsignals notwendigen Komponenten (Luciferase, Luciferin) [160].

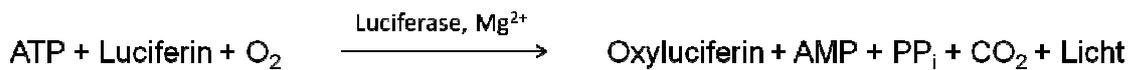


Abb. 50 CellTiter-Glo: Biolumineszenzreaktion

Die CACO-2-Zellen werden in einer 96-well-Platte (LumiNunc™) in 100 µl normalem Wachstumsmedium pro Well ausplattiert (Zelldichte siehe Tab. 10) und 24 h später – nach Abnehmen des Mediums - mit je 100 µl Zytostatikalösung behandelt. Zum Einleiten des zytostatikafreien Intervalls werden sie zweimal vorsichtig mit normalem Wachstumsmedium gewaschen und anschließend in 5 ml dieses Mediums inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Die THP-1-Zellen werden ihrer Kulturflasche entnommen, gezählt (siehe Tab. 9) und in 5 ml Zytostatikum in einer 60-mm-Kulturschale inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Zum Mediumswechsel werden sie zentrifugiert (5 min, 1800 rpm), zweimal gewaschen (1 x PBS) und in zytostatikafreiem Medium – wieder in einer 60-mm-Kulturschale – ausplattiert. Erst vor der Messung werden je 100 µl der Zellsuspension in eine 96-Well-Platte (LumiNunc™) pipettiert. Um Temperaturschwankungen zu verhindern, die sich auf die Luciferase-Reaktion auswirken können [159], wird die Platte eine halbe Stunde vor Zugabe des Reagens aus dem Inkubator genommen und auf Raumtemperatur temperiert. Anschließend werden in jedes Well 50 µl des CellTiter-Glo®-Reagens pipettiert. Die Platte wird 10 min geschüttelt und weiter 10 min ruhen gelassen. Anschließend erfolgt die Messung am Luminometer. Die verwendeten Zellzahlen wurden in Vorversuchen ermittelt. Dabei verhielt sich die Signalintensität linear zu Menge der Zellen.

Für die Analyse der THP-1-Zellen werden folgende Bedingungen und Zellzahlen verwendet.

Tab. 9 Inkubationsschemata THP-1

Doxorubicin-Konz.	Zeit	Zellzahl	Platte/Schale
5 µM	3 h + 24 h	2,5 x 10 ⁵	60-mm-Kulturschale
5 µM	3 h + 48 h	2,5 x 10 ⁵	60-mm-Kulturschale
5 µM	3 h + 144 h	2,5 x 10 ⁵	60-mm-Kulturschale

Bei den CACO-2-Zellen werden die Zellzahlen stärker angepasst, um zu verhindern, dass sie bei längeren Inkubationszeiten zu dicht wachsen:

Tab. 10 Inkubationsschemata CACO-2

Doxorubicin-Konz.	Zeit	Zellzahl	Platte/Schale
5 µM	3 h + 24 h	5000	96-well-Platte
5 µM	3 h + 48 h	3500	96-well-Platte
5 µM	3 h + 144 h	2500	96-well-Platte

Die Methoden zur Untersuchung nach Behandlung mit Etoposid und pharmakologischen Inhibitoren werden an anderer Stelle beschrieben.

Tab. 11 Reagenzien Viabilitätsassay

CellTiter-Glo®-Reagenz	CellTiter-Glo® Substrat und CellTiter-Glo® Puffer
PBS	135 mM NaCl, 9 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 2,7 mM KCl

9.4.2 Bestimmung des Anteils abgelöster Zellen

In eine 60-mm-Kulturschale werden $3,5 \times 10^5$ CACO-2-Zellen ausplattiert und für mindestens 24 h anwachsen gelassen. Anschließend erfolgt die Behandlung mit 5 µM Etoposid über einen Zeitraum von drei Stunden. Zum Mediumswechsel wird das zytostatikahaltige Medium abgesaugt. Die sich darin befindenden Zellen werden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellen, die auf der Kulturschale angewachsen sind, werden ebenfalls gezählt (0 h) bzw. mit PBS gewaschen und für weitere 3 h/6 h/24 h in normalem Wachstumsmedium weiter inkubiert. Zu jedem Zeitpunkt wird sowohl die Zahl abgelöster als auch angewachsener Zellen bestimmt. Letztere werden vor dem Zählen mit Trypsin-EDTA von der Schale abgetrennt.

Tab. 12 Reagenzien

PBS	135 mM NaCl, 9 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 2,7 mM KCl
Trypsin-EDTA-Lösung	Trypsin 0,5% EDTA 1:3 in PBS

9.4.3 Colony Formation Assay

Mit dem Colony Formation Assay wird das Koloniebildungsvermögen der CACO-2-Zellen untersucht. Dazu dient die von Zhu et al. [161] beschriebene Methode, die hier wie folgt modifiziert wird:

In eine 60-mm-Kulturschale werden 5×10^5 CACO-2-Zellen in 5 ml Medium ausplattiert und über einen Zeitraum von vierundzwanzig Stunden inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Anschließend erfolgt eine Behandlung mit 5 ml zytostatikahaltigem Medium. Nach Beendigung der Inkubationszeit werden die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung von der Platte abgelöst und gezählt. Jeweils 200 Zellen werden in 3 ml normalem Wachstumsmedium (6-well-Platte) ausplattiert und für zwei Wochen inkubiert. Nach einer Woche wird das verbrauchte Medium gegen frisches ersetzt.

Um die entstandenen Kolonien nach Ablauf der Inkubationszeit sichtbar zu machen, wird eine Giemsa-Färbung vorgenommen. Hierzu wird zunächst das Medium abgesaugt. Dann werden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und 20 min in 1 ml Methanol fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgt die Zugabe von 1 ml Giemsa-Lösung. Die Lösung wird nach 20 min abgesaugt. Durch Waschen mit Wasser und kurzes Nachspülen mit Ethanol 70 % werden Giemsa-Reste entfernt, die bei der Auswertung stören. Gezählt werden die mit bloßem Auge sichtbaren Kolonien.

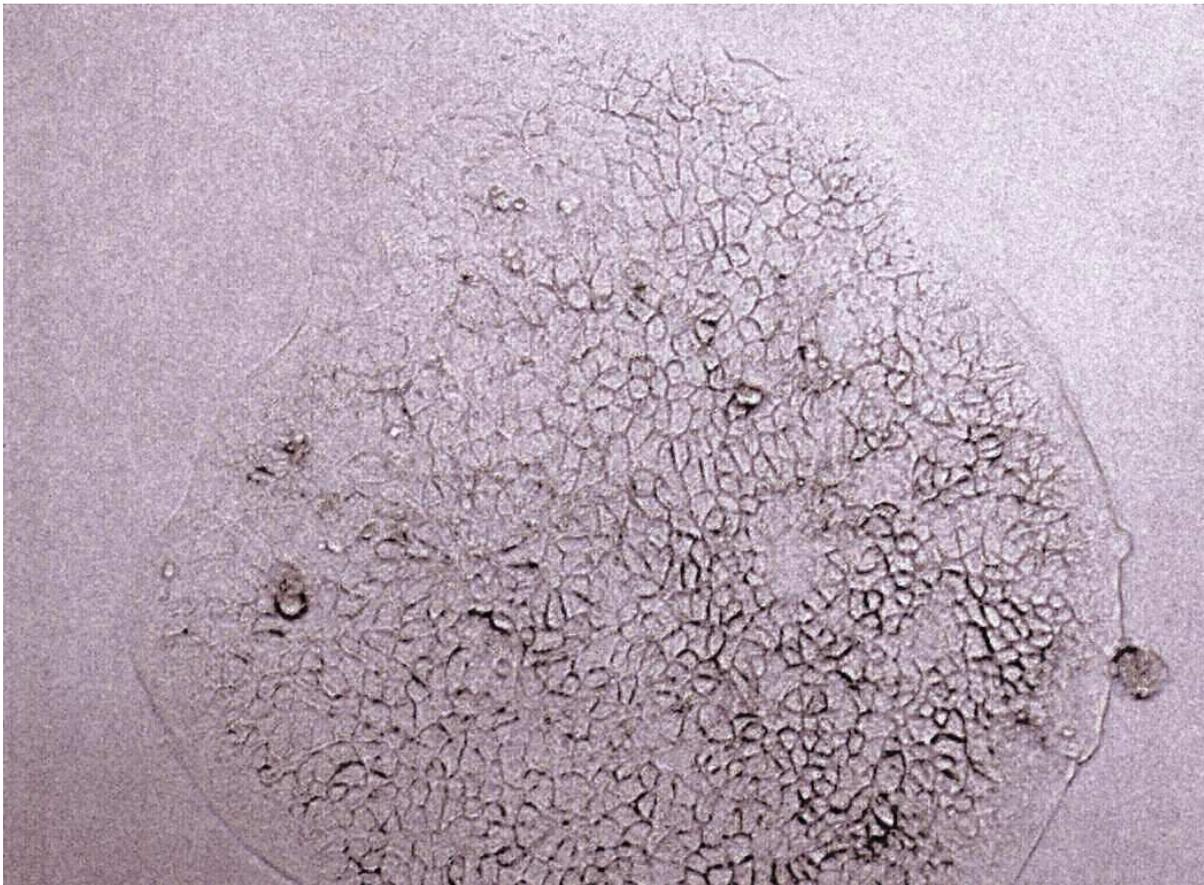


Abb. 51 Bild einer ungefärbten Kolonie

Tab. 13 Reagenzien Colony Formation Assay

Giemsa-Lösung	10 % Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung in Aqua dest.
PBS	135 mM NaCl, 9 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 2,7 mM KCl
Trypsin-EDTA-Lösung	Trypsin 0,5% EDTA 1:3 in PBS

9.5 Proteinanalytik

9.5.1 Isolierung der Proteine

5,5-6,5 x 10⁵ CACO-2-Zellen werden für 5 - 6 Tage in einer 100-mm-Kulturschale inkubiert. Anschließend erfolgt die Behandlung mit Doxorubicin bzw. Etoposid. 1-3 x 10⁶ THP-1-Zellen werden direkt in 10 ml zytostatikahaltigem Medium resuspendiert und in einer 100-mm-Kulturschale ausplattiert. Für die Beobachtung der Proteinexpression bis zu 24 h nach Zytostatikaexposition werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit normalem Wachstumsmedium inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten aufgearbeitet.

Um die Zellen zu ernten, werden die THP-1-Zellen abzentrifugiert und einmal mit 1 ml kaltem PBS gewaschen. Die CACO-2-Zellen werden mit einem Gummischaber von der Kulturschale abgelöst und ebenfalls mit 1 ml PBS gewaschen. An dieser Stelle kann das Zellpellet eingefroren oder unmittelbar zur Isolierung verwendet werden.

