

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Onkologisches Zentrum, Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Labor für  
Strahlenbiologie & Experimentelle Radioonkologie

Prof. Dr. med. Cordula Petersen

## **Strahlensensibilisierung von Tumorstammzellen des Brustkrebses**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Ann Kristin Krause  
aus Frankfurt a.M.

Hamburg 2023

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 9.7.2024**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Francis Ayuk Ayuketang**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Kerstin Borgmann**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>6</b>
1.1.	Brustkrebs .....	6
1.2	Subtypen des Brustkrebses .....	7
1.2.1	Hormonrezeptor-positiver Brustkrebs .....	7
1.2.2	HER2-positiver Brustkrebs .....	7
1.2.3	Triple-negativer Brustkrebs .....	8
1.3	Ansätze und Herausforderungen in der Therapie des Brustkrebses .....	8
1.4.	Wirkungen von ionisierender Strahlung auf Tumorzellen in der Krebstherapie .....	8
1.5	Tumorstammzellen .....	9
1.6	Bedeutung der Strahlenresistenz in Tumorstammzellen .....	11
1.7	DNA-Reparaturwege und ihre Bedeutung für Strahlenresistenz .....	13
1.8	Zielsetzung der Arbeit .....	16
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
2.1	Material .....	18
2.1.1	Zelllinien .....	18
2.1.2	Medium und Reagenzien für Zellkultivierung .....	19
2.1.3	Puffer, Lösungen und Chemikalien .....	19
2.1.4	Antikörper .....	22
2.1.5	Geräte .....	23
2.1.6	Verbrauchsmaterialien .....	25
2.1.7	Computersoftware .....	26
2.2	Methoden .....	27
2.2.1	Zellkultivierung .....	27
2.2.2	Zellzahlbestimmung .....	27
2.2.3	Erzeugung von DNA-Schäden .....	28
2.2.3.1	PARP-Inhibition mit Olaparib .....	28
2.2.3.2	CHK1-Inhibition mit MK8776 .....	28
2.2.3.3	ATR-Inhibition mit VE-821 .....	28
2.2.3.4	ATM Inhibition mit KU-55933 .....	29
2.2.3.5	DNA PK Inhibition mit NU-7441 .....	29
2.2.3.6	Ionisierende Strahlung .....	29

2.2.4	Analyse des zellulären Überlebens im Koloniebildungsassay .....	29
2.2.4.1	Behandlung, Fixierung und Färbung .....	29
2.2.4.2	Quantitative Auswertung des Zellüberlebens .....	31
2.2.5	DNA Fibre Assay .....	32
2.2.6	ALDEFLUOR™-Assay .....	34
2.2.7	Statistik und Auswertung .....	35
2.2.8	Methodische Vorarbeiten .....	35
2.2.8.1	Etablierung der strahlenresistenten Klone .....	35
2.2.8.2	Selektionierung von TSZ mittels Aldefluor-Assay .....	36
2.2.8.3	Titration des Inhibitors VE 821 .....	37
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
3.1	Einfluss der Faktoren der DNA-Schadensantwort und DNA-Reparatur auf die Strahlenresistenz in Tumorstammzellen .....	38
3.2	Bestimmung der Strahlensensibilisierung nach Inhibition strahlenresistenzvermittelnder Faktoren .....	38
3.3	Anreicherung von TSZ und Erweiterung des Zellsystems .....	44
3.4	Auswirkungen ionisierender Strahlung in Kombination mit Inhibition von ATR und PARP1 auf Replikationsprozesse der DNA .....	45
3.4.1	Auswirkungen ionisierender Strahlung auf DNA-Replikationsprozesse .....	46
3.4.2	Auswirkungen von PARP-Inhibition in Kombination mit ionisierender Strahlung auf DNA-Replikationsprozesse .....	47
3.4.3	Auswirkungen von ATR-Inhibition in Kombination mit ionisierender Strahlung auf DNA-Replikationsprozesse .....	48
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>52</b>
4.1	Modulation der Strahlenempfindlichkeit durch PARP1-Inhibition .....	52
4.2	Modulation der Strahlenempfindlichkeit durch CHK1- oder ATR Inhibition .....	54
4.3	Modulation der Strahlenempfindlichkeit durch ATM- oder DNA-PKcs-Inhibition.....	55
4.4	Korrelation des Stammzellmarkers ALDH1 und Strahlenresistenz .....	56
4.5	Auswirkungen ionisierender Strahlung auf Replikationsprozesse in TSZ ..	57
4.6.	Auswirkung ionisierender Strahlung mit PARP-Inhibition auf Replikationsprozesse .....	58

4.7	Auswirkung ionisierender Strahlung mit ATR-Inhibition auf Replikationsprozesse .....	59
4.8	Fazit .....	60
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>61</b>
5.1	Summary .....	62
<b>6.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>63</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>65</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>73</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>74</b>
<b>10.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>75</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Brustkrebs

In Deutschland erkranken nach derzeitigem Stand 50 % der Männer und 44 % der Frauen im Laufe des Lebens an Krebs. Zu den häufigsten Krebsarten zählt Brustkrebs mit einem Anteil von 30,5 Prozent an allen Krebsfällen ([www.krebsdaten.de](http://www.krebsdaten.de)). Auch international ist die Zahl der dokumentierten Krebserkrankungen steigend (Internationale Agentur für Krebsforschung (IARC) der Weltgesundheitsorganisation (WHO)). Tumorerkrankungen bleiben weiterhin eine Herausforderung für die Medizin, und molekulargenetische sowie zellbiologische Aspekte spielen zunehmend eine wichtige Rolle in der Erforschung von Tumorgenese, Tumorwachstum, Metastasierung und Therapieweiterentwicklung. Mit zuletzt rund 69.900 Neuerkrankungen jährlich ist Brustkrebs die mit Abstand häufigste Krebserkrankung der Frau, nur 1% aller Neuerkrankungen betrifft Männer. Auf Basis der aktuellen Inzidenzraten erkrankt etwa eine von acht Frauen im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Eine von sechs betroffenen Frauen erkrankt vor dem 50. und knapp zwei von fünf nach dem 70. Lebensjahr ([Krebsdaten.de](http://Krebsdaten.de)).

Es gibt mehrere Risikofaktoren, die das Brustkrebsrisiko erhöhen können. Einige davon sind nicht modifizierbar, wie beispielsweise das Alter, die familiäre Vorgeschichte und genetische Veränderungen wie die Mutationen der Gene BRCA1 und BRCA2. Andere Risikofaktoren sind modifizierbar und können durch Veränderungen des Lebensstils beeinflusst werden, darunter Adipositas, Alkoholkonsum, Rauchen und Hormonersatztherapie (WHO).

## **1.2 Subtypen des Brustkrebses**

Brustkrebs ist eine heterogene Erkrankung, die aus verschiedenen Subtypen besteht, die sich in Bezug auf ihre biologischen Eigenschaften, ihre Prognose und ihr Ansprechen auf bestimmte Therapien unterscheiden. Die verschiedenen Subtypen von Brusttumoren weisen unterschiedliche molekulare Eigenschaften auf und repräsentieren verschiedene biologische Entitäten, die mit unterschiedlichen klinischen Ergebnissen einhergehen (Hu et al., 2006; Fan et al., 2006).

### **1.2.1 Hormonrezeptor-positiver Brustkrebs**

Der Hormonrezeptor-positive Brustkrebs ist der häufigste Subtyp und umfasst Tumore, die Hormonrezeptoren für Östrogen und/oder Progesteron exprimieren. Etwa 75% der Brustkrebsfälle fallen in diese Kategorie. Diese Tumore wachsen tendenziell langsam und erscheinen besser differenziert als Hormonrezeptor-negative Tumore. Darüber hinaus sprechen diese Tumore gut auf endokrine Therapien an, wie z.B. den Einsatz von Antihormontherapien wie Tamoxifen oder Aromatasehemmern, welche die Wahrscheinlichkeit eines Rückfalls in der adjuvanten Phase verringern und das Überleben verlängern können, wenn sich bereits Metastasen gebildet haben. Die Prognose für Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs ist in der Regel günstiger als bei anderen Subtypen (Bjornstrom/Sjoberg, 2005; De Vivo et al., 2003; Davis et al., 2011, Perou, 2011). Man unterscheidet beim Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs in Luminal-A und Luminal-B, wobei letzterer durch eine höhere Proliferationsrate und ein schlechteres Ansprechen auf endokrine Therapien gekennzeichnet ist (Perou, 2011).

### **1.2.2 HER2-positiver Brustkrebs**

HER2-positiver Brustkrebs ist durch eine Überexpression des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors 2 (HER2) gekennzeichnet. Etwa 15-20% der Brustkrebsfälle gehören zu diesem Subtyp (Perou, 2011). Klinisch gesehen haben Brusttumore mit HER2-Amplifikation einen aggressiveren Verlauf und eine geringere Überlebensrate als HER2-negative Tumore. Sie sprechen aber gut auf gezielte Therapien wie Trastuzumab (Herceptin) an. Trastuzumab ist ein gegen HER2 gerichteter humanisierter monoklonaler Antikörper, der den Eckpfeiler der zielgerichteten HER2-Therapie bildet. Durch die Blockade des HER2-Rezeptors wird das Tumorwachstum gehemmt. Die Entwicklung und der Einsatz von HER2-gerichteten Therapien in der adjuvanten und metastatischen Behandlung haben die

Prognose von HER2-positivem Brustkrebs drastisch verbessert (Slamon et al., 1987;; Ramakrishna et al.2014; Hudis 2007; Perou 2011).

### **1.2.3 Triple-negativer Brustkrebs**

Der Triple-negative Brustkrebs (TNBC) ist durch das Fehlen von Östrogen-, Progesteron- und HER2-Rezeptoren gekennzeichnet. Dieser Subtyp macht etwa 10-15% der Brustkrebsfälle aus. Triple-negativer Brustkrebs ist oft aggressiver und mit einem höheren Rückfallrisiko verbunden. Da keine spezifischen Zielmoleküle für die Therapie vorliegen, ist die Behandlung herausfordernd. Eine Kombination aus Chemotherapie, Strahlentherapie und operativen Eingriffen bleibt der Standardansatz für diesen Brustkrebs-Subtyp (Sørli et al. 2003, Perou 2011).

### **1.3 Ansätze und Herausforderungen in der Therapie des Brustkrebses**

Insgesamt hängt die Therapie von Brustkrebs vom Stadium, dem Subtyp und der individuellen Situation der Patientin ab. Behandlungsoptionen umfassen chirurgische Maßnahmen wie Lumpektomie oder Mastektomie, Strahlentherapie, Chemotherapie, hormonelle Therapien und zielgerichtete Therapien. Trotz der zahlreichen therapeutischen Ansätze in der Behandlung des Brustkrebses sind auftretende Resistenzen ein Grund für Therapieversagen (N.Lynn et al.). Daher besteht die Notwendigkeit, die Therapie zu verbessern und die Überlebenschancen der Patientinnen, unabhängig vom Subtyp, zu erhöhen. Um dieses Ziel zu erreichen, ist es von großer Bedeutung, die zugrundeliegenden Mechanismen zu identifizieren, die Resistenzen verursachen und zur Neuentstehung eines Tumors führen.