Das Zellpellet wird größenabhängig in 80-240 µl PAGE-Puffer resuspendiert, der mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren versetzt ist. Nach Zugabe von Lämmli III-Puffer (ein Viertel des PAGE-Puffer-Volumens) wird die Suspension gründlich gevortext und für 15 min auf Eis gelagert. Die Zellen werden dann unter Eiskühlung mittels Ultraschall lysiert, da diese Methode gewährleistet, dass auch Proteine, die an die DNA oder an Membranen gebunden sind, erfasst werden. Hierzu werden die Proben je fünfmal für eine Sekunde bei voller Leistung beschallt. Anschließend werden sie zur Denaturierung für 5 min auf 95 °C erhitzt und wieder auf Eis gestellt. Um das Gesamtprotein von Zellresten zu befreien, wird 10 min lang bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tab. 14 Reagenzien

Lämmli III-Puffer	30 % Glycerin, 5 % β -Mercaptoethanol, 4 % SDS, 140 mM Tris-HCl (pH 7,0), 1 mM Na ₂ EDTA (pH 7,4), 0,025 % Bromphenolblau
PAGE-Puffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren	10 % Glycerin, 5 % β -Mercaptoethanol, 1 % SDS, 62 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,5 mM Na ₂ EDTA (pH 7,2), 0,015 % Bromphenolblau, 10 μ g/ml Aprotinin, 10 μ g/ml Leupeptin, 40 mM β -Glycerolphosphat, 10 mM Benzamidin, 10 mM Na-Pyrophosphat, 1 mM PMSF, 10 μ l/ml Phosphatase Inhibitor Cocktail B (santa cruz biotechnology, inc., sc-45045); 20 μ l/ml Phosphatase Inhibitor Cocktail C (Santa cruz biotechnology, inc.sc-45065)
PBS	135 mM NaCl, 9 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 2,7 mM KCl

9.5.2 Bestimmung des Proteingehalts in der Probe

Die Proteinkonzentration in der Probe wird photometrisch bestimmt. Hierzu werden 500 μ l Bradford-Reagenz mit 500 μ l destilliertem Wasser verdünnt. Dieser Mischung wird je 1 μ l Proteinlösung zugesetzt. Das im Bradford-Reagenz enthaltene Brilliantblau G hat ein Absorptionsmaximum bei 465 nm. Durch Bildung eines blauen Komplexes mit Protein wird dieses auf 595 nm verschoben [162]. Da die gemessene Absorption innerhalb eines Konzentrationsbereichs von ca. 1 – 10 μ g/ml proportional zur Proteinmenge ist [162, 163], kann mittels einer Kalibrierkurve auf die in der Probe enthaltene Gesamtproteinkonzentration geschlossen werden. Für die Kalibrierung werden BSA-Lösungen von 0/0,625/1,25/2,5/5 und 10 μ g/ml verwendet, mit denen wie mit den Probelösungen verfahren wird.

Tab. 15 Reagenzien

Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich
------------------	---------------

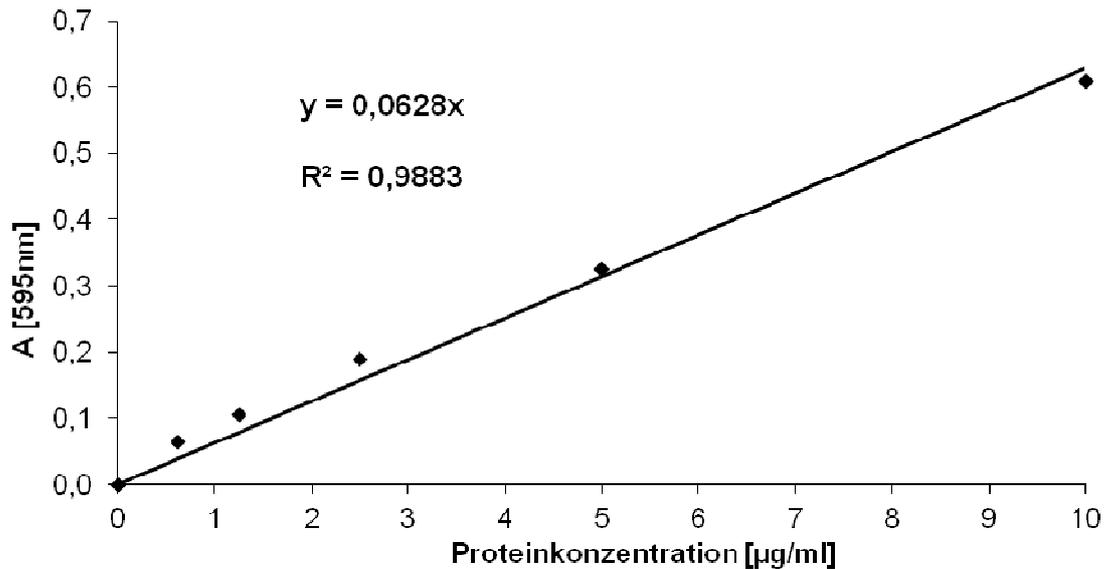


Abb. 52 Kalibriergerade, erstellt durch photometrische Messung der Absorption verschiedener BSA-Konzentrationen.

9.5.3 Western Blot

Zur Bestimmung ausgewählter Proteine wird wie folgt vorgegangen:

- Auftrennung des Proteingemischs nach Proteingröße mittels Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen
- Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran („blotten“)
- Entwicklung der Membran mit Primär- und Sekundärantikörpern
- Erzeugung und Detektion eines Chemilumineszenzsignals zur qualitativen und semiquantitativen Auswertung

9.5.3.1 Elektrophorese

Die Lysate werden mit PAGE-Puffer gemischt, um einen definierten Proteingehalt einzustellen. Anschließend werden die Proteine durch starkes Erhitzen denaturiert (95 °C, 5 min). Für die Elektrophorese werden zwei unterschiedliche Gele verwendet. Für die Analyse von Ku70, Ku86 und Rad51 wird ein 10 %-iges Polyacrylamid-Gel hergestellt. Die Proteine ATM, CHK1, DNA-PKcs, Rad54 und Topoisomeras II α werden auf einem Tris-Acetat-Gradientengel der Firma life technologies aufgetrennt (NuPAGE® Novex 3-8%). Weitere Angaben sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tab. 16 Angaben zur Elektrophorese

Zelllinie	Gel	Proteinmenge/verwendetes Volumen	Bedingung Elektrophorese
CACO-2	Polyacrylamid 10 %	20 µg/20 µl	200 V, 80 min
CACO-2	Tris-Acetat 3-8 %	10 µg/10 µl	150 V, 80-90 min
THP-1	Polyacrylamid 10 %	30 µg/20 µl	200 V, 80 min
THP-1	Tris-Acetat 3-8 %	15 µg/10 µl	150 V, 80-90 min

Tab. 17 Reagenzien Elektrophorese

Elektrophorese-Puffer	190 mM Glycin, 25 mM Tris-OH, 0,1 % SDS
NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Buffer	NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Buffer (20X) 1:20 mit Aqua dest.
PAGE-Puffer	10 % Glycerin, 5 % β-Mercaptoethanol, 1 % SDS, 62 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,5 mM Na ₂ EDTA (pH 7,2), 0,015 % Bromphenolblau
Polyacrylamidgel 10 %	Sammelgel: 5 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, 125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1 % SDS, 0,1 % Ammoniumpersulfat, 0,1 % TEMED Trenngel: 10 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, 375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1 % SDS, 0,09 % Ammoniumpersulfat, 0,06 % TEMED

9.5.3.2 Blotten

Die Proteingele werden nach der Elektrophorese 3 x 5 min in Blot-Puffer geschüttelt, um Reste von SDS zu entfernen. Die PVDF-Membran (Immobilon-P™, Fa. Millipore, Deutschland), auf welche die Proteine übertragen werden, muss zunächst hydrophilisiert werden und wird zu diesem Zweck in Methanol eingeweicht. Auch die Membran wird anschließend in Blot-Puffer gewaschen. Gel und Membran werden dann in eine Blotting-Apparatur eingespannt. Zur Übertragung der Proteine von einem 10 %-igen

Polyacrylamidgel auf die Membran wird eine Stromstärke von 150 mA für 60 min eingestellt. Für den Transfer der Proteine von dem Gradientengel auf die Membran werden 90 min benötigt.

Nach dem Blotten wird die Membran 3 x 5 min in TBS geschüttelt. Zur Festigung der Proteinbindung wird die Membran getrocknet.

Tab. 18 Reagenzien Blotten

Blotpuffer	190 mM Glycin, 25 mM Tris-OH, 15 % Methanol
TBS	200 mM NaCl, 50 mM Tris-OH, pH 7,4

9.5.3.3 Coomassie-Färbung

Zur Beurteilung, ob in jede Tasche des Gels gleiche Mengen an Protein aufgetragen wurden, wird eine Coomassie-Färbung durchgeführt.

Das Gel wird 3 x 5 min mit Aqua dest. gewaschen und dann über Nacht bei 4 °C in Coomassie-Lösung gelegt. Zum Entfärben des Hintergrunds wird das Gel in 10 %-iger Essigsäure 1-3 h geschüttelt. Nach kurzem Abspülen mit Aqua dest. wird ein Foto mit der Geldokumentationskammer aufgenommen.

Tab. 19 Reagenzien Coomassie-Färbung

Färbelösung	25 % Isopropanol, 19 % Essigsäure, 0,05 % Coomassie-Farbstoff R250
Entfärbelösung	10 % Essigsäure

9.5.3.4 Entwicklung der Membranen

Die nach dem Blotten getrocknete PVDF-Membran wird so geschnitten, dass alle ausgewählten Proteine detektiert werden können. Dabei wird sich an den Banden eines Größenmarkers (High Range Molecular Weight Marker; GE Healthcare) orientiert. Für die weiteren Schritte muss die Membran erneut mit Methanol hydrophilisiert werden. Anschließend erfolgt Waschen mit TBS (3 x 5 min) und TBS-Tween (1 x 10 min). Um die unbesetzten Bindungsstellen der Membran mit Protein abzusättigen, wird diese für 1 h (RT) bei Raumtemperatur (RT) in milchpulverhaltiger Blocking-Lösung geschüttelt. Nach diesem Schritt wird die Membran für mindestens 1 h (RT) mit dem für das interessierende Protein spezifischen Primärantikörper (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) inkubiert. Kurzes Waschen (2 x kurz Aqua dest., 4 x TBS-Tween) entfernt Reste der Primärantikörper-Lösung vor der einstündigen Inkubation mit dem Zweitantikörper (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Dieser

bindet an den Primärantikörper. Auch überschüssige Sekundärantikörper-Lösung wird durch Waschen (2 x kurz Aqua dest., 4 x TBS-Tween) entfernt. Der Zweitantikörper ist an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt. Diese setzt das zur Detektion verwendete Reagenz (ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit, GE Healthcare) um. Hierbei entsteht ein konzentrationsabhängiges Chemilumineszenzsignal, das im Dunkeln mit der Gelkamera aufgenommen und zur Auswertung herangezogen wird.

Tab. 20 Primärantikörper, Sekundärantikörper und deren Verdünnungen

Protein	Primärantikörper	Sekundärantikörper
ATM	Anti-ATM-IgG 1:200	Anti-Maus-IgG 1 : 10000
CHK1	Anti-CHK1-IgG 1:200	Anti-Kaninchen-IgG 1 : 10000
DNA-PKcs	Anti-DNA-PKcs-IgG 1:200	Anti-Kaninchen-IgG 1 : 10000
Ku70	Anti-Ku70-IgG 1:4000	Anti-Maus-IgG 1 : 10000
Ku86	Anti-Ku86-IgG 1:300	Anti-Maus-IgG 1 : 10000
Rad51	Anti-Rad51-IgG 1:400	Anti-Kaninchen-IgG 1 : 10000
Rad54	Anti-Rad54-IgG 1:100	Anti-Ziege-IgG 1 : 10000
Topo II α	Anti-Topoisomerase II α -IgG 1:100	Anti-Ziege-IgG 1 : 10000

Tab. 21 Reagenzien

TBS	200 mM NaCl, 50 mM Tris-OH, pH 7,4
TBS-Tween	0,1 % Tween 20™ in TBS
Blocking-Lösung	5 % Milchpulver, 0,02 % Natriumazid in TBS-Tween
Primärantikörper-Lösung	5 % Milchpulver, 0,02 % Natriumazid in TBS-Tween, Primärantikörper in entsprechender Verdünnung
Sekundärantikörper-Lösung	5 % Milchpulver in TBS-Tween, Sekundärantikörper 1:10000 verdünnt

9.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie an einem FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) ermöglicht die Analyse einer großen Zellmenge in kurzer Zeit. Hierbei können gleichzeitig mehrerer Parameter untersucht werden.

Die in suspendierter Form vorliegenden Zellen passieren einzeln einen Laserstrahl und erzeugen dabei Streulicht, das von dem Zytometer detektiert werden kann. Vorwärtsgerichtetes Streulicht (Forward Scatter, FSC) gibt dabei Aufschluss über die Zellgröße. Das im 90°-Winkel gestreute Licht (Side Scatter, SSC) liefert Informationen zur äußeren Gestalt der Zelle. Außerdem detektiert das Gerät von der Probe emittiertes Fluoreszenzlicht. Färbt man die Zellen mit Fluorochromen, die an interessierende Zellbestandteile binden, so kann man mit dieser Methode wichtige Informationen gewinnen.

9.6.1 Zelltodanalytik mit Propidiumiodid- und Annexin V-FITC-Färbung

Zur Unterscheidung apoptotischer und nekrotischer Zellen wird eine Markierung mit Propidiumiodid und Annexin V-FITC vorgenommen. Beim Eintritt in die Apoptose verändert sich die Zelloberfläche. Das Phospholipid Phosphatidylserin befindet sich bei gesunden Zellen vor allem auf der Membraninnenseite. Treten Zellen in die Apoptose ein, so translozieren sie Phosphatidylserin von innen nach außen. Dies dient der Erkennung durch Makrophagen. Annexin V ist ein Ca^{2+} -abhängiges Protein, das an negativ geladene Phospholipide bindet. Es zeigt eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin und kann als empfindliche Sonde verwendet werden. Da Phosphatidylserin während der Nekrose ebenfalls für Annexin-V zugänglich wird, wird eine zusätzliche Färbung mit Propidiumiodid, das in die DNA interkaliert, vorgenommen. Propidiumiodid kann nur bei Verlust der Membranintegrität in die Zelle gelangen und ist daher ein Marker für nekrotische Zellen [164, 165]. 7×10^5 CACO-2-Zellen werden 24 h vor ihrer Behandlung mit Etoposid in normalem Wachstumsmedium (5 ml, 60-mm-Kulturplatte) ausplattiert. 8×10^5 THP-1-Zellen werden aus ihrer Kulturflasche entnommen und mit Etoposid inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wird das zytostatikahaltige Medium gegen normales Wachstumsmedium ersetzt. Die Analyse erfolgt 0 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Mediumswechsel. CACO-2-Zellen werden mit Trypsin von der Kulturschale abgelöst, mit Medium versetzt und zentrifugiert (5 min, 1500 rpm) und 1 x mit 1 ml kaltem PBS gewaschen. THP-1-Zellen werden bei 1800 rpm zentrifugiert und ebenfalls mit 1 ml kaltem PBS gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren (5 min, 2000 rpm) werden die Zellen mit 100 μl Markierungspuffer versetzt. Dieser enthält Annexin V-FITC und Propidiumiodid. Da Annexin-V selbst nicht detektierbar ist, ist es an Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min (Raumtemperatur), werden die Proben mit 400 μl Inkubationspuffer versetzt und vermessen

(20000 Zellen/Messung). Um zu verhindern, dass das Signal des jeweiligen Markers in dem Kanal des anderen zu sehen ist, wird vor der eigentlichen Messung kompensiert. Dafür werden nur mit Annexin V-FITC beziehungsweise nur mit Propidiumiodid gefärbte Zellen vermessen und das Signal so korrigiert, dass es nicht mehr in dem Kanal zu sehen ist, in dem der andere Farbstoff detektiert wird. Mit Doxorubicin behandelte Zellen können wegen dessen starken Eigenfluoreszenz, nicht mit dieser Methode analysiert werden.

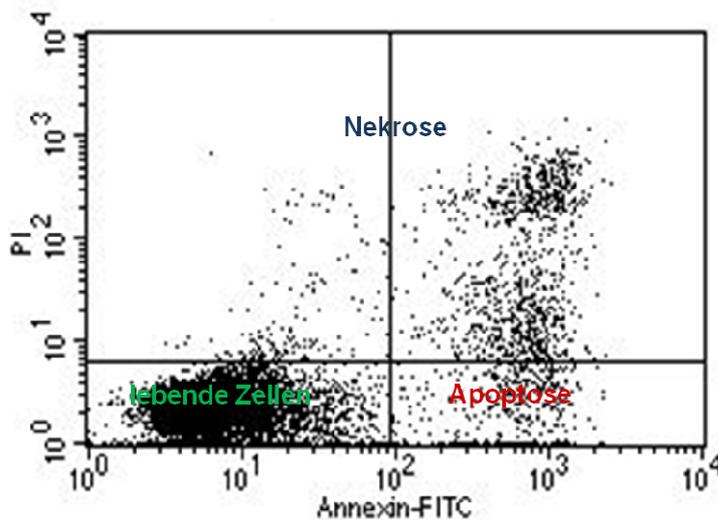


Abb. 53 Zelltodanalytik: Färbung mit Annexin-V-FITC und PI

9.6.2 Zellzyklusanalytik

Die Analyse des Zellzyklus basiert auf der Messung des DNA-Gehalts einzelner Zellen, der sich in den verschiedenen Zellzyklusphasen unterscheidet. In der G1-Phase liegt ein einfacher DNA-Gehalt vor. In der S-Phase, in der die DNA repliziert wird, liegt der DNA-Gehalt zwischen einem einfachen und einem doppelten Satz. Zellen mit doppelter DNA-Menge befinden sich in der G2/M-Phase. Zellen, deren DNA durch Apoptose bereits fragmentiert wurde, sind im sub-G1-Peak zu sehen. Um die DNA detektierbar zu machen, wird sie mit dem interkalierenden Farbstoff Propidiumiodid angefärbt. Da dieser auch an RNA bindet, erfolgt eine Behandlung mit RNase.

0,8 – 1 x 10⁶ CACO-2-Zellen werden in 60-mm-Kulturflaschen ausplattiert und 24 h später mit Etoposid bzw. Doxorubicin behandelt. 0,9 - 1,4 x 10⁶ THP-1-Zellen werden aus einer Kulturflaschen abzentrifugiert und direkt in zytostatikahaltigem Medium inkubiert. Nach Beendigung der Zytostatikainkubation wird das Medium gegen normales Wachstumsmedium ersetzt. Die Analyse erfolgt 0 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Mediumswechsel. Das Medium der THP-1-Zellen wird durch Zentrifugation (5 min, 2000 rpm) entfernt. Die CACO-2-Zellen müssen zunächst mit Trypsin von der Kulturschale abgelöst werden. Die Trypsinierung wird mit serumhaltigem Medium beendet, das anschließend abzentrifugiert

wird (5 min, 2000 rpm). Das Zellpellet wird in 1 ml kaltem PBS gewaschen und gut gevortext, damit sich Zellaggregate auflösen können. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, 2000 rpm) werden die Zellen in 100 µl kaltem PBS resuspendiert, mit 900 µl Ethanol 70 % versetzt und darin fixiert. Dadurch wird die Zellmembran für Propidiumiodid durchlässig. Dieser Schritt kann wahlweise über Nacht bei 4 °C oder für 1 h auf Eis erfolgen. Der Überstand wird danach abgenommen und das Pellet erneut in 1 ml PBS resuspendiert. Je nach Größe des Zellpellets wird jetzt für 5 min mit 500-700 µl PC-Puffer versetzt, welcher die Aufgabe hat, supdiploide Zellen und Zellen der G1-Phase besser voneinander zu trennen. Der Puffer wird durch Zentrifugieren entfernt. Dann erfolgt die Zugabe von 300 µl PBS/RNase A/PI-Puffer. Die Inkubation kann entweder über Nacht bei 4 °C oder für 30 min bei Raumtemperatur erfolgen. Die Proben werden dann am Durchflusszytometer vermessen (20000 Zellen/Messung).

Tab. 22 Reagenzien Zellzyklusanalytik

PBS	135 mM NaCl, 9 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 2,7 mM KCl
PBS/RNase A/PI-Puffer	250 µg/ml RNase A und 10 µg/ml PI in PBS
PC-Puffer	192 mM Na ₂ HPO ₄ , 4 mM Zitronensäure, pH 7,8

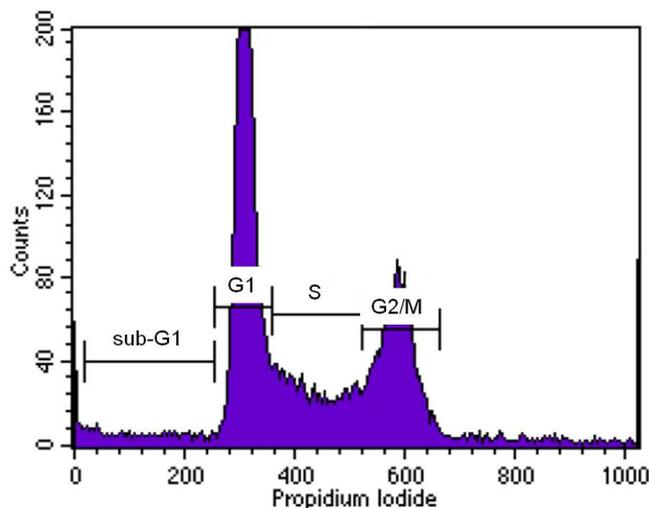


Abb. 54 FACS. Zellzyklusphasen nach Propidiumiodid-Färbung.