### **1.4 Wirkungen von ionisierender Strahlung auf Tumorzellen in der Krebstherapie**

Die Strahlentherapie ist neben der Operation und der Chemotherapie eine der wichtigsten Behandlungsmöglichkeiten gegen Krebs, und die jüngsten Verbesserungen in der Bestrahlungstechnologie und -durchführung haben die Effizienz und Qualität der Behandlung erheblich gesteigert (Atun et al., 2015; Schulz et al., 2019). Das kurative Potenzial der Strahlentherapie hängt von ihrer Fähigkeit ab, den Untergang von Tumorzellen durch Akkumulation nicht reparabler DNA-Läsionen zu bewirken und dadurch Krebszellen aus dem klonogenen Pool zu entfernen



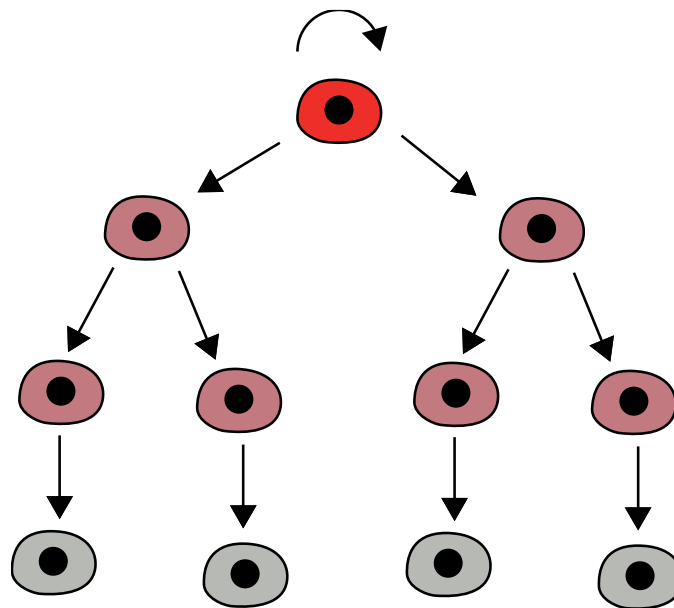
(Baumann et al., 2008; Butof et al., 2013; Krause et al., 2017, Krause et al., 2011). Ionisierende Strahlung (IR) induziert verschiedene Arten von DNA-Schäden, wobei Doppelstrangbrüche (DSB) die bedeutendsten DNA-Läsionen darstellen. Wenn die Menge der strahleninduzierten DSB die DNA-Reparaturkapazität der Tumorzellen übersteigt, kann dies zum Stillstand des Zellzyklus, zur Seneszenz der Tumorzellen und zum Tod führen. Die Entscheidung über das Zellschicksal nach einer Strahlenbelastung hängt von der Menge der kritischen DNA-Schäden ab. Ein geringes Maß an DNA-Läsionen löst DNA-Reparaturmechanismen und DNA-Schadenskontrollpunkte aus, die die Zellzyklusprogression bei Vorhandensein von DNA-Schäden stoppen und es den Zellen ermöglichen, die DNA zu reparieren, bevor sie in den proliferativen Pool zurückkehren. Wenn jedoch die Menge der DNA-Schäden nicht reparabel ist, gehen die Zellen in die Apoptose (Morgan et al., 2015; Roos et al., 2016, Schulz/Meyer et al 2019). Eins der grundlegenden Probleme der Radioonkologie ist die Resistenz des Tumors gegenüber Strahlendosen, die ein akzeptables Maß an Toxizität für das normale Gewebe verursachen. Die Strahlenresistenz des Tumors führt zum Versagen der lokalen und regionalen Kontrolle und zum Fortschreiten der Krankheit (Baumann et al., 2016; Domina et al., 2018).

### **1.5 Tumorstammzellen**

Jahrzehntelang war die vorherrschende Theorie der Krebsentstehung und -progression, dass Krebs durch eine serielle Anhäufung von Genmutationen in normalen Körperzellen entsteht. Man ging allgemein davon aus, dass diese Mutationen einen selektiven Vorteil in Form einer verstärkten Proliferation, einer Hemmung der Differenzierung und einer verringerten Apoptose bieten. Man nahm an, dass jede nachfolgende Mutation zu einer fortschreitenden "Entdifferenzierung" führt, und dass die Zelle mit zunehmender Mutationshäufigkeit ein höheres Maß an phänotypischer Plastizität erlangt (Hanahan D, Weinberg RA, 2000; 2011).

Dieses Modell der sequenziell erworbenen Mutationen in somatischen Zellen ist wahrscheinlich zu simpel, und in den letzten Jahren hat das Konzept der Tumorstammzellen (TSZ) erheblich an Zugkraft gewonnen (Alferez et al 2018, Sin et al., 2017).

Tumore scheinen mit einer zellulären Hierarchie organisiert zu sein, die derjenigen von normalem Gewebe ähnelt. Eine zelluläre Hierarchie in normalen Geweben oder Tumoren bedeutet, dass nicht alle Zellen gleichwertig sind und dass nur Stammzellen (SZ) ein langfristiges Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotenzial besitzen. Aus SZ entstehen neue SZ und engagiertere Progenitoren, die ein begrenztes Erneuerungspotenzial haben und aus denen schließlich endständig differenzierte Zellen hervorgehen (Beck, Blanpain 2013).



**Abb.1.1:** Aus Stammzellen entstehen neue Stammzellen und Progenitorzellen. Progenitorzellen haben ein begrenztes Erneuerungspotenzial. Aus Progenitorzellen gehen differenzierte Zellen hervor.

TSZ sind eine kleine Untergruppe von Zellen innerhalb eines Tumors und weisen einige charakteristische Eigenschaften auf, die sie von anderen Tumorzellen unterscheiden. Ähnlich den Gewebestammzellen haben TSZ mehrere Schlüsseleigenschaften, darunter Selbsterneuerung, d. h. die Fähigkeit einer Zelle, sich in einem undifferenzierten Zustand unbegrenzt zu erneuern, seltene und langsame Replikation, hohe DNA-Reparaturkapazität und die Fähigkeit, durch asymmetrische Zellteilung Tochterzellen mit Differenzierungspotenzial hervorzubringen (Visvader/ Lindeman, 2012; Wicha et al., 2006). Diese Eigenschaften machen TSZ zu einer Wurzel des Tumorwachstums und des Wiederauftretens des Tumors. Sie stellen einen wichtigen Marker für die Tumordiagnose, -prognose und -behandlung, sowie ein wichtiges Ziel für die Krebstherapie dar. Es gibt zunehmend

Belege für die dynamische Natur der TSZ, die durch genetische Veränderungen, epigenetische Umprogrammierung und die Mikroumgebung des Tumors beeinflusst werden können (Kreso et al., 2014; Batlle/Clevers, 2017).

Obwohl der Anteil der TSZ in einem Tumor im Allgemeinen gering ist, ist die TSZ-Population selbst divergent, da sie unterschiedliche Mutationslasten, epigenetische Veränderungen oder zelluläre Plastizität aufweist. All diese Merkmale, die eng mit einem TSZ-Phänotyp verbunden sind, können durch Umweltfaktoren wie Hypoxie, die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen oder die Interaktion von TSZ mit dem Stroma und der extrazellulären Matrix beeinflusst werden. Sogar ionisierende Strahlung (IR) selbst kann Veränderungen in TSZ hervorrufen. So kann IR beispielsweise einen epithelial-mesenchymalen Übergang (EMT) in Zellen auslösen und zur Metastasierung führen (Chang 2016, Marie-Egyptienne et al., 2016; Hill et al., 2009; Moncharmont et al., 2014).

Im Brustkrebs wurden diese TSZ-Populationen identifiziert und als Brustkrebsstammzellen (BCSC) bezeichnet. Zelloberflächenmarker wie beispielsweise *Cluster of Differentiation 44* (CD44) und *Cluster of Differentiation 24* (CD24) werden zur Identifizierung von BCSC verwendet, und die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) ermöglicht die Markierung, Sortierung und Manipulation von BCSC im Labor (Al-Hajj et al., 2003). In den letzten Jahren wurden weitere Marker identifiziert, darunter Aldehyddehydrogenase 1 (ALDH1), Cluster of Differentiation 133 (CD133) und Cluster of Differentiation 49f (CD49f). Das Vorhandensein dieser Marker wird häufig mit einer Resistenz gegen Chemo- und Strahlentherapie in Verbindung gebracht. TNBC zeigen im Vergleich zu anderen Brustkrebs-Subtypen die höchste Expression dieser Biomarker (Crocker et al., 2009).

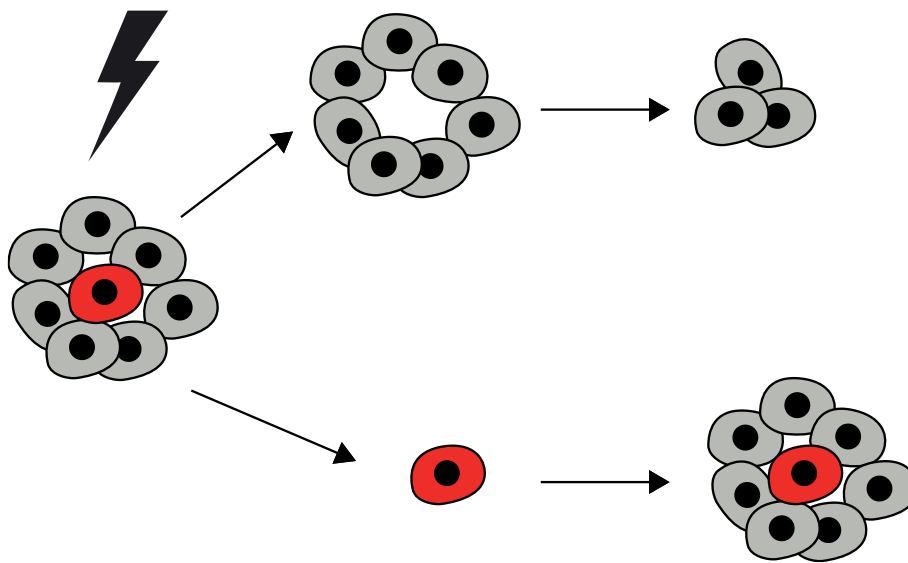
### **1.6 Bedeutung der Strahlenresistenz in Tumorstammzellen**

TSZ können eine erhöhte Resistenz gegenüber herkömmlichen Krebstherapien wie Chemotherapie und Strahlentherapie aufweisen, was zu Rückfällen und Metastasenbildung führen kann (Visvader/ Lindeman 2012).

Die strahlenresistenten Eigenschaften der TSZ stellen eine bedeutende Herausforderung in der Krebstherapie dar und werden unter anderem auf die verstärkte Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen zurückgeführt. TSZ weisen eine verbesserte Fähigkeit zur Reparatur von DNA-Schäden auf, die z.B. durch IR verursacht werden. Dies ermöglicht ihnen, potenziell tödliche DNA-Schäden zu

beheben und das Überleben nach Bestrahlung zu fördern (Bao et al., 2006). In Gewebestammzellen gewährleistet die Veränderung der DNA-Reparaturwege die fehlerfreie Erhaltung der DNA. Bei TSZ hingegen führt sie zu einer Resistenz gegenüber exogen induzierten DNA-Schäden, die zum Versagen der Tumorthherapie führt (Maynard et al., 2009; Mandal et al., 2011).

Dies steht im Einklang mit der allgemein akzeptierten Ansicht, dass Gewebestammzellen die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität garantieren und TSZ das Überleben der gesamten Tumorphosphorie sicherstellen.