9.7 Multiplex-Genexpression

Um die Expression von Genen, die an der Schadensantwort beteiligte Proteine exprimieren, zu analysieren, wird zunächst die RNA aus behandelten Zellen isoliert (RN@easy Plus Mini Kit, Qiagen). Die RNA wird photometrisch quantifiziert und einer Qualitätskontrolle unterzogen. Anschließend wird die ausgewählte RNA in cDNA umgeschrieben. Durch PCR wird die erzeugte cDNA amplifiziert und dabei fluoreszenzmarkiert (RT und PCR: GenomeLab™ GeXP Start Kit, Beckman Coulter).

Die Detektion der PCR-Produkte erfolgt mit dem GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System (Beckman Coulter), das diese elektrophoretisch auftrennt.

9.7.1 Isolierung der RNA

Die CACO-2-Zellen werden in einer 100-mm-Kulturschale ausplattiert und nach vier Tagen Anwachszeit zytostatisch behandelt. Die THP-1-Zellen werden gezählt und direkt mit zytostatikahaltigem Medium inkubiert. Um die RNA in den Zellen zu schützen, werden die frisch geernteten Zellpellets sofort mit 300-340 µl RNAprotect®Cell Reagent (Qiagen) versetzt und eingefroren (-20 °C).

Für die Isolierung der RNA werden die Zellpellets aufgetaut. Das RNAprotect®Cell Reagent wird abzentrifugiert. Die Proben werden je nach Zellzahl mit 350 µl ($\leq 5 \times 10^6$ Zellen) oder 600 µl ($5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ Zellen) Buffer RLT Plus (Qiagen) und 10 µl/ml β -Mercaptoethanol versetzt und für mindestens eine 1 min gründlich gevortext. Dieser Schritt dient der Lyse von Membranen und somit der Freisetzung der gesamten RNA. Anschließend wird das Lysat zur Homogenisierung auf eine QIAshredder-Säule gegeben, die in einem 2 ml-Sammelröhrchen sitzt. Durch Zentrifugation (2 min, volle Geschwindigkeit) passiert es die Säule und wird dabei homogenisiert. Um genomische DNA zu entfernen, wird das homogenisierte Lysat auf eine gDNA Eliminator-Säule pipettiert und vollständig in ein 2 ml-Sammelröhrchen zentrifugiert (30 s, 10000 rpm). Zu dem Filtrat wird ein gleich großes Volumen Ethanol 70 % hinzugeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Dadurch werden für die Bindung der RNA an die Silicagel-Membran der nachfolgend verwendeten RNeasy-Säule optimale Bedingungen eingestellt. Die gesamte Probe wird dann in 700 µl-Portionen auf eine RNeasy-Säule gegeben, und in ein weiteres 2 ml-Auffangröhrchen zentrifugiert. Die extrahierte RNA wird hierbei von der Säule gebunden. Das Filtrat wird verworfen. Die Säule wird mit 700 µl Buffer RW1 gewaschen und zentrifugiert (15 s, 10000 rpm), um Biomoleküle (z. B. Proteine, Fettsäuren, Kohlenhydrate), die unspezifisch an die Säule binden, zu entfernen. Anschließend wird zweimal mit 500 µl Buffer RPE gewaschen und zentrifugiert (1 x 15 s, 1 x 2 min, 10000 rpm), um Salzreste vorher verwendeter Puffer zu beseitigen. Durch die lange Zentrifugationszeit nach dem zweiten Waschen wird zudem später

störendes Ethanol eliminiert. Die nun gereinigte RNA, die sich weiterhin auf der RNeasy-Säule befindet, wird mit 30-50 µl RNase-freiem Wasser eluiert (1 min, 10000rpm) [166]. Die Proben werden bei -20 °C gelagert.

Während des gesamten Arbeitsablaufs muss eine Kontamination mit RNasen verhindert werden. Aus diesem Grund werden RNase-freie Pipettenspitzen, Gefäße und Reagenzien benutzt. Die Arbeitsfläche und verwendete Pipetten werden mit RNase AWAY® gereinigt.

9.7.2 Quantitative und qualitative Bewertung der RNA

Am NanoDrop®-Photometer wird die Konzentration der RNA in der Probe bestimmt. Hierzu wird die Absorption der RNA-Lösung bei 260 nm detektiert. Die Reinheit der RNA wird mittels der Quotienten A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230} beurteilt. A_{260}/A_{280} sollte bei ca. 2 liegen. A_{260}/A_{230} liegt in der Regel zwischen 1,8 und 2,2. Eine untere Grenze bis 1,6 wird hier noch toleriert. Deutlich geringere Werte können auf Kontaminationen hindeuten, die im Bereich von 280 nm (z. B. Proteine) bzw. 230 nm absorbieren. Um die Integrität der RNA festzustellen, wird ein Volumen der Probelösung, das ca. 1 µg RNA entspricht, mit dem gleichem Volumen ethidiumbromidhaltigem (60 µg/ml) 2 x RNA-Loading-Puffer (2 x Loading Dye Solution, Fermentas) gemischt, für 10 min bei 70 °C inkubiert und auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophoresekammer, die Kämme und der Gelträger werden mit 0,5 %igem SDS und mit Milipore-Wasser gespült. Bei der Elektrophorese werden die 28S rRNA und die 18S rRNA aufgetrennt. Das Verhältnis der Intensität dieser Banden sollte 2-1 zu 1 betragen. Wichtig für die Qualität der Probe ist außerdem, dass die Banden scharf zu sehen sind. Andernfalls ist es wahrscheinlich, dass RNA abgebaut wurde.

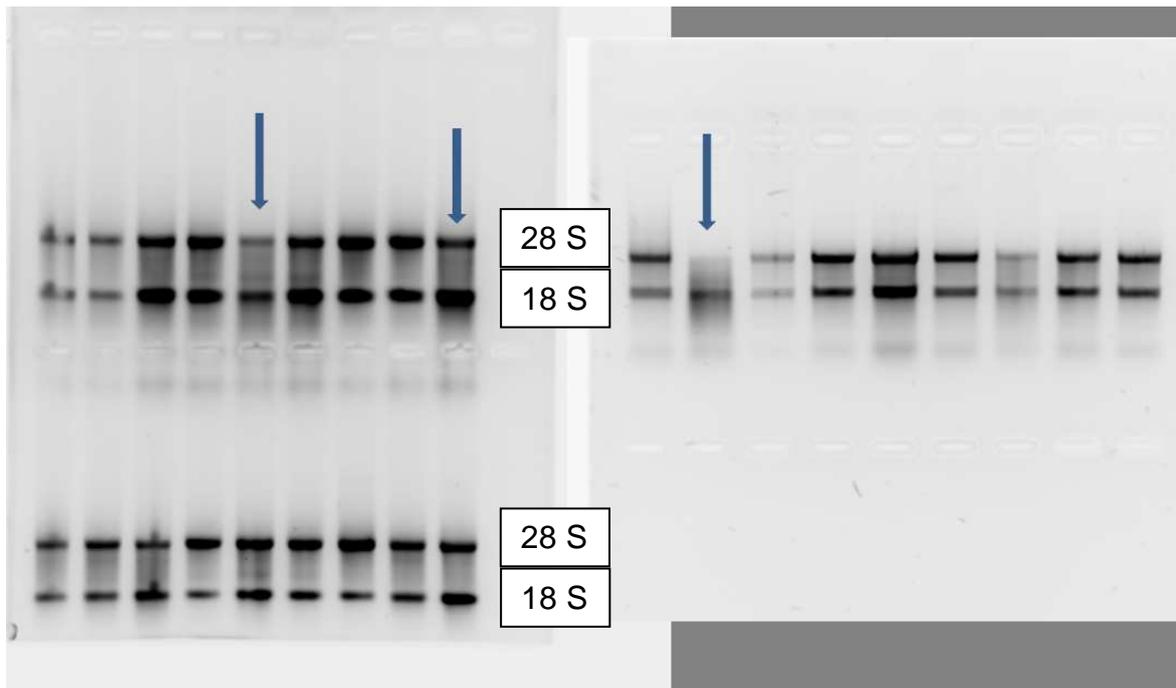


Abb. 55 Agarosegel zur RNA-Qualitätskontrolle. Die blauen Pfeile zeigen RNA schlechter Qualität, die für weitere Versuche nicht verwendet wurde.

9.7.3 Reverse Transkription

Um die RNA in cDNA umzuschreiben, werden reverse Primer verwendet, die neben einer genspezifischen Sequenz auch eine flankierende universale Sequenz enthalten, die der resultierenden cDNA angefügt wird [167, 168]. Die Primer werden zunächst in einer Konzentration von 500 nM verwendet. Um die Peakhöhen der später detektierten Signale anzupassen und in einen Bereich von mindestens 1000 und maximal 100000 counts zu bringen, werden einzelne Reverse Primer in höheren Verdünnungen eingesetzt:

Primermischung 1	Nibrin /HMGB1 31,25 nM, RPA/Topo2A/CHK2/GAPDH 62,6 nM
Primermischung 2	HPRT 16,67 nM, PARP/Rad50 12,5 nM, GAPDH 5 nM

Die der cDNA-Synthese dienenden dNTPs sind im RT Buffer enthalten. Es wird ein die Probe enthaltender Reaktionsmix (RT-Plus) hergestellt. Außerdem werden ein Ansatz ohne Probe (NTC = no template control) und einer ohne Reverse Transkriptase (RT-Minus) als Kontrollen benötigt. Die NTC sollte in der später durchgeführten Analyse nur den Peak der als Positivkontrolle verwendeten Kanamycin-RNA (325 bp) zeigen. Da der RT-Minus-Kontrolle das die Reaktion katalysierende Enzym fehlt, darf hier kein Peak zu sehen sein.

Tab. 23 Reverse Transkription - Volumina je Probe

Reagenz	RT-Plus	RT-Minus	NTC
DNase/RNase-freies Wasser	3 µl	4 µl	8 µl
RT Buffer 5 x (enthält dNTPs)	4 µl	4 µl	4 µl
RT Reverse Primer Plex	2 µl	2 µl	2 µl
Reverse Transkriptase	1 µl	0 µl	1 µl
Kan ^r RNA 1:5 verdünnt mit 10 mM Tris-HCl	5 µl	5 µl	5 µl
RNA (CACO-2 und THP-1: 10 ng/µl, HT-29: 15 ng/µl; für Primermischung 2 immer 20 ng/µl)	5 µl	5 µl	0 µl

Die Reverse Transkriptase wird ganz am Schluss dazu pipettiert, um die Enzymaktivität zu erhalten. Die Ansätze werden noch kurz an zentrifugiert, damit Reste der Mischung von der Wand des verwendeten Reaktionsgefäßes runter laufen. Inkubiert wird in einem Thermocycler nach dem folgenden Programm:

Tab. 24 Reverse Transkription - Inkubationsbedingungen

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	48	1
2	42	60
3	95	5
4	4	halten

Die Proben werden entweder eingefroren (-20 °C) oder sofort für die PCR verwendet.