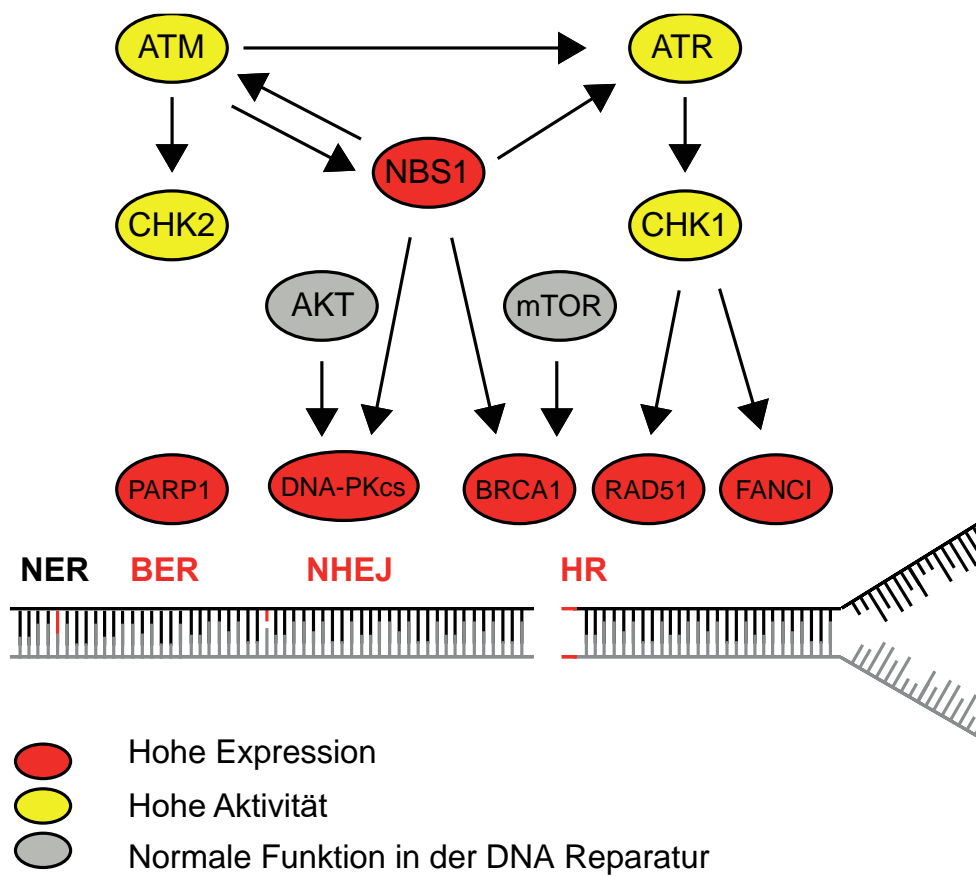


**Abb.1.2:** Strahlenresistente TSZ können persistieren und erneut Tumorzellen bilden. Dies führt zum Rezidiv des Tumors und signalisiert das Versagen der Behandlung.

Experimente zur Transplantation von Tumorzellen, zunächst in isogenen Mausmodellen von Hewitt und Wilson und später in menschlichen Xenotransplantat-Tumormodellen, haben gezeigt, dass das therapeutische Potenzial der Strahlentherapie durch die Anzahl der tumorbildenden Zellen in diesen experimentellen Tumoren bestimmt wird (Baumann et al., 2008; Krause et al., 2011; Hill et al., 1989; Baumann et al., 1990; Koch et al., 2010). Die Eliminierung von TSZ könnte demnach zu einer Rückbildung des Krebses aufgrund von Differenzierung und/oder Zelltod führen.

## **1.7 DNA-Reparaturwege und ihre Bedeutung für Strahlenresistenz**

Die meisten Untersuchungen zur Strahlenresistenz und DNA-Reparatur wurden bei Glioblastomen durchgeführt. Ihre Strahlenresistenz wird durch eine verstärkte Aktivierung der beiden Serin-Threonin-Proteinkinasen Ataxia-Telangiectasia Mutated (ATM) und ATM- und Rad3-Related (ATR) und ihrer beiden nachgeschalteten Checkpoint-Kinasen (Chk1 und Chk2) vermittelt (Vitale et al., 2017; Bao et al., 2006; Ahmed et al., 2015; Bartucci et al., 2012, Carruthers et al., 2015; Schulz et al., 2019). Eine erhöhte Expression von DNA-Reparaturgenen wurde auch bei TSZ in Lungenkarzinomen, Brustkrebs, TSZ der Bauchspeicheldrüse und in nicht-kleinzelligem Lungenkrebs beobachtet (Borgmann et al., 2016, Desai et al. 2014, Schulz et al. 2019). Ausgangspunkt für die verstärkte DNA-Schadensantwort (DDR) scheint eine allgemeine Anpassung an erhöhten Replikationsstress (RS) und vermehrte oxidative Schäden bereits im unbehandelten Zustand zu sein, was zu einer verstärkten Aktivierung der DDR nach Bestrahlung führt (Carruthers et al., 2018; Diehn et al., 2009; Schulz et al., 2019). Die DNA-Schadensantwort wird dann entweder durch induzierte DSB zur verstärkten Aktivierung von ATM oder durch erhöhten RS zur verstärkten Aktivierung von ATR vermittelt. Dies führt zu einer geringeren Anzahl von DSB (Diehn et al., 2009; Bartkova et al. 2010; Schulz et al., 2019). Auch Poly (ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP1), ein Protein, das an der Reparatur einzelsträngiger DNA-Brüche beteiligt ist, ist in vielen Brusttumoren überexprimiert (Siraj et al., 2018). Es gibt Hinweise, dass das Fehlen von PARP1 zu einer Überempfindlichkeit gegenüber IR führt. In verschiedenen Tumorentitäten wurde des Weiteren beobachtet, dass der PARP1-Inhibitor Olaparib zu einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit führte (Nitta et al., 2010; van Vuurden et al., 2011).



**Abb. 1.3:** Die in TSZ veränderten DNA-Reparaturwege sind mit der DNA-Replikation verbunden. Replikationsassoziierte DNA-Reparaturwege, die zu einer verstärkten DNA-Reparatur führen (rot), vermitteln die Resistenz in TSZ, während andere replikationsassoziierte DNA-Reparaturwege unverändert bleiben. Die Hochregulierung beruht auf erhöhter Expression (rot) oder erhöhter Aktivierung (gelb) oder beidem und wird durch regulatorische Proteine (grau) unterstützt. BER- Basen-Exzisionsreparatur; HR - homologe Rekombination; NER - Nukleotid-Exzisionsreparatur; NHEJ - nicht-homologe Endverknüpfung (Schulz et al., 2019, Baumann et al., 2008; Vitale et al. 2017).

Um DSB zu reparieren, setzen Zellen zwei Hauptmechanismen ein: die fehleranfällige nicht-homologe Endverbindung (NHEJ) und die präzise homologe Rekombination (HR) (Mladenov et al., 2016).

NHEJ wird durch die Bindung von DNAPKcs an DSB initiiert und repariert die meisten DSB in Säugetierzellen. Ausnahme ist die Reparatur von DSB an DNA-Replikationsgabeln, da dort die HR bevorzugt eingesetzt wird (Graham et al., 2016; Beucher et al., 2009; Karanam et al., 2012).

Obwohl klassisches NHEJ oft als fehleranfällig und mutagen beschrieben wird, ist es in Wirklichkeit bemerkenswert effizient und meist genau, da maximal 1-5 Nukleotide verändert werden (Bétermier et al., 2014).

In Säugetierzellen wird die HR in der späten Synthesephase (S-Phase) und in der G2-Phase des Zellzyklus verwendet, wenn die DNA-Vorlage auf dem Schwesterchromatid für die Rekombination zur Verfügung steht. Das NHEJ dominiert die G1-Phase und in der G2-Phase scheinen beide Reparaturwege um die Reparatur von DSB zu konkurrieren. Beide Reparaturwege werden in der M-Phase herunterreguliert, weshalb diese Phase die strahlenempfindlichste ist (Hufnagl et al., 2015; Lieber et al., 2003; Mao et al., 2008; Mjelle et al., 2015; Kakaroukgas et al., 2014; Schulz et al., 2019). Da TSZ DNA-Schäden vorzugsweise durch die HR reparieren, wird ihr eine besondere Bedeutung in der TSZ-bedingten Resistenz zugesprochen (Meyer et al., 2022).

Die HR kann als der letzte Ausweg der DNA-Reparatur angesehen werden. Wenn andere DNA-Reparaturmechanismen, wie Basenexzision (BER) oder die Nukleotidexzision (NER) versagen, werden DNA-Läsionen typischerweise während der DNA-Replikation in DSB umgewandelt. Diese Läsionen werden in den HR-Pfad geleitet, da NHEJ während der DNA-Replikation im Allgemeinen inaktiv ist (Huang / Mazin, 2014; Mao et al., 2009). Bei der HR wird die geschädigte DNA repariert, indem der homologe Sequenzabschnitt auf dem ungeschädigten Schwesterchromatid identifiziert und als Vorlage für den fehlerfreien Reparaturprozess verwendet wird (Budke B, 2012).

Eine Aktivierung der verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen in bestimmten Phasen des Zellzyklus führt zu Unterschieden in der Strahlenempfindlichkeit während des gesamten Zellzyklus. In der späten S-Phase zeigen die Zellen die höchste Strahlenresistenz (Karanam et al., 2012). Diese erhöhte Strahlenresistenz wird auf eine erhöhte Reparaturleistung während der DNA-Replikation zurückgeführt (Karanam et al., 2012; Schulz et al., 2019).

## 1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die aktuellen präklinischen und klinischen Erkenntnisse zeigen, dass neben den konventionellen klinischen und pathologischen Indikatoren, die einen prognostischen Wert in der Radioonkologie haben, die Anzahl der TSZ und ihre Strahlenresistenz wichtige Parameter für die lokale Kontrolle nach der Strahlentherapie sind. Obwohl die Heterogenität von Tumorzellen viel komplexer ist, als es das hierarchische Modell erklären kann, sind TSZ-Populationen nach wie vor wichtige Ziele und Biomarker für die Krebsbehandlung. Die strahlenresistenten Eigenschaften von TSZ haben weitreichende Konsequenzen für die Wirksamkeit der Strahlentherapie. Obwohl die Bestrahlung den Großteil der Tumorzellen abtöten kann, können überlebende strahlenresistente TSZ die Quelle für Tumorrezidive und Metastasenbildung sein. Ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung ermöglicht es ihnen, den Tumor wieder aufzubauen und die Krankheit voranzutreiben (Bao et al., 2006). Eine gesteigerte Aktivierung bestimmter Faktoren der DNA-Schadenantwort und -Reparatur wurde in TSZ verschiedener Tumorentitäten beobachtet (Schulz et al., 2019).

Unklar ist, durch welche Inhibitoren der DNA-Schadensantwort TSZ des Brustkrebses sensibilisiert werden können und welchen Einfluss die Beeinträchtigung von DNA-Replikationsprozessen für diese Sensibilisierung hat. Zur Untersuchung dieser Fragestellung sollte in dieser Arbeit ein bereits etabliertes Zellsystem, bestehend aus zwei Brustkrebszelllinien, daraus hergestellten strahlenresistenten Klonen mit stark erhöhtem TSZ-Anteil und daraus isolierten, ALDH1-positiven TSZ eingesetzt werden. Zur Identifizierung spezifischer, strahlenresistenzvermittelnder Signalwege der DNA-Schadensantwort und DNA-Reparaturwege in TSZ des Mammakarzinoms wurden diese inhibiert und ihre Auswirkungen auf die Strahlenempfindlichkeit anhand des zellulären Überlebens im Kolonietest überprüft.