9.7.4 PCR

Der Ansatz für die Multiplex-PCR enthält die mit der universalen „Tag“ versehene cDNA. Es werden zwei verschiedene Primer-Arten eingesetzt - chimäre Primer, die eine genspezifische Sequenz mit einem universalen „Tag“ an ihrem 5'-Ende enthalten (200 nM) und universale Forward Primer mit der gleichen Sequenz wie der „Tag“ der chimären Primer, die im PCR Buffer enthalten sind. Die universalen Forward Primer sind fluoreszenzmarkiert, sodass die PCR-Produkte später detektiert werden können. Für die Synthese der DNA benötigte dNTPs sind im PCR Buffer enthalten.

Tab. 25 PCR - Volumina je Probe

Reagenz	RT-Plus
PCR Buffer 5 x	4 µl
25 mM MgCl ₂ (Thermo Scientific)	4 µl
Custom PCR Fwd Primer Plex	2 µl
Thermo-Start™ DNA Polymerase (Thermo Scientific)	0,7 µl
cDNA-Proben	9,3 µl

Der Reaktionsansatz wird gemischt, an zentrifugiert und in einem Thermocycler folgenden Bedingungen ausgesetzt:

Tab. 26 PCR – Programm des Thermozyklers

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	95	10
2	94	0,5
3	55	0,5
4	70	1
5	N/A	Schritt 2-4 34 x wiederholen
6	4	halten

In den ersten beiden Zyklen wird mit den chimären Primern doppelsträngige DNA erzeugt, die an beiden Enden mit dem universalen Tag versehen sind. Danach übernehmen die im starken Überschuss vorhandenen universalen Forward Primer die Reaktion [9, 10].

9.7.5 Primerlisten

Die Primer wurden von der Firma Beckman Coulter designed und dort bezogen. Im folgenden sind die Sequenzen der für die Reverse Transkription und die PCR verwendeten Primer aufgeführt.

Tab. 27 Primerliste Forward Primer

Gen	Sequenz des Forward Primers
Universal FW	GTACGACTCACTATAGGGA
Rad50	GTACGACTCACTATAGGGATGACAAACGGGGCAACATGACTGG
PARP1	GTACGACTCACTATAGGGACTAGCTGTGGCTTCTCCGGG
Rad51	GTACGACTCACTATAGGGAGCAGCAAACATCGCTGCTCCA
Nibrin	GTACGACTCACTATAGGGAAGTGTTCACTGGGGCGCTTGG
RPA	GTACGACTCACTATAGGGATCCCTTCCCCTCGGGAGTTGC
HMGB1	GTACGACTCACTATAGGGATGCTCCTCCCGACAAGTTTGCAC
Top2A	GTACGACTCACTATAGGGAACCATTCAAGGCTCAACACGCTGG
CHK2	GTACGACTCACTATAGGGAGGACCCACTTCCCTGAAAATCCG
CHK1	GTACGACTCACTATAGGGAGGACATGTGGGCTGGGAAAAGC
Rad54	GTACGACTCACTATAGGGAAGACTCACAGCAGCAATCCCACA
Ku86	GTACGACTCACTATAGGGATGGGCTCCCCCTTGCTCAGT
BRCA2	GTACGACTCACTATAGGGACCTGGAGTGTCACACAGAGCCC
DNA-PKcs	GTACGACTCACTATAGGGACTGGCGAAGTGGGAGCGGAG
HPRT	GTACGACTCACTATAGGGAAGTCTGCATTGTTTTGCCAGTGTC
Ku70	GTACGACTCACTATAGGGAGCACAGTGAAGTTGCCAGCG
GAPDH	GTACGACTCACTATAGGGAACGGCAGGTCAGGTCCACCA
MRE11	GTACGACTCACTATAGGGAAGGCTTCTCTGGCTGGTGAGAA
ATM	GTACGACTCACTATAGGGAACACAGACTCAAGGCTGCGCTTA

Tab. 28 Primerliste Reverse Primer

Gen	Sequenz des Reverse Primers
Universal FW	AGGTGACACTATAGAATA
Rad50	AGGTGACACTATAGAATACTGGCTGGAGCCACAGCAGTT
PARP1	AGGTGACACTATAGAATAACGTGCAAGGGGTGTATGGA
Rad51	AGGTGACACTATAGAATATGGCCAGGTTTCTGCCGATGC
Nibrin	AGGTGACACTATAGAATATGTGATCCTCAGGGCCATCCCA
RPA	AGGTGACACTATAGAATAACACAGTCCAAAGTGGTGCCC
HMGB1	AGGTGACACTATAGAATAGACGGGCACTGGGCGACTCT
Top2A	AGGTGACACTATAGAATAACCAGGCTACATGGTGGCAAGGA
CHK2	AGGTGACACTATAGAATAGAGCCTACCCCTGCCCCCTG
CHK1	AGGTGACACTATAGAATATGGTGTGTCAGAGTCTCCAGTG
Rad54	AGGTGACACTATAGAATAGCTGAGAGGGAGCGTGAGCG
Ku86	AGGTGACACTATAGAATACATCCCCGGGAGCCTCTAC
BRCA2	AGGTGACACTATAGAATAGGAGGCCAAGTTCCTCTGCG
DNA-PKcs	AGGTGACACTATAGAATATCCCAAGAGGAGAAGGCGGC
HPRT	AGGTGACACTATAGAATAGGAGGCCATCACATTGTAGCCC
Ku70	AGGTGACACTATAGAATACCTGGAGGCCTTGCCCTTGGA
GAPDH	AGGTGACACTATAGAATACACCAACTGCTTAGCACCCCT
MRE11	AGGTGACACTATAGAATATCACAACTGGAAGCTCAGTGGT
ATM	AGGTGACACTATAGAATATCAGGCCTTGCAGAATTTGGGAC

9.7.6 Vermessung der Proben am GenomeLab™ GeXP

Alle verwendeten Reagenzien werden zunächst auf Raumtemperatur equilibriert. Je 1 µl unverdünntes PCR-Produkt wird in eine Mischung aus 38,5 µl Loading Solution und 0,5 µl DNA-Size Standard-400 pipettiert (96-well-Probenplatte). Anschließend wird vorsichtig auf- und abpipettiert. Jedes Well wird dann mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, das die Probe während der Messung vor Verdunstung schützen soll. Eine weitere 96-Well Platte wird in den gleichen Wells wie die der Probenplatte mit 250 µl GenomeLab Separation Buffer befüllt. Das GenomeLabGeXP Analysis System wird mit beiden Platten beladen und die Kapillarelektrophorese gestartet. Sollten sich die Signale der Messung als zu stark herausstellen, so wird die Probe vorverdünnt (1:10 oder 1:20 in nucleasefreiem 1 M Tris-HCl pH 8.0).

Tab. 29 Reagenzien Genexpressionsanalyse

10 mM Tris-HCl, pH 8	UltraPure™ 1M Tris-HCl, pH 8.0 (life technologies) 1:10 verdünnt mit UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (life technologies)
----------------------	--

9.7.7 Auswertung der Genexpressionsanalyse

Die während der Kapillarelektrophorese detektierten Signale der Proben (blau) werden den entsprechenden Genen zugeordnet. Die Bezifferung der Lage der Peaks erfolgt mit Hilfe des DNA Size Standard-400, der in 20-er Schritten Signale liefert, die im Chromatogramm rot dargestellt werden (aus Gründen der Übersicht hier ausgeblendet).

Zur Auswertung wird die Peakfläche herangezogen. GAPDH und HPRT dienen als Referenzgene, auf die alle Werte eines Experiments zunächst bezogen werden. Anschließend werden die Ergebnisse der behandelten Zellen in Relation zu der Kontrolle (Kontrolle = 1) gesetzt, um zu sehen, ob eine Veränderung der Genexpression stattgefunden hat.

Tab. 30 Genexpressionanalyse - erwartete Lage der Signale im Chromatogramm

Gen	Größe	Größe plus universal tag
Rad50	80	117
PARP1	85	122
Rad51	109	146
Nibrin	114	151
RPA	121	158
HMGB1	128	165
Top2A	148	185
CHK2	197	234
CHK1	207	244
Rad54	213	250
Ku86	225	262
BRCA2	245	282
DNA-PKcs	257	294
HPRT	264	301
Ku70	269	306
GAPDH	286	323
MRE11	294	331
ATM	305	342

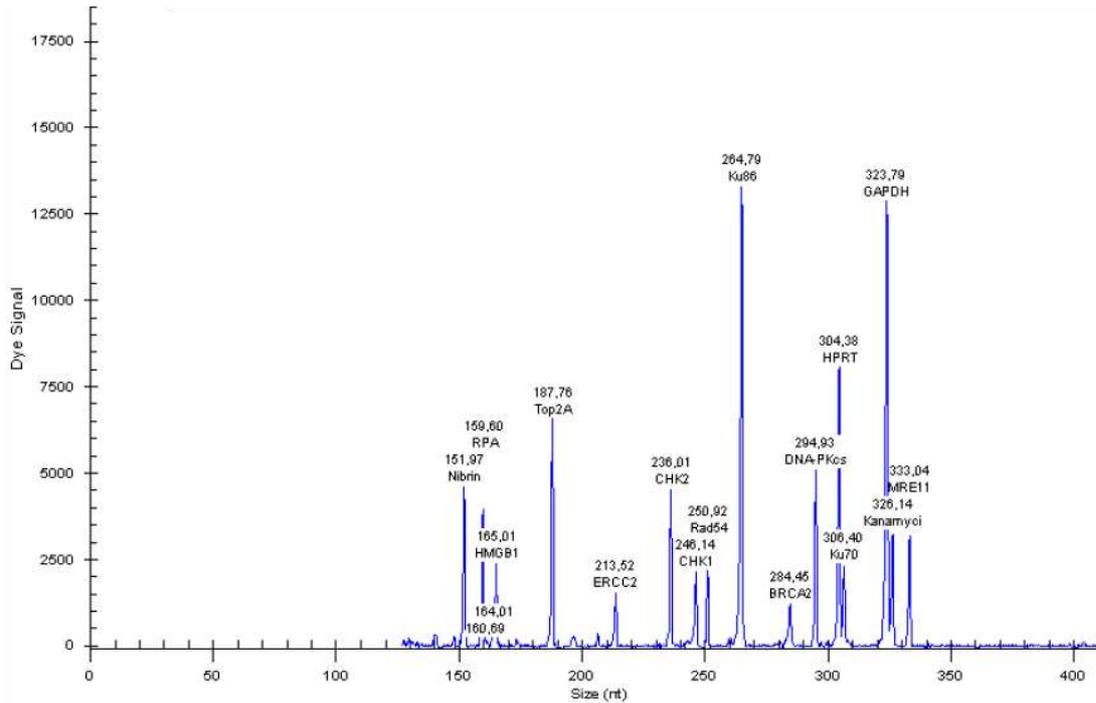


Abb. 56 Chromatogramm Genexpressionsanalyse

9.8 Pharmakologische Inhibitoren

Um ausgewählte Proteine in ihrer Aktivität zu hemmen werden pharmakologische Inhibitoren eingesetzt: ATM Kinase Inhibitor (sc-202964, santa cruz biotechnology, inc.), L189 (sc-295349, santa cruz biotechnology, inc.), DNA-PK Inhibitor II (=NU7026, sc-202143, santa cruz biotechnology, inc.), TCS 2312 dihydrochloride (sc-204326, santa cruz biotechnology, inc.).