Dabei war von besonderem Interesse, wie sich die Inhibition auf die Strahlenempfindlichkeit der strahlenresistenten Klone im Vergleich zu WT-Zellen durch den deutlich gesteigerten Anteil an ALDH1-positiver TSZ auswirkt. Inhibiert wurden ATM, die wichtigste Kinase der DNA-DSB Erkennung, ATR, die bedeutendste Kinase der S-Phase für die Erkennung einzelsträngiger DNA, die Intra-S-Phase Kinase CHK1, DNA-PKcs, als wichtigste Kinase des NHEJ und PARP1, ein essenzieller Faktor der Basenexcisionsreparatur.



Folgende *small-molecule* Inhibitoren wurden verwendet:

- MK8766
- Olaparib
- VE821
- KU55933
- NU7441

Aufbauend darauf wurden für die effektivsten Inhibitoren die molekularen Mechanismen der Strahlensensibilisierung durch Untersuchungen von DNA-Replikationsprozessen mittels DNA-Fiber Assay weiter untersucht. Von besonderem Interesse war dabei die Wirkung der Strahlensensibilisierung in der S-Phase, sodass das Arbeitsprogramm mit den beiden klinisch relevanten und effektiven S-Phase-Inhibitoren VE281 (ATRi) und Olaparib (PARPi) fortgesetzt wurde.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien

Für die Experimente wurden insgesamt sechs Zelllinien eingesetzt: eine triple-negative (MDA-MB-231) und eine luminal (MCF7) sowie deren radioresistente Klone und daraus isolierte, ALDH1-positive Tumorstammzellen.

**Tabelle 1:** Übersicht der eingesetzten Tumorzelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Ursprung</b>	<b>Subtyp</b>	<b>Etabliert von</b>
<b>MDA-MB-231</b>	Pleuraerguss	TNBC	Cailleau et al., 1974
<b>MCF7</b>	Pleuraerguss	Luminal A	Soule et al., 1973
<b>MDA-MB-231 RR</b>	Durch wiederholte Bestrahlung der MDA-MB-231	TNBC	Siehe Seite 36
<b>MCF7 RR</b>	Durch wiederholte Bestrahlung der MCF7	Luminal A	Siehe Seite 36
<b>MDA-MB-231 RR ALDH1+</b>	Isolation per FACS aus MDA-MB-231 RR	TNBC	Siehe Seite 38
<b>MCF7 RR ALDH1+</b>	Isolation per FACS aus MCF7 RR	Luminal A	Siehe Seite 38

## 2.1.2 Medium und Reagenzien für Zellkultivierung

Tabelle 1: Medium und Reagenzien für Zellkulturhaltung

Name	Zusammensetzung/Hersteller
<b>Coulter Isoton™ II Diluent</b>	Beckmann Coulter™, Krefeld, DE
<b>Dulbecco's Modified Egel's Medium - high glucose (DMEM)</b>	4500 mg/L Glukose, L-Glutamin, Natriumpyruvat und Natriumbicarbonat, flüssig, sterilfiltriert / Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
<b>1x Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)</b>	Modifiziert ohne Kalzium- und Magnesiumchlorid, flüssig, sterilfiltriert / Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
<b>Fetales Kälberserum (FKS)</b>	Biochrom GmbH, Berlin, DE
<b>1x Trypsin-EDTA Lösung</b>	Steril, $\gamma$ -bestrahlt, 0,25% Schweine-Trypsin (1:250) in HBSS, 0,1% EDTA / Sigma-Aldrich, Steinheim, DE

## 2.1.3 Puffer, Lösungen und Chemikalien

Tabelle 2: Puffer, Lösungen und Chemikalien für Koloniebildungsassay

Name	Zusammensetzung/Hersteller
<b>Coulter Isoton™ II Diluent</b>	Beckmann Coulter™, Krefeld, DE
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<b>70% Ethanol</b>	Carl Roth GmbH, DE
<b>Kristallviolett Färbelösung</b>	0,1% in dH <sub>2</sub> O / Sigma-Aldrich, Steinheim, DE

<b>Olaparib (AZD2281), KU-0059436</b>	PARP-Inhibitor, 10 mM Selleckchem, München, DE
<b>MK-8776 (SCH 900776)</b>	CHK1-Inhibitor, 2 mM Selleckchem, München,DE
<b>VE-821</b>	ATR-Inhibitor, 10 mM Selleckchem, München, DE
<b>KU-55933</b>	ATM-Inhibitor, 0,1 mM Selleckchem, München, DE
<b>NU-7441</b>	DNA-PK-Inhibitor, 0,1 mM Selleckchem, München, DE

**Tabelle 3:** Puffer, Lösungen und Chemikalien für Fiber Assay

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung/ Hersteller</b>
<b>Blockierlösung</b>	100 ml PBS 1 % BSA 0,1 % Tween20
<b>5-Chloro-2´deoxyuridine (CldU)</b>	Sigma, C6891-100MG
<b>2,5 mM 5-Chloro-2´deoxyuridine (CldU)</b>	Die Mischung erfolgt in einem Verhältnis von 1:100 mit DMEMMedium (Sigma, C6891 100MG)
<b>Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)</b>	Invitrogen, Darmstadt, #21885-025
<b>EDTA</b>	Serva, Heidelberg
<b>Ethanol 70% (V/V)</b>	Merck, Darmstadt

<b>Essigsäure</b>	J.T.Baker, Deventer (NL)
<b>Fixierungslösung</b>	Methanol/Essigsäure-Gemisch: 3:1
<b>Fötale Kälberserum (FCS)</b>	Invitrogen, Karlsruhe, #10270-106 Gold, PAA, Cölbe, #A15-649
<b>2,5 mM rauchende HCl</b>	Merck, K31375917-245
<b>2,5 M HCl-Lösung</b>	5,2 ml 37 % rauchende HCl 19,8 ml Aqua bidest.
<b>Tris-HCl pH 7,4</b>	Trizma®HCl, Sigma, T3253 (-1KG)
<b>5-Iodo-2` deoxyuridine (IdU)</b>	Sigma, I7125-5G
<b>2,5 mM 5-Iodo2` deoxyuridine Stammlösung</b>	Die Mischung erfolgt in einem Verhältnis von 1:10 mit DMEM-Medium (Sigma, I7125-5G)
<b>Kaliumdihydrogenphosphat</b>	Merck, Darmstadt
<b>Kulturmedium 1</b>	DMEM Low Glucose + 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, G418 5 ml Stocklösung auf 500 ml steril filtrieren
<b>Kulturmedium 2</b>	Alpha-Medium + 13 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin
<b>Methanol</b>	J.T.Baker, Deventer (NL)
<b>Mounting Medium</b>	MP Biomedical's, LLC (Ohio/USA) #62270
<b>Natriumchlorid</b>	J.T. Baker, Deventer (NL)

<b>Parformaldehyd</b>	Roth, Karlsruhe
<b>4 %iges Paraformaldehyd in PBS</b>	<u>In 45 ml PBS werden gelöst:</u> 2 g Paraformaldehyd Ca. 2-10 Tropfen 2N NaOH, so dass eine vollständige Auflösung des Paraformaldehyds in der Lösung erfolgt. Die Mischung der Substanzen erfolgt unter kontinuierlicher Wärmezufuhr mittels Heizplatte. Am Ende erfolgt die Aufsättigung der Lösung mittels PBS auf ein Gesamtvolumen von 50 ml.
<b>1xPBS (Phosphate Buffered Saline)</b>	<u>In 1.000 ml Aqua bidest. werden gelöst:</u> 8,0 g Natriumchlorid 0,2 g Kaliumchlorid 0,27 g Kaliumdihydrogenphosphat 1,78 g Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat
<b>Penicillin/Streptomycin</b>	Invitrogen, Carlsbad (USA)
<b>Rinderserumalbumin (BSA)</b>	Biochrom, Berlin
<b>0,5 % SDS (Sodium dodecyl sulfate)</b>	0,5 % (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O bidest. Sigma-Aldrich, Steinheim

## 2.1.4 Antikörper

Tabelle 4: Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Nummer</b>	<b>Inkubationsbedingungen/ Konzentration</b>
<b>Monoclonal Rat anti-BrdU Clone BU1/75 (ICR1)</b>	Abd Serotec Oxford, UK	# ABT0030G	1:1000 in PBS+1 % BSA+ 0.1 % Tween20 Bei 1 h RT
<b>Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse IgG (H+L)</b>	Invitrogen Darmstadt	# A-11001	1:500 in PBS + 1 % BSA + 0.1 % Tween20 bei 1,5 h RT

<b>Anti-BrdU (Clone B44) Mouse monoclonal IgG</b>	Becton Dickinson New Jersey, USA	#347580 (7580)	1:1500 in PBS + 1 % BSA + 0,1 % Tween20 über Nacht bei 4 °C
<b>Alexa Fluor 555 Goat anti-rat IgG (H+L)</b>	Invitrogen Darmstadt	#A21434	1:500 in PBS + 1 %BSA + 0,1 % Tween20 bei 1,5 h RT

## 2.1.5 Geräte

**Tabelle 5:** Geräte (verwendet am UKE in Hamburg)

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Autoklav (Evo® 45)</b>	Mediatech, Norderstedt, DE
<b>Blot-Kammer (Criterion Precast)</b>	Bio-Rad, München, DE
<b>Brutschrank (BB 16 CU)</b>	Heraeus®, Hanau, DE
<b>Eismaschine (FM-120DE-50)</b>	Hoshizaki, Amsterdam, NE
<b>Eppendorf BioPhotometer®</b>	Eppendorf, Hamburg, DE
<b>Flüssigkeits-Absaugsystem BVC 1</b>	Vakuumbrand, Wertheim, DE
<b>Heizblock (Thermostat 5320)</b>	Eppendorf, Hamburg, DE
<b>Kamerasystem</b>	Axio Cam M Rm, Zeiss, Göttingen
<b>Laborschüttler</b>	Edmund Bühler GmbH, DE
<b>Magnetrührer (Ikamag™ Ret)</b>	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, DE

<b>Mikroskop (Carl Zeiss™ Axiovert 40 CFL)</b>	Carl Zeiss Microscopy GmbH, DE
<b>Odyssey® CLX Imaging System</b>	Li-cor® Biosciences, USA
<b>Pipetten (Eppendorf® Research® plus) (0,5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL)</b>	Eppendorf, Hamburg, DE
<b>Pipettierhilfe (Pipetboy Acu 2)</b>	Integra Biosciences, Zizers, CHE
<b>Präzisionswaage (PCB)</b>	Kern & Sohn GmbH, DE
<b>Reinstwasseranlage Milli-Q® Advantage</b>	Millipore, Schwalbach am Taunus, DE
<b>Röntgenröhre RS225</b>	Gulmay Medical, Krefeld, DE
<b>Sterile Werkbank (HeraSafe®)</b>	Heraeus®, Hanau, DE
<b>Spritzenvorsatzfilter 0.22µm CM Membran</b>	Merck Labor und ChemieVertrieb, Bruchsal, Artikel N° 5122110
<b>Tischzentrifuge (Sprout® Mini-Zentrifuge)</b>	Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA
<b>Trans-Blot Turbo Transfer System</b>	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
<b>Vakuumpumpe (Oerlikon Leybold Vacuum)</b>	Leybold GmbH, Pfäffikon, CHE
<b>Vortexer (Vortex-Genie® 2)</b>	Scientific Industries, Bohemia, USA
<b>Waage</b>	AE 160, Mettler Toledo, Giessen
<b>Wärmeschrank (Modell 400)</b>	Memmert, Schwabach, DE
<b>Wasserbad (Wd19/D3)</b>	Thermo Haake GmbH, Karlsruhe, DE



<b>Zellzähler (Coulter Counter Z2™)</b>	Beckmann Coulter™, Krefeld, DE
<b>Zentrifuge (Mega Star 3.0 / 3.0R)</b>	Avantor®, VWR International GmbH, DE
<b>Zellschaber</b>	Cornig Incorporated, Mexiko

## 2.1.6 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 6:** Verbrauchsmaterialien (verwendet am UKE in Hamburg)

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Coulter-Counter Gefäß (25 ml)</b>	Beckmann Coulter™, Krefeld, DE
<b>Criterion™ Tris-HCL Gel, 4-15 %</b>	Bio-Rad Laboratories, München, DE
<b>Eppendorf Safe Lock Tubes (2 ml)</b>	Eppendorf, Hamburg, DE
<b>Erlenmeyerkolben (1000 ml, 2000 ml)</b>	Carl Roth GmbH, DE
<b>Handschuhe, Nitril, Gr. S</b>	Ansell, Yarra City, AUS
<b>Kulturflaschen (T-25, T-75)</b>	Sarstedt, Nümbrecht, DE
<b>Messzylinder (250 ml, 500 ml)</b>	Carl Roth GmbH, DE
<b>Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1250 µl)</b>	Greiner Bio One, Kremsmünster, AUT
<b>Safeguard™ Filter Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)</b>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
<b>Schraubröhre (50 ml)</b>	Sarstedt, Nümbrecht, DE

<b>Serologische Pipette, steril (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)</b>	Sarstedt, Nümbrecht, DE
<b>Reaktionsgefäß (1,5 ml, 15 ml)</b>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
<b>Uvette® (220 - 1600 nm)</b>	Eppendorf, Hamburg, DE
<b>Zellkulturplatten (6-Well, 12-Well)</b>	Sarstedt, Nümbrecht, DE

### 2.1.7 Computersoftware

**Tabelle 7:** Computersoftware

<b>Computersoftware</b>	<b>Hersteller</b>
<b>GraphPad Prism 5.0</b>	GraphPad Software, San Diego (USA)
<b>ImageJ 1.42q</b>	National Institutes of Health, Maryland (USA)
<b>Olympus Soft Imaging Solution</b>	Olympus Imaging-Software (Germany)
<b>Windows Microsoft Excel 2007</b>	Microsoft Office Excel 2007, Redmond (USA)

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultivierung**

Zunächst erfolgte die Herstellung des Nährmediums der adhären, exponentiell wachsenden Zellklone mit Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FKS). Beschriftete 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen (T-25) wurden mit jeweils 5 ml Nährmedium gefüllt und mit ca.  $1,0 \times 10^5$  Zellen pro Flasche besät. Anschließend wurden die Zellklone bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und hoher Luftfeuchtigkeit im Inkubator bis zur Verwendung im Rahmen von in vitro Experimenten oder Passagierung in Kultur gehalten. Bei der Bedeckung von 70-80% des Flaschenbodens mit Zellen konnte eine optimale Konfluenz beobachtet werden. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wurde zunächst das vorhandene Medium in den Kulturflaschen unter sterilen Bedingungen abgesaugt und der Zellrasen mit vorgewärmter phosphatgepufferter Salzlösung (1x Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, PBS) gewaschen. Um die adhären Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen und in Suspension zu bringen, erfolgte die Zugabe von 1-2 ml Trypsin-EDTA Lösung. Hierdurch kommt es zur Spaltung extrazellulärer Proteine durch Endopeptidasen im Trypsin. Nach einer 2-5-minütigen Inkubation bei 37° wurde das vollständige Ablösen der Zellen mikroskopisch beurteilt. Anschließend wurden die Zellen mit frischem Nährmedium resuspendiert, quantifiziert und in verschiedener Verdünnung zur Fortsetzung der Kultivierung in neue Flaschen überführt.

Um bei zu dichtem Zellwachstum Kontaktinhibitionen mit konsekutiver Proliferationshemmung der Zellen zu vermeiden, wurden die Kulturen bei einer Konfluenz von >80% auf weitere Kulturflaschen aufgeteilt und subkultiviert. Die Passagierung der Zellen erfolgte danach ein bis zwei Mal wöchentlich.

### **2.2.2 Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit einem Zellzähler (Coulter Counter Z2™) der Firma Beckmann Coulter™. Nach dem Ablösen der kultivierten Zellen vom Flaschenboden wurden die zu quantifizierenden Zellen mit 5 ml Nährmedium suspendiert und in 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Hieraus wurden 200 µl Zellsuspension pro Reaktionsgefäß entnommen und in ein spezielles 25 ml Zählgefäß pipettiert. Nach Zugabe von ca. 10 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (Coulter ISOTON™ II Diluent) erfolgte die Aspiration der Zellsuspension durch den Zellzähler mit anschließender Angabe von Zellzahl, Zellkonzentration pro ml und

Zellgrößenverteilungen. Da somit die Konzentration lebender Zellen pro ml in der Ausgangssuspension bekannt war, konnten je nach Bedarf entsprechende Verdünnungen angesetzt oder das Zellwachstum dokumentiert werden.

## **2.2.3 Erzeugung von DNA-Schäden**

### **2.2.3.1 PARP-Inhibition mit Olaparib**

PARP1 ist ein Enzym, welches eine zentrale Rolle für die Reparatur von DNA Einzelstrangbrüchen (ESB) spielt. Olaparib hemmt die ESB-Reparatur, indem es die Dissoziation von PARP1 von der Replikationsgabel verhindert und somit die Bindungsstellen für Basenexzisionsreparatur-Enzyme (BER) blockiert (Bochum et al., 2018). Durch die Kollision von Replikationsgabeln mit ESB entstehen ein-endige DSB, welche über die HR repariert werden. Bei HR-Defekten können PARP1-Inhibitoren hier den Effekt einer synthetischen Letalität erzielen (Bochum et al., 2018). Für die Zubereitung der Stammlösung (10 mM) wurden 5 mg Olaparib mit 1,15 ml DMSO versetzt und bei -80°C aufbewahrt. Im Rahmen der Experimente wurde die Stammlösung 1:100 mit DMSO verdünnt (100 µM).

### **2.2.3.2 CHK1-Inhibition mit MK8776**

MK8776 ist ein spezifischer Inhibitor der Intra-S-Phase Kinase Checkpoint-Kinase (CHK1). Das Mediatorprotein der DNA-Schadensantwort CHK1 aktiviert Zellzyklus-Checkpoints in der S-Phase, stabilisiert Replikationsgabeln und fördert Reparaturwege wie die HR (Schulz et al., 2019; Sørensen et al., 2005). Die Stammlösung des Inhibitors (2 mM) wurde mit 5 mg MK8776 in 5,7 ml DMSO hergestellt und anschließend für die Versuche 1:10 in DMSO verdünnt.

### **2.2.3.3 ATR-Inhibition mit VE-821**

VE-821 ist ein *small molecule* Inhibitor der S-Phase Kinase ATR. Es wird durch Replikationsprotein A (RPA) gebundene, einzelsträngige DNA aktiviert und phosphoryliert die Intra-S-Phase Kinase CHK1. Die Stammlösung des Inhibitors (10 mM) wurde in DMSO hergestellt und anschließend für die Versuche 1:100 in DMSO verdünnt.

#### **2.2.3.4 ATM Inhibition mit KU-55933**

Die Checkpoint-Kinase Ataxia telangiectasia-mutated (ATM) spielt eine Schlüsselrolle bei der Auslösung der DDR nach DSB. KU-55933 ist ein ATM-Inhibitor, der die Zellproliferation unterdrückt und Apoptose durch Blockierung von Akt in Krebszellen mit überaktiviertem Akt auslöst. Die Stammlösung des Inhibitors (0,1 mM) wurde in DMSO hergestellt und anschließend für die Versuche 1:100 in DMSO verdünnt.

#### **2.2.3.5 DNAPKcs Inhibition mit NU-7441**

KU-57788 (NU7441) ist ein hochwirksamer und selektiver DNA-PKcs-Inhibitor der den Weg des NHEJ hemmt. Die Stammlösung des Inhibitors (0,1 mM) wurde in DMSO hergestellt und anschließend für die Versuche 1:200 in DMSO verdünnt.

#### **2.2.3.6 Ionisierende Strahlung**

Die biologische Wirkung ionisierender Strahlen resultiert in DNA-Schäden. 1 Gy ionisierende Strahlung induziert bis zu 4000 DNA-Basenschäden, 1000 Einzelstrangbrüche und bis zu 40 DSB (Borrego-Soto et al., 2015). Die Bestrahlung erfolgte mit einer technischen Gulmay-Medical Röntgenröhre (RS225) bei einem Röhrenstrom von 15 mA, einer Röhrenspannung von 200 kV bei Raumtemperatur. Zur Aufhärtung der Strahlen wurde ein 0,5 mm starker Kupferfilter und ein 0,8 mm starker Berylliumfilter verwendet. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte bei einem Tischabstand von 266 mm zur Strahlungsquelle und einer Dosisrate von 2 Gy/min. Im Rahmen von Koloniebildungstests sowie Fiber Assays wurden die Zellen entsprechend der Dosisleistung und gewünschter Strahlendosis 1-3 min bestrahlt.

### **2.2.4 Analyse des zellulären Überlebens im Kolloniebildungsassay**

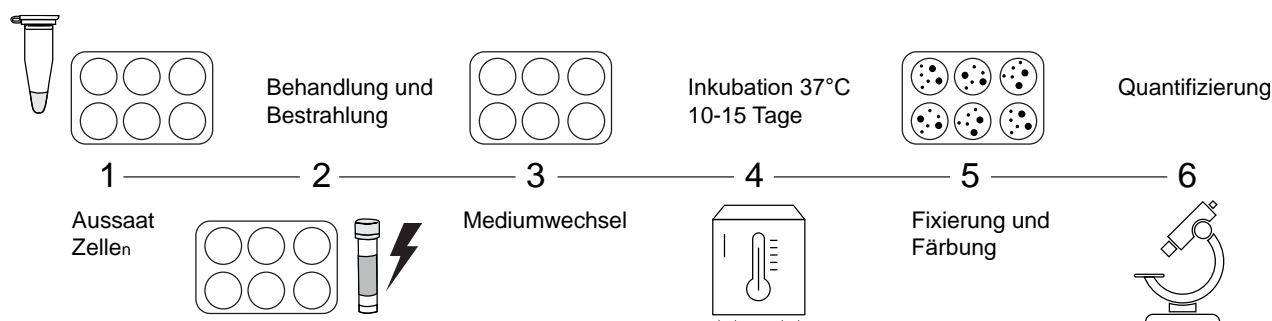
#### **2.2.4.1 Behandlung, Fixierung und Färbung**

Mit dem Koloniebildungsassay wurde das klonogene Überleben der Zellen nach verschiedenen DNA-Schädigungen ermittelt. Die DNA-Schädigungen erfolgten mittels ionisierender Bestrahlung und paralleler PARP1-Inhibition mit Olaparib, CHK1 Inhibition mit MK8776, ATR-Inhibition mit VE-821, ATM Inhibition mit KU55933 und mit DNAPKcs Inhibition mit NU7441 für folgende 4 Zelllinien:

- MCF7
- MCF7 RR
- MDA-231-MB
- MDA-231-MB RR

Als Kontrollen dienten gänzlich unbehandelte Zellen und Zellen, die ohne parallele Beimpfung bestrahlt wurden. Zunächst wurden 250 Zellen in jeweils eine Vertiefung der 6-Loch Zellkulturplatten in je 1,5 ml Nährmedium ausgelegt und über Nacht bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte bei der Hälfte der Zellkulturplatten die Behandlung mit 2µM Olaparib aus einer zuvor erstellten 100µM Stocklösung (1:100, 10 mM Stocklösung in DMSO), 2µM MK8776 aus einer zuvor erstellten 200µM Stocklösung (1:10, 2 mM Stocklösung in DMSO), 1µM VE-821 aus einer zuvor erstellten 100µM Stocklösung (1:100, 10mM Stocklösung in DMSO), 0,5µM NU7441 (1:200, Stocklösung 0,1 mM in DMSO) und 1µM KU55933 (1:100, 0,1 mM Stocklösung)

Nach 2-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit 2, 4 oder 6 Gy bestrahlt. Nach 24, 48 bzw. 72 Stunden wurden die unbehandelten und behandelten Zellkulturplatten aus dem Brutschrank entnommen, das alte Nährmedium abgesaugt, die Zellen vorsichtig 1x mit PBS gespült und erneut mit 1,5 ml frischem Nährmedium versetzt. Anschließend wurden die Zellen für 10-15 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. In dieser Zeit bildeten sich aus den überlebenden Zellen Kolonien auf dem Boden der Kulturplatten. Das Wachstum der Zellkolonien wurde ca. alle 3 Tage mikroskopisch kontrolliert. Nach 10-15 Tagen wurde das Nährmedium verworfen und die Zellen auf dem Boden der Zellkulturplatten für ca. 5 min mit 70%-igem Ethanol fixiert und einige Stunden getrocknet. Anschließend erfolgte die Färbung mit 0,1%igem Kristallviolett für ca. 5 min. Das Kristallviolett wurde dann entfernt, überschüssige Kristallviolett-Reste mit Leitungswasser vorsichtig abgewaschen und die Zellkulturplatten erneut getrocknet.