Tab. 31 Pharmakologische Inhibitoren - Zielproteine

Inhibitor	Zielproteine
ATM Kinase Inhibitor	hemmt ATM selektiv [169]
L189	hemmt Ligase I, III und IV [87]
NU7026	kompetitiver und hoch selektiver Inhibitor der DNA-PK [143]
TCS 2312	selektiver CHK1-Inhibitor

9.8.1 CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay

In eine 60-cm-Kulturschale werden $3,4-3,5 \times 10^5$ THP-1-Zellen ausplattiert und für 1 h mit dem jeweiligen Inhibitor vorinkubiert. Anschließend erfolgt die zytostatische Behandlung mit einem darauffolgenden zytostatikafreien Intervall von 24 h. Der Inhibitor verbleibt während der gesamten Zeit in der Zellsuspension. Zusätzliche wurde eine zytostatikafreie Inkubation mit jedem Inhibitor durchgeführt, um die Toxizität der Inhibitoren zu beurteilen. Das weitere Vorgehen entspricht der unter 9.4 beschriebenen Methode.

Tab. 32 CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay – Inhibitor-Konznetrationen

Inhibitor	verwendetet Konzentrationen
ATM Kinase Inhibitor	1/5/10/25 μM
L189	5/10/25 μM
NU7026	5/10/20 μM
TCS 2312	50/100/250 nM

9.8.2 Comet-Assay

In eine 60-cm-Kulturschale werden $4-5 \times 10^5$ THP-1-Zellen ausplattiert und für 1 h mit dem jeweiligen Inhibitor vorinkubiert. Anschließend erfolgt die zytostatische Behandlung mit einem darauffolgenden zytostatikafreien Intervall von 1 h, 3 h, 6 h und 24 h. Der Inhibitor verbleibt während der gesamten Zeit in der Zellsuspension. Zusätzliche wurde eine zytostatikafreie Inkubation mit jedem Inhibitor durchgeführt, um einen möglichen schädigenden Einfluss der Inhibitoren zu beurteilen. Das weitere Vorgehen entspricht der unter 9.3 beschriebenen Methode.

Tab. 33 Comet-Assay - Inhibitor-Konzentrationen

Inhibitor	verwendetet Konzentrationen
ATM Kinase Inhibitor	5 μM
L189	25 μM
NU7026	20 μM
TCS 2312	250 nM

9.9 Statistik

Ergebnisse dieser Arbeit sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des F-Tests und des Student-t-Tests.

10 Gefahrstoffe

	Symbol	Signal Word	Hazard Statements	Precautionary Statements
Acrylamide/Bisacrylamide BioReagent, for molecular biology, 37:1 (ratio)	GHS06, GHS08	Gefahr	H301, H312, H315, H317, H319, H332, H340, H350, H361f, H372	P201, P280, P301 + P310, P305 + P351 + P338, P308 + P313
Ammoniumpersulfat	GHS03 GHS08 GHS07	Gefahr	H272, H334, H302, H315, H319, H317, H335	P280, P305+P351+338, P342+P311, P304+P341, P302+P352
Benzamidinhydrochlorid	GHS07	Achtung	H315, H319, H335	P261, P280, P302+P352, P305+P351+P338, P312
Bradford,Reagenz	GHS 07, GHS 08	Achtung	H315, H319, H371	P260, P305 + P351 + P338
Cacliumchlorid	GHS 07	Achtung	H319	
Dinatrium-EDTA	GHS07	Achtung	H319	P280, P264, P305+P351+P338, P337+P313
DMSO	GHS07	Achtung	H315, H319, H335	P261, P280, P302+P352, P305+P351+P338
Doxorubicin (D1515 Sigma Doxorubicin hydrochloride 98.0,102.0% (HPLC))	GHS 07, GHS 08	Gefahr	H302, H350	P201, P308 + P313
EDTA	GHS07	Achtung	H319	P305+P351+P338
Essigsäure 100 %	GHS02, GHS 05	Gefahr	H226, H314	P280, P301 + P330 + P331, P305 + P351 + P338, P304+P340, P310, P405
Ethanol 96 %	GHS02	Gefahr	H225	P210, 233
Ethidiumbromid	GHS06, GHS08	Gefahr	H302, H330, H341	P281, P202, P301+P312
Etoposid	GHS07, GHS 08 (Ausrufungszeichen und Health Hazard)	Gefahr	H302, H350	P201, P308 + P313
Flüssigstickstoff	GHS04	Achtung	H281	P282, P315, P336, P403
Giesmas-Lösung	GHS02, GHS06, GHS08	Gefahr	H225, H301, H311, H331, H370	P280, P210, P302+P352
Isopropanol 70 %	GHS02, GHS07	Gefahr	H225, H319, H336	P210, P305+P351+P338
Isopropanol 99,5 %	GHS02, GHS07	Gefahr	H225, H319, H336	P210, P280, P305+P351+P338
β-Mercaptoethanol	GHS05, GHS06, GHS09	Gefahr	H301, H310, H330, H315, H318, H410	P280, P273, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338, P310
Methanol	GHS02, GHS06, GHS08	Gefahr	H225, H301, H331, H370	P210, P280, P233, P302+P352, P309, P310
Natriumazid	GHS06, GHS09	Gefahr	H300+EUH032, H410	P273, P270, P301+P310, P302+P350; P405, P501
Natriumfluorid	GHS06	Gefahr	H301+EUH032, H315, H319	P280, P301+P310, P302+P352, P305+P351+P338
Natriumhydroxid-Plättchen	GHS05	Gefahr	H290, H314	P303+P361+P353, P301+P330+P331, P305+P351+P338, P310
Pen-Strep-Glutamine, Liq	GHS07	Achtung	H315, H320, H335, H317	P302 + P352, P333 + P313, P305 + P351 + P338, P337 + P313, P304 + P340, P312, P261, P271, P280, P264
PMSF	GHS06, GHS05	Gefahr	H301, H314	P280, P305+P351+P338, P310
Propidiumiodid	GHS07	Achtung	H315, H319, H335	P261, P280, P305+P351+P338, P302+P352, P312
Salzsäure 37 %	GHS05, GHS07	Gefahr	H290, H314, H335	P261, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P403+P233

SDS	GHS02, GHS06	Gefahr	H228, H302, H311, H315, H319, H335	P210, P280, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338, P314
SYBR Green I	GHS06			
TEMED	GHS02, GHS05, GHS07	Gefahr	H225, H302, H332, H314	P210, P280, P303+P361+P353, P301+P330+P331, P305+P351+P338, P310
Trizma Base	GHS07	Achtung	H315, H319, H335	P261, P305 + P351 + P338
Tris-HCl	GHS07	Achtung	H315, H319, H335	P280, P302+P352, P305+P351+P338
Triton X	GHS05, GHS07	Gefahr	H302, H318	P280, P305+P351+P338, P310
Trypanblau, Lösung 0,4 %	GHS08	Gefahr	H350	P201, P308 + P313
Wasserstoffperoxid 30 %	GHS05, GHS07	Gefahr	H302, H318	P280, P305 + P351 + P338
Zitronensäure	GHS07	Achtung	H315, H319	P305, P351

11 Literatur

1. Li, T.K. and L.F. Liu, *Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001. **41**: p. 53-77.
2. Pommier, Y., et al., DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol*, 2010. **17**(5): p. 421-33.
3. Deweese, J.E. and N. Osheroff, *The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing*. *Nucleic Acids Res*, 2009. **37**(3): p. 738-48.
4. Lok, C.N., et al., Characterization of the human topoisomerase IIbeta (TOP2B) promoter activity: essential roles of the nuclear factor-Y (NF-Y)- and specificity protein-1 (Sp1)-binding sites. *Biochem J*, 2002. **368**(Pt 3): p. 741-51.
5. Nitiss, J.L., DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(5): p. 327-37.
6. Christensen, M.O., et al., Dynamics of human DNA topoisomerases IIalpha and IIbeta in living cells. *J Cell Biol*, 2002. **157**(1): p. 31-44.
7. Hande, K.R., Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer*, 1998. **34**(10): p. 1514-21.
8. Merck Millipore Produktinformation 341205 Etoposide <http://www.merckmillipore.com> 2012.
9. Bromberg, K.D., A.B. Burgin, and N. Osheroff, *A two-drug model for etoposide action against human topoisomerase IIalpha*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(9): p. 7406-12.
10. Osheroff, N., Effect of antineoplastic agents on the DNA cleavage/religation reaction of eukaryotic topoisomerase II: inhibition of DNA religation by etoposide. *Biochemistry*, 1989. **28**(15): p. 6157-60.
11. D'Arpa, P., C. Beardmore, and L.F. Liu, Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase poisons. *Cancer Res*, 1990. **50**(21): p. 6919-24.
12. Burden, D.A., et al., Topoisomerase II.etoposide interactions direct the formation of drug-induced enzyme-DNA cleavage complexes. *J Biol Chem*, 1996. **271**(46): p. 29238-44.
13. Montecucco, A. and G. Biamonti, *Cellular response to etoposide treatment*. *Cancer Lett*, 2007. **252**(1): p. 9-18.
14. Hande, K., et al., Inter- and inpatient variability in etoposide kinetics with oral and intravenous drug administration. *Clin Cancer Res*, 1999. **5**(10): p. 2742-7.
15. LASTET® 25 mg/50 mg/100 mg Weichkapseln Cancernova GmbH onkologische Arzneimittel
Rote Liste Service GmbH, FachInfo-Service, 2010.

16. Fachinformation ETOPOPHOS® 100 mg, Bristol-Myers Squibb GmbH & Co. KGaA, Stand Oktober 2010, Rote Liste Service GmbH
FachInfo-Service
17. Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F. B. Starke, K. , *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Vol. 9. Auflage. 2005: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
18. Seeber, S., Schütte, J., *Therapiekonzepte Onkologie*. Vol. 4. Auflage. 2003: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
19. Berger, D.P., Engelhardt, R., Mertelsmann, R., Das Rote Buch - Hämatologie und Internistische Onkologie, ebook der 4. Auflage, ecomed MEDIZIN. 2011.
20. www.rote-liste.de: ETO-cell® 20 mg/ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung, cell pharm. [cited.
21. Etomedac® 20 mg/ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung (zum Verdünnen), medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH, Fachinformation auf www.fachinfo.de,.
22. Rabbani, A., R.M. Finn, and J. Ausio, The anthracycline antibiotics: antitumor drugs that alter chromatin structure. *Bioessays*, 2005. **27**(1): p. 50-6.
23. Merck Millipore Produktinformation 324380 Doxorubicin, Hydrochloride <http://www.merckmillipore.com>
2012.
24. Capranico, G., et al., A protein-mediated mechanism for the DNA sequence-specific action of topoisomerase II poisons. *Trends Pharmacol Sci*, 1997. **18**(9): p. 323-9.
25. Jain, M., et al., Restrained molecular dynamics studies on complex of adriamycin with DNA hexamer sequence d-CGATCG. *Arch Biochem Biophys*, 2005. **439**(1): p. 12-24.
26. Toonen, T.R. and K.R. Hande, *Topoisomerase II inhibitors*. *Cancer Chemother Biol Response Modif*, 2001. **19**: p. 129-47.
27. Lown, J.W., Anthracycline and anthraquinone anticancer agents: current status and recent developments. *Pharmacol Ther*, 1993. **60**(2): p. 185-214.
28. Bachur, N.R., et al., *Helicase inhibition by anthracycline anticancer agents*. *Mol Pharmacol*, 1992. **41**(6): p. 993-8.
29. Gewirtz, D.A., A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*, 1999. **57**(7): p. 727-41.
30. Fachinformation Doxorubicin NC 2 mg/ml, Stand: April 2007, Neocorp AG; aus: FachInfo-Service/Rote Liste Service GmbH
2007.
31. Fachinformation Adrimedac® 2 mg/ml Infusionslösung, Stand: 02/2012, medac

Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH; aus: FachInfo-Service/Rote Liste Service GmbH

2012.