**Abbildung 2.1: Ablauf des Koloniebildungstests**

250 Zellen wurden in jeweils eine Vertiefung der 6-Loch Zellkulturplatten in je 1,5 ml Nährmedium inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte bei der Hälfte der Zellkulturplatten die Behandlung mit den jeweiligen Inhibitoren. Die Zellen wurden mit 2, 4 oder 6 Gy bestrahlt und nach 24, 48 bzw. 72 Stunden mit frischem Medium versetzt. Nach 10-15 Tagen wurde das Nährmedium verworfen und die Zellen auf dem Boden der Zellkulturplatten für ca. 5 min mit 70%-igem Ethanol fixiert und einige Stunden getrocknet. Anschließend erfolgte die Färbung mit 0,1%igem Kristallviolett und die Quantifizierung der Kolonien mit mehr als 50 Zellen.

### 2.2.4.2 Quantitative Auswertung des Zellüberlebens

Die Koloniebildung wurde mithilfe eines Lampentisches und mikroskopisch per Auge analysiert. Hierbei wurden Kolonien, die mehr als 50 Zellen enthielten, quantifiziert. Um die Koloniebildungsfähigkeit bei unterschiedlichen Behandlungspunkten auszuwerten, wurde die Anwachsrate (Plattierungseffizienz oder Klonogenität, engl. *plating-efficiency*, PE) der Zellen bestimmt.

$$\text{Plattierungseffizienz (PE)} = \frac{\text{Anzahl der Kolonien}}{\text{Zahl der eingesetzten Zellen}}$$

Um das Überleben (engl. *surviving-fraction*, SF) der Zellklone zu bestimmen, wurde die Plattierungseffizienz auf die unbehandelte Kontrolle normiert.

$$\text{Überleben (SF)} = \frac{\text{Plattierungseffizienz (PE)}}{\text{Plattierungseffizienz (PE) unbehandelter Zellen}}$$

### 2.2.5 DNA Fibre Assay

Der DNA Fibre Assay ermöglicht eine genaue Analyse von Initiation, Elongation und Termination der DNA-Replikation. Replizierte DNA kann mithilfe der Thymidinanaloga 5-Chloro-2'-desoxyuridine (CldU) und 5-Iodo-2'-desoxyuridine (IdU) nachgewiesen werden. Die Thymidinanaloga werden der Zelle über das Medium angeboten, in der Synthesephase anstelle der Base Thymidin eingebaut und im Anschluss mit Fluoreszenz-Antikörpern detektiert.

Der Fiber Assay wurde für jede der folgenden 6 Zelllinien mit 2  $\mu\text{M}$  Olaparib bzw 2  $\mu\text{M}$  VE-821 aus einer zuvor erstellten 100  $\mu\text{M}$  Stocklösung (1:100, 10 mM Stocklösung in DMSO) durchgeführt:

- MCF7
- MCF7 RR
- MCF7 RR ALDH1+
  
- MDA-231-MB
- MDA-231-MB RR
- MDA-231-MB RR ALDH1+

Die Zellen wurden hierfür zunächst für 2 Stunden mit einem der Inhibitoren behandelt, und danach 30 Minuten mit 0,025 mM CldU-haltigem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen jeweils mit 6 Gy bestrahlt, dann wurde das CldU-haltige Medium abgenommen und die Zellen für 30 Minuten mit dem 0,25 mM IdU-haltigen Medium inkubiert.

Als Kontrolle dienten jeweils unbestrahlte Zellen jeder Zelllinie. Nach Abnahme des IdU-haltigen Mediums und Überführung in eiskaltes PBS wurden die Zellen mit einem Zellschaber geerntet, auf einen Objektträger übertragen und mithilfe eines Spreading Puffers, der die Zellen zum Platzen bringt und somit die Verteilung der DNA-Stränge ermöglicht, auf dem Objektträger ausgespreizt und mit einer Methanol-Essigsäure-Lösung (3:1) fixiert.

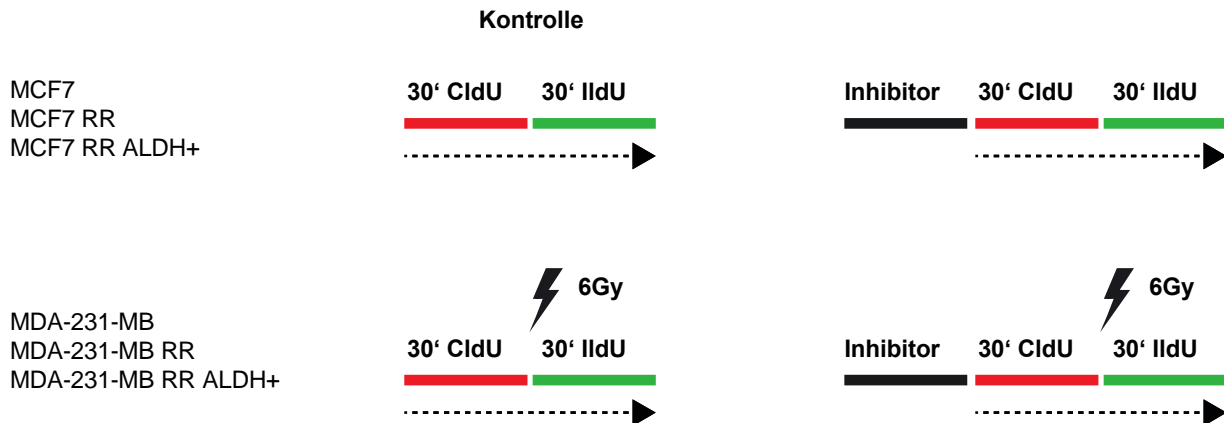
Für die Immunfärbung der Chromatinfasern wurde die DNA auf dem Objektträger zunächst mit Aqua bidest. rehydriert und anschließend mit 2,5 M HCl denaturiert, um einzelsträngige DNA zu erhalten. Im Folgenden wurden nacheinander vier unterschiedliche Antikörper verwendet, um die DNA zu detektieren. Für die Detektion



der CldU-Nukleotide wurde ein primärer, monoklonaler Antikörper, antiBrdU, aus der Ratte verwendet, der mit 4%-iger Paraformaldehydlösung fixiert wurde und anschließend mit dem sekundären Fluoreszenz-Antikörper anti-rat Alexa Fluor 555 detektiert wurde. Die Detektion der IdU-Nukleotide erfolgte mit einem primären, monoklonalen anti-BrdU aus der Maus, der analog mit dem sekundären Fluoreszenz-Antikörper anti-mouse Alexa Fluor 488 detektiert wurde.

Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte in einer feuchten, abgedunkelten Kammer und ab der Zugabe des zweiten Antikörpers unter Ausschluss direkten Lichteinfalls. Zwischen den einzelnen Antikörperzugaben wurde die DNA stets mit PBS und einer Blockierlösung gewaschen. Abschließend wurden die Objektträger mit dem Eindeckmittel „Vectashield mounting“ -Medium versehen und die daraufhin aufgelegten Deckgläschen mit Nagellack versiegelt.

Mit dem Mikroskop Axiovision Observer 21 (Zeiss) und den Filtersätzen 43 (für die Detektion des sekundären Fluoreszenz-Antikörper anti-rat Alexa Fluor 555) und 38 (für die Detektion des sekundären Fluoreszenz-Antikörper anti-mouse Alexa Fluor 488) wurden unter Ölimmersion bei 400-facher Vergrößerung die fluoreszenzmarkierten DNA-Stränge sichtbar gemacht. Mit der Kamera AxioCam MRm wurden daraufhin Bildaufnahmen der DNA-Strukturen erstellt, die mithilfe des Programms ImageJ ausgewertet wurden. ImageJ ermöglicht es, mit dem Instrument „Segmented lines“ die Länge der einzelnen DNA-Stränge zu messen. Die Länge der Chromatinfasern wurde jeweils mit dem spezifischen Umrechnungsfaktor 9,8 (der relative Wert der 9,8 bei Image J entspricht 1  $\mu\text{m}$  Chromatinfaser) in  $\mu\text{m}$  umgerechnet, der in der Dissertation von Dr. Ann Parplys ermittelt wurde. Zur weiteren Auswertung wurden die ermittelten Werte in eine Excel-Tabelle überführt. Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism5.

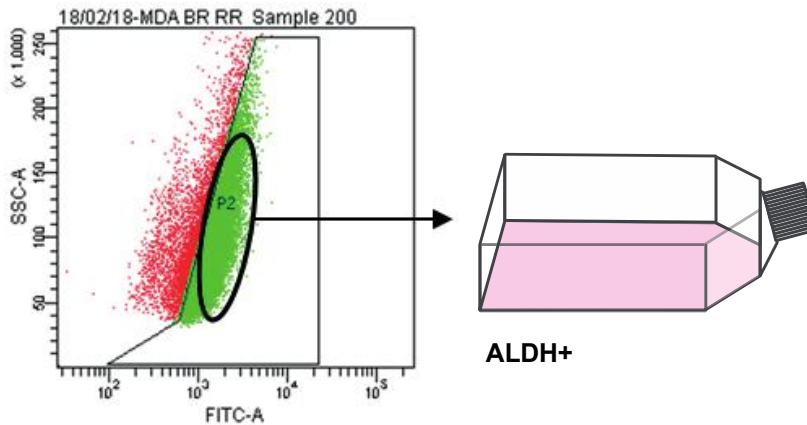


**Abbildung 2.2: Schematische Darstellung vom Markierungsprotokoll des DNA-Fiber Assay**

Exponentiell wachsende Zellen wurden hierfür zunächst für 2 Stunden mit einem der Inhibitoren behandelt, und danach 30 Minuten mit 0,025 mM CldU-haltigem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen jeweils mit 6 Gy bestrahlt, dann wurde das CldU-haltige Medium abgenommen und die Zellen für 30 Minuten mit dem 0,25 mM IdU-haltigen Medium inkubiert. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte und unbestrahlte Zellen jeder Zelllinie.