32. Danesi, R., et al., Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet*, 2002. **41**(6): p. 431-44.
33. Lupetti, A., et al., *Molecular basis of resistance to azole antifungals*. *Trends Mol Med*, 2002. **8**(2): p. 76-81.
34. Shrivastav, M., L.P. De Haro, and J.A. Nickoloff, *Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice*. *Cell Res*, 2008. **18**(1): p. 134-47.
35. Mao, Z., et al., Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair (Amst)*, 2008. **7**(10): p. 1765-71.
36. Mao, Z., et al., DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle*, 2008. **7**(18): p. 2902-6.
37. Rothkamm, K., et al., Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(16): p. 5706-15.
38. Pastwa, E. and J. Blasiak, *Non-homologous DNA end joining*. *Acta Biochim Pol*, 2003. **50**(4): p. 891-908.
39. Collis, S.J., et al., *The life and death of DNA-PK*. *Oncogene*, 2005. **24**(6): p. 949-61.
40. Kurosawa, A. and N. Adachi, Functions and regulation of Artemis: a goddess in the maintenance of genome integrity. *J Radiat Res*. **51**(5): p. 503-9.
41. Drouet, J., et al., DNA-dependent protein kinase and XRCC4-DNA ligase IV mobilization in the cell in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem*, 2005. **280**(8): p. 7060-9.
42. Pawelczak, K.S., S.M. Bennett, and J.J. Turchi, *Coordination of DNA-PK activation and nuclease processing of DNA termini in NHEJ*. *Antioxid Redox Signal*. **14**(12): p. 2531-43.
43. van Gent, D.C. and M. van der Burg, *Non-homologous end-joining, a sticky affair*. *Oncogene*, 2007. **26**(56): p. 7731-40.
44. Lieber, M.R., et al., Nonhomologous DNA end joining (NHEJ) and chromosomal translocations in humans. *Subcell Biochem*. **50**: p. 279-96.
45. Iliakis, G., et al., Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res*, 2004. **104**(1-4): p. 14-20.
46. Neal, J.A. and K. Meek, Choosing the right path: does DNA-PK help make the decision? *Mutat Res*. **711**(1-2): p. 73-86.
47. Pardo, B., B. Gomez-Gonzalez, and A. Aguilera, DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci*, 2009. **66**(6): p. 1039-56.

48. Helleday, T., et al., DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)*, 2007. **6**(7): p. 923-35.
49. Sartori, A.A., et al., *Human CtIP promotes DNA end resection*. *Nature*, 2007. **450**(7169): p. 509-14.
50. Tan, T.L., R. Kanaar, and C. Wyman, *Rad54, a Jack of all trades in homologous recombination*. *DNA Repair (Amst)*, 2003. **2**(7): p. 787-94.
51. Parsons, C.A., et al., Precise binding of single-stranded DNA termini by human RAD52 protein. *EMBO J*, 2000. **19**(15): p. 4175-81.
52. Krejci, L., et al., Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res.*
53. Sugawara, N., G. Ira, and J.E. Haber, DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and the role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in double-strand break repair. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(14): p. 5300-9.
54. Shibata, A., et al., Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *EMBO J*, 2011. **30**(6): p. 1079-92.
55. Beucher, A., et al., ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *EMBO J*, 2009. **28**(21): p. 3413-27.
56. Kim, J.S., et al., Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells. *J Cell Biol*, 2005. **170**(3): p. 341-7.
57. Khanna, K.K. and S.P. Jackson, *DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection*. *Nat Genet*, 2001. **27**(3): p. 247-54.
58. Jackson, S.P., *Sensing and repairing DNA double-strand breaks*. *Carcinogenesis*, 2002. **23**(5): p. 687-96.
59. Tutt, A. and J. Yarnold, *Radiobiology of breast cancer*. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2006. **18**(3): p. 166-78.
60. Tanaka, T., et al., Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents. *Cytometry A*, 2007. **71**(9): p. 648-61.
61. Goodarzi, A.A., P. Jeggo, and M. Lobrich, The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax. *DNA Repair (Amst)*, 2010. **9**(12): p. 1273-82.
62. Lee, J.H., et al., 53BP1 promotes ATM activity through direct interactions with the MRN complex. *EMBO J*. **29**(3): p. 574-85.
63. Lee, J.H. and T.T. Paull, Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene*, 2007. **26**(56): p. 7741-8.
64. Rotman, G. and Y. Shiloh, *ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress*. *Oncogene*, 1999. **18**(45): p. 6135-44.

65. Darzynkiewicz, Z., et al., Analysis of individual molecular events of DNA damage response by flow- and image-assisted cytometry. *Methods Cell Biol*, 2011. **103**: p. 115-47.
66. Kitagawa, R., et al., Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway. *Genes Dev*, 2004. **18**(12): p. 1423-38.
67. Shimada, M. and M. Nakanishi, *DNA damage checkpoints and cancer*. *J Mol Histol*, 2006. **37**(5-7): p. 253-60.
68. Stiff, T., et al., ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *EMBO J*, 2006. **25**(24): p. 5775-82.
69. Lavin, M.F., ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks. *Oncogene*, 2007. **26**(56): p. 7749-58.
70. Israels, L.G. and E.D. Israels, *Apoptosis*. *Oncologist*, 1999. **4**(4): p. 332-9.
71. Broker, L.E., F.A. Kruyt, and G. Giaccone, *Cell death independent of caspases: a review*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(9): p. 3155-62.
72. Galluzzi, L., et al., Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ*, 2007. **14**(7): p. 1237-43.
73. Galluzzi, L., et al., *Cell death signaling and anticancer therapy*. *Front Oncol*. **1**: p. 5.
74. Wyllie, A.H., *Apoptosis: an overview*. *British Medical Bulletin*, 1997. **53**(3): p. 451-465.
75. Saraste, A. and K. Pulkki, *Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis*. *Cardiovasc Res*, 2000. **45**(3): p. 528-37.
76. Zong, W.X. and C.B. Thompson, *Necrotic death as a cell fate*. *Genes Dev*, 2006. **20**(1): p. 1-15.
77. Denecker, G., et al., Death receptor-induced apoptotic and necrotic cell death: differential role of caspases and mitochondria. *Cell Death Differ*, 2001. **8**(8): p. 829-40.
78. Eom, Y.W., et al., Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogene*, 2005. **24**(30): p. 4765-77.
79. Vakifahmetoglu, H., M. Olsson, and B. Zhivotovsky, *Death through a tragedy: mitotic catastrophe*. *Cell Death Differ*, 2008. **15**(7): p. 1153-62.
80. Hansen, L.T., et al., The role of RAD51 in etoposide (VP16) resistance in small cell lung cancer. *Int J Cancer*, 2003. **105**(4): p. 472-9.
81. Thomas, H. and H.M. Coley, Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control*, 2003. **10**(2): p. 159-65.
82. Ambudkar, S.V., et al., Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1999. **39**: p. 361-98.
83. Walker, J.V. and J.L. Nitiss, *DNA topoisomerase II as a target for cancer chemotherapy*. *Cancer Invest*, 2002. **20**(4): p. 570-89.

84. Chikamori, K., et al., Phosphorylation of serine 1106 in the catalytic domain of topoisomerase II alpha regulates enzymatic activity and drug sensitivity. *J Biol Chem*, 2003. **278**(15): p. 12696-702.
85. Adachi, N., et al., Hypersensitivity of nonhomologous DNA end-joining mutants to VP-16 and ICRF-193: implications for the repair of topoisomerase II-mediated DNA damage. *J Biol Chem*, 2003. **278**(38): p. 35897-902.
86. Hansen, L.T., et al., DNA repair rate and etoposide (VP16) resistance of tumor cell subpopulations derived from a single human small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2003. **40**(2): p. 157-64.
87. Chen, X., et al., Rational design of human DNA ligase inhibitors that target cellular DNA replication and repair. *Cancer Res*, 2008. **68**(9): p. 3169-77.
88. Long, B.H., S.T. Musial, and M.G. Brattain, Single- and double-strand DNA breakage and repair in human lung adenocarcinoma cells exposed to etoposide and teniposide. *Cancer Res*, 1985. **45**(7): p. 3106-12.
89. Muslimovic, A., et al., *Numerical analysis of etoposide induced DNA breaks*. *PLoS One*, 2009. **4**(6): p. e5859.
90. Soubeyrand, S., L. Pope, and R.J. Hache, Topoisomerase IIalpha-dependent induction of a persistent DNA damage response in response to transient etoposide exposure. *Mol Oncol*, 2009. **4**(1): p. 38-51.
91. Schonh, I., J. Hennesen, and D.C. Dartsch, Cellular responses to etoposide: cell death despite cell cycle arrest and repair of DNA damage. *Apoptosis*, 2010. **15**(2): p. 162-72.
92. Schonh, I., J. Hennesen, and D.C. Dartsch, Ku70 and Rad51 vary in their importance for the repair of doxorubicin- versus etoposide-induced DNA damage. *Apoptosis*, 2010. **16**(4): p. 359-69.
93. Binaschi, M., et al., Irreversible and reversible topoisomerase II DNA cleavage stimulated by clerocidin: sequence specificity and structural drug determinants. *Cancer Res*, 1997. **57**(9): p. 1710-6.
94. Zwelling, L.A., D. Kerrigan, and S. Michaels, Cytotoxicity and DNA strand breaks by 5-iminodaunorubicin in mouse leukemia L1210 cells: comparison with adriamycin and 4'-(9-acridinylamino)methanesulfon-m-anisidide. *Cancer Res*, 1982. **42**(7): p. 2687-91.
95. Ross, W.E. and M.C. Smith, Repair of deoxyribonucleic acid lesions caused by adriamycin and ellipticine. *Biochem Pharmacol*, 1982. **31**(10): p. 1931-5.
96. D'Arpa, P. and L.F. Liu, *Topoisomerase-targeting antitumor drugs*. *Biochim Biophys Acta*, 1989. **989**(2): p. 163-77.
97. Binaschi, M., et al., Comparison of DNA cleavage induced by etoposide and doxorubicin in two human small-cell lung cancer lines with different sensitivities to topoisomerase II inhibitors. *Int J Cancer*, 1990. **45**(2): p. 347-52.