### 2.2.6 ALDEFLUOR™-Assay

Zellen wurden geerntet, in PBS gewaschen und für 45 Minuten bei 37°C mit ALDEFLUOR™-Reagenz (StemCell Technologies, Grenoble Frankreich) inkubiert. Inzwischen wurden 5 µl Diethylaminobenzaldehyd (DEAB), ein spezifischer ALDH1-Inhibitor, zu den mit ALDEFLUOR™ gefärbten Zellen als negative Kontrolle hinzugefügt. Die ALDH1-positiven Zellen wurden dann mittels Durchflusszytometrie detektiert und isoliert. Anschließend wurden die ALDH1-positiven Zellen für maximal 10 Tage kultiviert.



**Abbildung 2.3: Sortierung der Zellen mittels Aldeflour im Durchflusszytometer**

Die ALDH1-positiven Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie detektiert und isoliert. Anschließend wurden die ALDH1-positiven Zellen für maximal 10 Tage kultiviert.

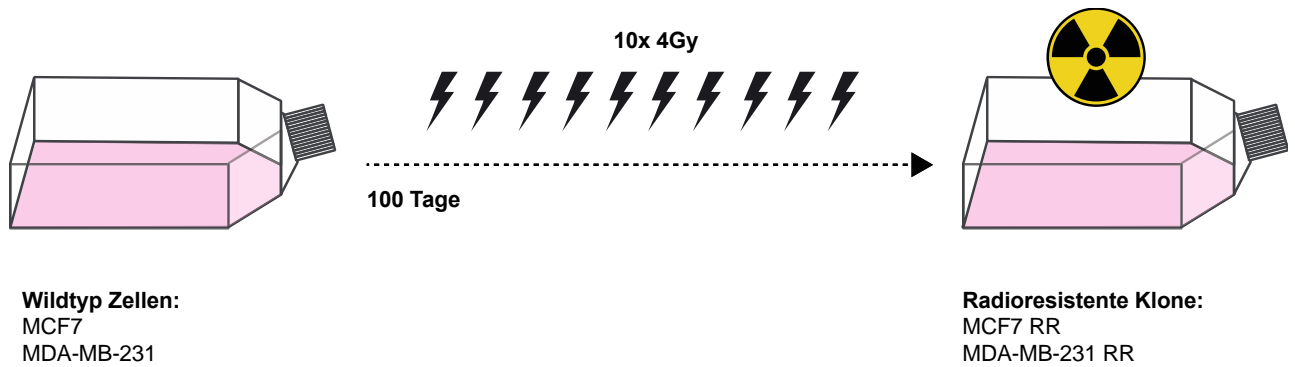
## 2.2.7 Statistik und Auswertung

Die statistischen Analysen und graphische Darstellungen gewonnener Daten erfolgten mit Graphpad Prism (Version 9.1.2). Die P-Werte wurden auf Basis des ungepaarten studentischen t-Tests ermittelt (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

## 2.2.8 Methodische Vorarbeiten

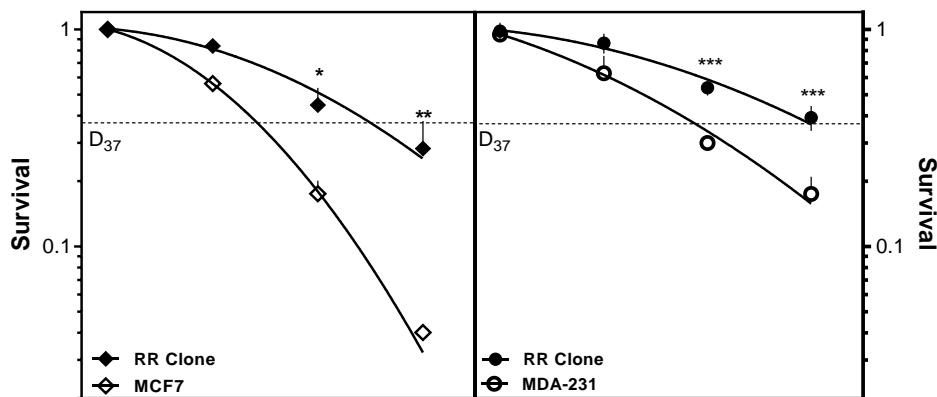
### 2.2.8.1 Etablierung der strahlenresistenten Klone

Es wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in T25 Zellkulturflaschen ausgelegt und diese über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 4 Gy Röntgenstrahlung (200 kV, 1,2 Gy/min) bei Raumtemperatur bestrahlt, die überlebenden Zellen zusammengeführt, 10-14 Tage lang kultiviert und erneut bestrahlt. Dieser Vorgang wurde 10 Mal bis zu einer Gesamtdosis von 40 Gy wiederholt. Die Strahlensensitivität wurde 14 und 42 Tage nach der letzten Bestrahlung überprüft.



**Abbildung 2.4: Schema der Generierung strahlenresistenter Klone**

Exponentiell wachsende MDA-MB-231 und MCF7 Zellen wurden mit 4Gy bestrahlt, überlebende Zellen zusammengeführt, für 10-14 Tage kultiviert und erneut bestrahlt. Dies wurde insgesamt zehnmal wiederholt. Die Strahlenempfindlichkeit wurde jeweils 14 und 42 Tage nach der letzten Fraktion mittels Koloniebildungsassay überprüft.



**Abbildung 2.5: Zelluläres Überleben der Wildtypzellen im Vergleich zu den RR-Klonen**

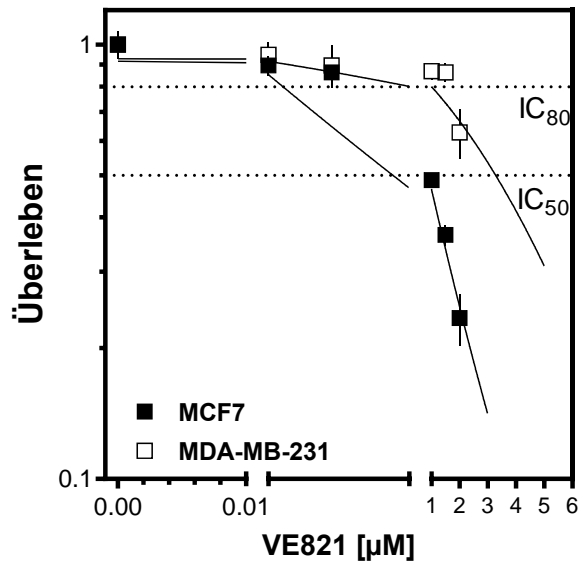
Exponentiell wachsende Zellen wurden ausplattiert, bestrahlt und nach 14 Tagen fixiert, gefärbt und die Zahl der Kolonien bestimmt. Dargestellt ist das zelluläre Überleben mit ansteigender Dosis aus sechsfach Bestimmungen dreier unabhängiger Experimente. Zur Normierung diente die unbestrahlte Kontrolle. Fehler sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Statistisch signifikante Abweichungen: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 2.2.8.2 Selektionierung von TSZ mittels Aldefluor-Assay

Aus den strahlenresistenten Klonen wurden ALDH1 positive Zellen mit Hilfe von FACS-Sorting der ALDH1-positiven Tumorstammzellen selektioniert. Die Isolation erfolgte durch ALDEFLUOR™-Assay und Cell sorting im Area Fusion (FACS Core facility, UKE).

### 2.2.8.3 Titration des Inhibitors VE 821

Für den ATR wurde eine Titration mit den Wilddtypzelllinien MCF7 und MDA-MB-231 durchgeführt, um eine sinnvolle Dosierung für die Experimente zu bestimmen. Der ATR-Inhibitor wurde daraufhin mit 1  $\mu\text{M}$  im Kononietest bzw. 2  $\mu\text{M}$  im Fiber dosiert. Für alle anderen Inhibitoren langen bereits Daten aus vorherigen Experimenten vor.



**Abbildung 2.6: Titrations des ATR-Inhibitors**

Die Zellen der Wildtyp Zellen der MCF7 und der MDA-MB-231 wurden plattiert, mit dem Inhibitor (VE-821) in zunehmender Dosierung für 24 bzw. 72 Std inkubiert, fixiert, gefärbt und nach 10-15 Tagen die Kolonien quantifiziert. Dargestellt ist das zelluläre Überleben mit ansteigender Inhibitor-dosis der Zellklone.

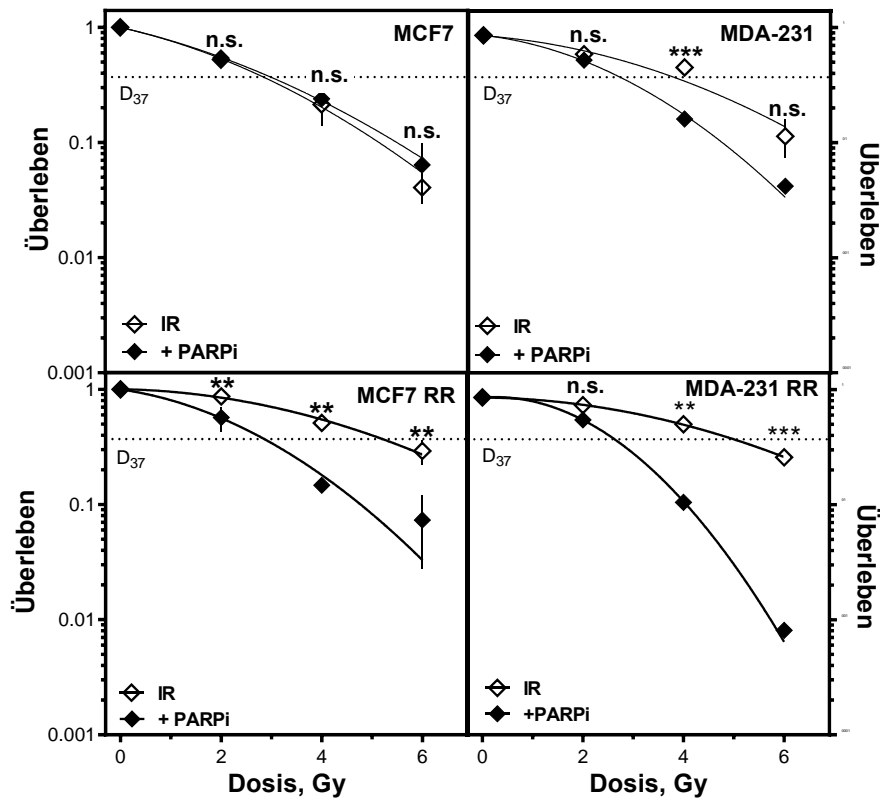
### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Einfluss der Faktoren der DNA-Schadensantwort und DNA-Reparatur auf die Strahlenresistenz in Tumorstammzellen**

TSZ sind eine der Ursachen für das Versagen der Tumortherapie. Ihre erhöhte Strahlenresistenz wird hauptsächlich auf eine verstärkte Aktivierung der DNA-Schadensantwort mit effektiveren DNA-Reparaturprozessen zurückgeführt (Schulz et al., 2019; Meyer et al., 2020). Nach Bestrahlung wurde eine starke Aktivierung der Serin/Threonin Kinasen ATM und ATR sowie ihrer Downstream Checkpoint-Kinasen, CHK1 und CHK2, in TSZ des Glioblastoms beobachtet. Des Weiteren wurde in TSZ verschiedener Tumorentitäten nach DNA-Schädigungen eine erhöhte Aktivität der HR, des NHEJ, der BER und weiteren DNA Reparaturwegen beschrieben (Schulz et al., 2019). Unklar ist, durch welche Inhibitoren der DNA-Schadensantwort TSZ des Brustkrebses sensibilisiert werden können und welchen Einfluss die Beeinträchtigung von DNA-Replikationsprozessen für diese Sensibilisierung hat. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde ein bereits etabliertes Zellsystem, bestehend aus zwei Brustkrebszelllinien, daraus hergestellten strahlenresistenten Klonen mit stark erhöhtem TSZ-Anteil und daraus isolierten ALDH1-positiven TSZ eingesetzt.