98. Vanden Berghe, T., et al., Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ.* **17**(6): p. 922-30.
99. Tanaka, T., et al., Induction of ATM activation, histone H2AX phosphorylation and apoptosis by etoposide: relation to cell cycle phase. *Cell Cycle*, 2007. **6**(3): p. 371-6.
100. Bhonde, M.R., et al., Equivalent effect of DNA damage-induced apoptotic cell death or long-term cell cycle arrest on colon carcinoma cell proliferation and tumour growth. *Oncogene*, 2006. **25**(2): p. 165-75.
101. Kroemer, G., et al., Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 2009. **16**(1): p. 3-11.
102. Wang, H., et al., Efficient rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in vertebrate cells deficient in genes of the RAD52 epistasis group. *Oncogene*, 2001. **20**(18): p. 2212-24.
103. Brown, J.M. and B.G. Wouters, *Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents*. *Cancer Res*, 1999. **59**(7): p. 1391-9.
104. Treszezamsky, A.D., et al., BRCA1- and BRCA2-deficient cells are sensitive to etoposide-induced DNA double-strand breaks via topoisomerase II. *Cancer Res*, 2007. **67**(15): p. 7078-81.
105. Skladanowski, A. and J. Konopa, Adriamycin and daunomycin induce programmed cell death (apoptosis) in tumour cells. *Biochem Pharmacol*, 1993. **46**(3): p. 375-82.
106. Ling, Y.H., W. Priebe, and R. Perez-Soler, Apoptosis induced by anthracycline antibiotics in P388 parent and multidrug-resistant cells. *Cancer Res*, 1993. **53**(8): p. 1845-52.
107. Bandele, O.J. and N. Osheroff, The efficacy of topoisomerase II-targeted anticancer agents reflects the persistence of drug-induced cleavage complexes in cells. *Biochemistry*, 2008. **47**(45): p. 11900-8.
108. Capranico, G., S. Tinelli, and F. Zunino, Formation, resealing and persistence of DNA breaks produced by 4-demethoxydaunorubicin in P388 leukemia cells. *Chem Biol Interact*, 1989. **72**(1-2): p. 113-23.
109. Lukas, J., C. Lukas, and J. Bartek, Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)*, 2004. **3**(8-9): p. 997-1007.
110. Smith, P.J., et al., Etoposide-induced cell cycle delay and arrest-dependent modulation of DNA topoisomerase II in small-cell lung cancer cells. *Br J Cancer*, 1994. **70**(5): p. 914-21.
111. Petru, E., et al., A correlation of cell cycle perturbations with chemosensitivity in human ovarian cancer cells exposed to cytotoxic drugs in vitro. *Gynecol Oncol*, 1995. **58**(1): p. 48-57.

112. Ishiyama, K., et al., Flow cytometric analysis of the cell cycle of the leukemic cell lines treated with etoposide and cytosine arabinoside. *Tohoku J Exp Med*, 1994. **174**(2): p. 95-107.
113. Ling, Y.H., et al., Cell cycle-dependent cytotoxicity, G2/M phase arrest, and disruption of p34cdc2/cyclin B1 activity induced by doxorubicin in synchronized P388 cells. *Mol Pharmacol*, 1996. **49**(5): p. 832-41.
114. Fornari, F.A., Jr., et al., Growth arrest and non-apoptotic cell death associated with the suppression of c-myc expression in MCF-7 breast tumor cells following acute exposure to doxorubicin. *Biochem Pharmacol*, 1996. **51**(7): p. 931-40.
115. Koehn, H., et al., Differential regulation of DNA repair protein Rad51 in human tumour cell lines exposed to doxorubicin. *Anticancer Drugs*, 2007. **18**(4): p. 419-25.
116. Merry, C., et al., *Targeting the checkpoint kinase Chk1 in cancer therapy*. *Cell Cycle*, 2010. **9**(2): p. 279-83.
117. Ma, C.X., J.W. Janetka, and H. Piwnica-Worms, *Death by releasing the breaks: CHK1 inhibitors as cancer therapeutics*. *Trends Mol Med*, 2010. **17**(2): p. 88-96.
118. Chan, D.W., et al., Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes Dev*, 2002. **16**(18): p. 2333-8.
119. Lee, S.E., et al., Evidence for DNA-PK-dependent and -independent DNA double-strand break repair pathways in mammalian cells as a function of the cell cycle. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(3): p. 1425-33.
120. Shen, H., et al., Increased expression of DNA-dependent protein kinase confers resistance to adriamycin. *Biochim Biophys Acta*, 1998. **1381**(2): p. 131-8.
121. Medunjanin, S., et al., Transcriptional activation of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit gene expression by oestrogen receptor-alpha. *EMBO Rep*. **11**(3): p. 208-13.
122. Song, Q., et al., DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a target for an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J*, 1996. **15**(13): p. 3238-46.
123. de Campos-Nebel, M., I. Larripa, and M. Gonzalez-Cid, Topoisomerase II-mediated DNA damage is differently repaired during the cell cycle by non-homologous end joining and homologous recombination. *PLoS One*. **5**(9).
124. Mazin, A.V., et al., *Rad54, the motor of homologous recombination*. *DNA Repair (Amst)*, 2010. **9**(3): p. 286-302.
125. McNeely, S., et al., Chk1 inhibition after replicative stress activates a double strand break response mediated by ATM and DNA-dependent protein kinase. *Cell Cycle*. **9**(5): p. 995-1004.
126. Greenbaum, D., et al., Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol*, 2003. **4**(9): p. 117.

127. Guo, Y., et al., How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2008. **40**(5): p. 426-36.
128. Berkovich, E. and D. Ginsberg, *ATM is a target for positive regulation by E2F-1*. *Oncogene*, 2003. **22**(2): p. 161-7.
129. Brown, K.D., et al., The ataxia-telangiectasia gene product, a constitutively expressed nuclear protein that is not up-regulated following genome damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(5): p. 1840-5.
130. Riballo, E., et al., A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol Cell*, 2004. **16**(5): p. 715-24.
131. Jeggo, P.A. and M. Lobrich, *Artemis links ATM to double strand break rejoining*. *Cell Cycle*, 2005. **4**(3): p. 359-62.
132. Chen, B.P., et al., Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break. *J Biol Chem*, 2007. **282**(9): p. 6582-7.
133. Iijima, K., et al., Dancing on damaged chromatin: functions of ATM and the RAD50/MRE11/NBS1 complex in cellular responses to DNA damage. *J Radiat Res*, 2008. **49**(5): p. 451-64.
134. Gottifredi, V., et al., *p53 down-regulates CHK1 through p21 and the retinoblastoma protein*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(4): p. 1066-76.
135. Feng, J.M., et al., Proteasome-dependent degradation of Chk1 kinase induced by the topoisomerase II inhibitor R16 contributes to its anticancer activity. *Cancer Biol Ther*, 2008. **7**(11): p. 1726-31.
136. Zhang, Y.W., et al., Genotoxic stress targets human Chk1 for degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell*, 2005. **19**(5): p. 607-18.
137. Sorensen, C.S., et al., The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat Cell Biol*, 2005. **7**(2): p. 195-201.
138. Kasahara, K., et al., Determinants of response to the DNA topoisomerase II inhibitors doxorubicin and etoposide in human lung cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst*, 1992. **84**(2): p. 113-8.
139. Davies, S.M., et al., Nuclear topoisomerase II levels correlate with the sensitivity of mammalian cells to intercalating agents and epipodophyllotoxins. *J Biol Chem*, 1988. **263**(33): p. 17724-9.
140. Lage, H., et al., Modulation of DNA topoisomerase II activity and expression in melanoma cells with acquired drug resistance. *Br J Cancer*, 2000. **82**(2): p. 488-91.

141. Veuger, S.J., et al., Radiosensitization and DNA repair inhibition by the combined use of novel inhibitors of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Cancer Res*, 2003. **63**(18): p. 6008-15.
142. Collis, S.J., et al., Enhanced radiation and chemotherapy-mediated cell killing of human cancer cells by small inhibitory RNA silencing of DNA repair factors. *Cancer Res*, 2003. **63**(7): p. 1550-4.
143. Willmore, E., et al., A novel DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7026, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase II poisons used in the treatment of leukemia. *Blood*, 2004. **103**(12): p. 4659-65.
144. Zhao, Y., et al., Preclinical evaluation of a potent novel DNA-dependent protein kinase inhibitor NU7441. *Cancer Res*, 2006. **66**(10): p. 5354-62.
145. Allen, C., J. Halbrook, and J.A. Nickoloff, *Interactive competition between homologous recombination and non-homologous end joining*. *Mol Cancer Res*, 2003. **1**(12): p. 913-20.
146. Produktinformation L189, santa cruz biotechnology, inc. 2007-2012.
147. Pascal, J.M., et al., Human DNA ligase I completely encircles and partially unwinds nicked DNA. *Nature*, 2004. **432**(7016): p. 473-8.
148. Iliakis, G., Backup pathways of NHEJ in cells of higher eukaryotes: cell cycle dependence. *Radiother Oncol*, 2009. **92**(3): p. 310-5.
149. Teng, M., et al., Structure-based design and synthesis of (5-aryl-amino-2H-pyrazol-3-yl)-biphenyl-2',4'-diols as novel and potent human CHK1 inhibitors. *J Med Chem*, 2007. **50**(22): p. 5253-6.
150. Shiohara, M., et al., Tumor necrosis factor alpha: posttranscriptional stabilization of WAF1 mRNA in p53-deficient human leukemic cells. *J Cell Physiol*, 1996. **166**(3): p. 568-76.
151. Chen, C., et al., Human THP-1 monocytic leukemic cells induced to undergo monocytic differentiation by bryostatin 1 are refractory to proteasome inhibitor-induced apoptosis. *Cancer Res*, 2000. **60**(16): p. 4377-85.
152. Chen, Z., et al., Human Chk1 expression is dispensable for somatic cell death and critical for sustaining G2 DNA damage checkpoint. *Mol Cancer Ther*, 2003. **2**(6): p. 543-8.
153. Carrassa, L. and G. Damia, *Unleashing Chk1 in cancer therapy*. *Cell Cycle*, 2011. **10**(13): p. 2121-8.
154. DSMZ, Catalogue Human and Animal Cell Lines, THP-1, ACC 16.
155. DSMZ, Catalogue Human and Animal Cell Lines, CACO-2, ACC 169.
156. Produktbroschüre "GlutaMAX™ media healthier cells live longer", 2011, Life Technologies Corporation.
157. Singh, N.P., et al., A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 1988. **175**(1): p. 184-91.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich diese Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel habe ich kenntlich gemacht und im beigefügten Verzeichnis angegeben.

Ich versichere außerdem, dass dies mein erster Promotionsversuch ist und ich diese Dissertation bisher weder an dieser noch an einer anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren zu eröffnen.

.....
Hamburg, 13.08.2012

.....
Linda Roth