#### **3.2 Bestimmung der Strahlensensibilisierung nach Inhibition strahlenresistenzvermittelnder Faktoren**

Um spezifisch strahlenresistenzvermittelnde Signalwege der DNA-Schadensantwort und DNA-Reparaturwege in TSZ des Mammakarzinoms zu identifizieren, wurden diese in einem ersten Schritt inhibiert und die Auswirkungen auf die Strahlenempfindlichkeit anhand des zellulären Überlebens im Kolonietest überprüft. Dabei war von besonderem Interesse, wie sich die Inhibition auf die Strahlenempfindlichkeit der strahlenresistenten Klone, die einen im Vergleich zu den WT-Zellen deutlich gesteigerten Anteil ALDH1-positiver TSZ aufwiesen, auswirkt. Inhibiert wurden ATM, die wichtigste Kinase der DNA-DSB Erkennung, ATR, die bedeutendste Kinase der S-Phase für die Erkennung einzelsträngiger DNA, die Intra-S-Phase Kinase CHK1, DNA-PKcs, als wichtigste Kinase des NHEJ und PARP1, ein essenzieller Faktor der Basenexcisionsreparatur.



**Abb. 3.1: Zelluläres Überleben nach Bestrahlung in Kombination mit Olaparib**  
 Exponentiell wachsende Zellen wurden ausplattiert, für 2h mit mit 2 µm Olaparib behandelt, bestrahlt (2, 4 und 6 Gy), fixiert, gefärbt und nach 10-15 Tagen die Kolonien quantifiziert. Dargestellt ist das zelluläre Überleben mit ansteigender Strahlendosis aus sechsfach-Bestimmungen dreier unabhängiger Experimente. Zur Normierung diente die unbestrahlte Kontrolle. Fehler sind Mittelwerte ± SEM. Statistisch signifikante Abweichungen: n.s., nicht signifikant; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001 (Student's t-test).

Abbildung 3.1 zeigt das zelluläre Überleben nach alleiniger Bestrahlung und Bestrahlung in Kombination mit dem PARP1-Inhibitor Olaparib. Die beiden WT-Zelllinien zeigten keine einheitliche Veränderung der Strahlenempfindlichkeit.

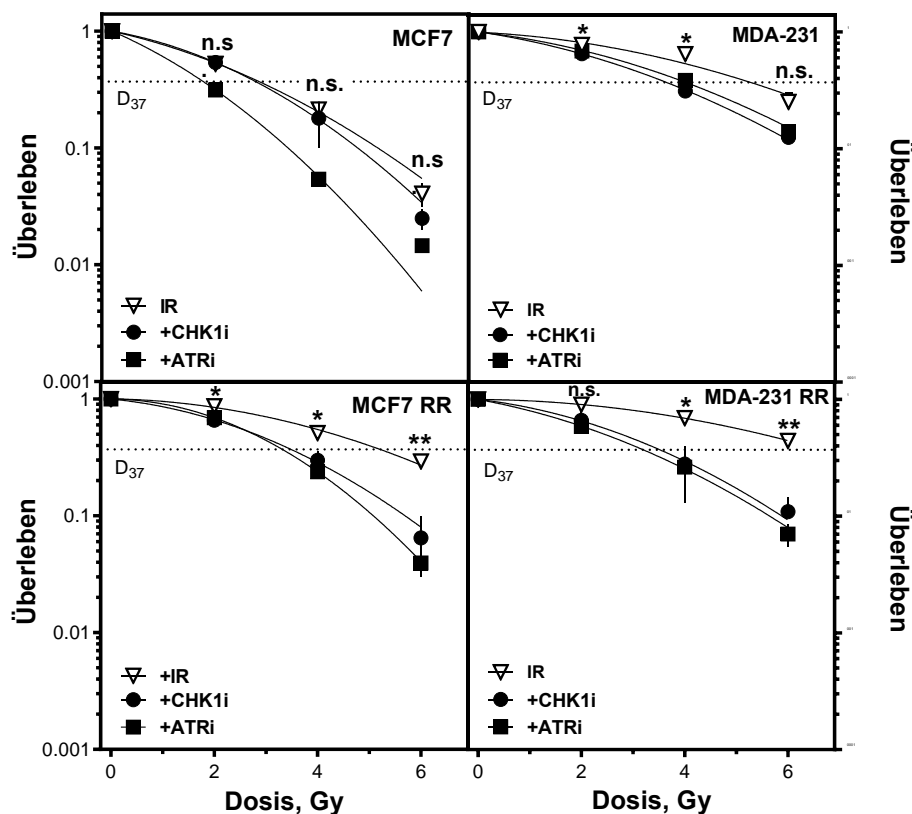
Die MCF7 zeigte keine Veränderung der  $D_{37}$  durch den Einsatz von Olaparib. Diese betrug sowohl nach alleiniger Bestrahlung als auch nach Bestrahlung in Kombination mit Olaparib  $3,1 \pm 0,1$ Gy.

Bei der MDA-MB-231 verringerte sich die  $D_{37}$  durch den Einsatz von Olaparib von  $4 \pm 0,1$ Gy auf  $2,5 \pm 0,1$ Gy mit signifikanten Unterschieden bei 4Gy mit  $p < 0,001$ .

Die strahlenresistenten Klone zeigten eine deutlich stärkere Strahlensensibilisierung durch den Einsatz von Olaparib:

In der MCF7 RR verringerte sich die  $D_{37}$  von  $5,2 \pm 0,2$  Gy auf  $2,9 \pm 0,1$  Gy mit signifikanten Unterschieden in allen Dosispunkten,  $p < 0,01$ .

Die MDA-MB-231 RR zeigte eine vergleichbare Sensitivierung: hier verringerte sich die  $D_{37}$  durch Olaparib von  $5,2 \pm 0,3$  Gy auf  $2,8 \pm 0,1$  Gy mit signifikanten Unterschieden bei 4 Gy und 6 Gy,  $p < 0,01$  und  $p < 0,001$ .



**Abb. 3.2: Zelluläres Überleben nach Bestrahlung kombiniert mit CHK1- oder ATR-Inhibition**

Exponentiell wachsende Zellen wurden ausplattiert, für 2h mit mit  $2 \mu\text{m}$  mit MK8776 bzw.  $1 \mu\text{m}$  VE821 behandelt, bestrahlt (2, 4 und 6 Gy), fixiert, gefärbt und nach 10-15 Tagen die Kolonien quantifiziert. Dargestellt ist das zelluläre Überleben mit ansteigender Strahlendosis aus sechsfach-Bestimmungen dreier unabhängiger Experimente. Zur Normierung diente die unbestrahlte Kontrolle. Fehler sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Statistisch signifikante Abweichungen: n.s., nicht signifikant; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  (Student's t-test).



Abbildung 3.2 zeigt das zelluläre Überleben nach alleiniger Bestrahlung und Bestrahlung in Kombination mit dem CHK1 Inhibitor MK8776 bzw. dem ATR Inhibitor VE821. Die beiden Wildtyp Zelllinien zeigten auch hier keine einheitliche Veränderung der Strahlenempfindlichkeit.

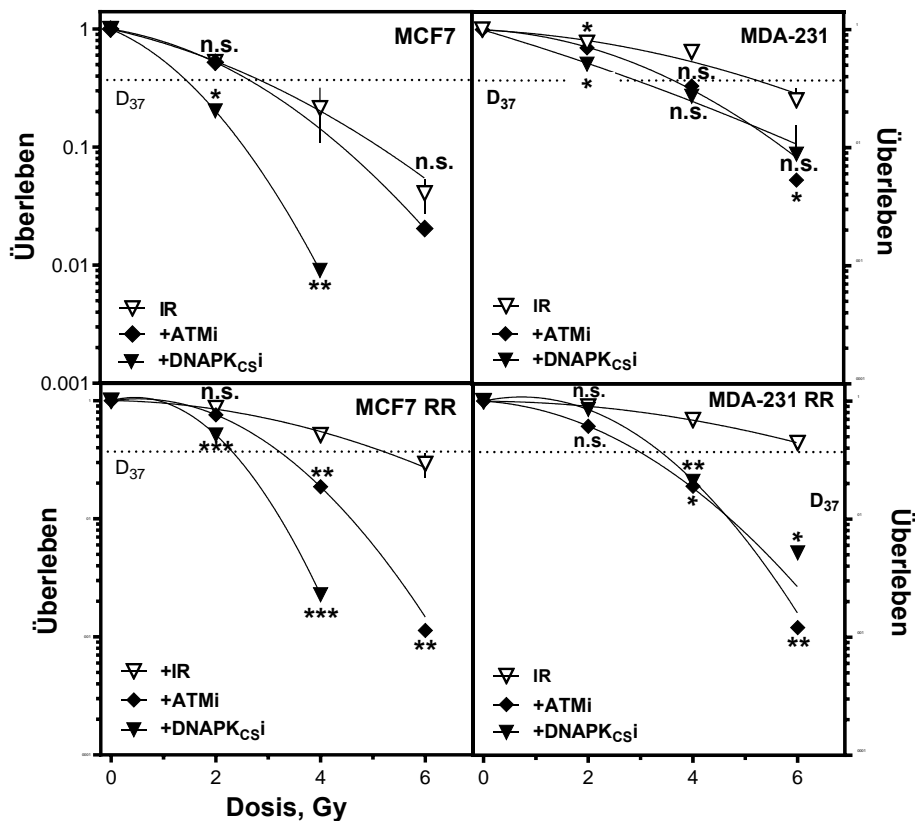
Die MCF7 zeigte keine eindeutige Veränderung der  $D_{37}$  durch den Einsatz des CHK1 Inhibitors. Diese betrug sowohl nach alleiniger Bestrahlung als auch nach Bestrahlung in Kombination mit dem CHK1 Inhibitor  $3 \pm 0,1$  Gy, während sich die  $D_{37}$  durch den Einsatz des ATR Inhibitors nicht signifikant auf  $2 \pm 0,1$  Gy verringerte.

Bei der MDA-MB-231 verringerte sich die  $D_{37}$  sowohl durch den Einsatz des CHK1 Inhibitors als auch des ATR-Inhibitors signifikant von  $5,1 \pm 0,1$  Gy auf  $3,9 \pm 0,1$  Gy bzw.  $4,1 \pm 0,1$  Gy mit  $p < 0,05$ .

Die strahlenresistenten Klone zeigten eine deutlich stärkere Strahlensensibilisierung durch den Einsatz der beiden Inhibitoren:

In der MCF7 RR verringerte sich die  $D_{37}$  von  $5,2 \pm 0,1$  Gy auf  $3,2 \pm 0,1$  Gy für den ATR-Inhibitor und  $3,5 \pm 0,1$  Gy für den CHK1 Inhibitor mit signifikanten Unterschieden in allen Dosispunkten mit  $p < 0,05$  bei 2 Gy und 4 Gy bzw.  $p < 0,01$  bei 6 Gy.

Die MDA-MB-231 RR zeigte eine vergleichbare Sensitivierung: Hier verringerte sich die  $D_{37}$  von  $7 \pm 0,1$  Gy mit alleiniger Bestrahlung auf  $3,9 \pm 0,1$  Gy unter Behandlung mit dem CHK1 Inhibitor in Kombination mit Bestrahlung bzw.  $3,2 \pm 0,1$  Gy unter Behandlung mit dem ATR-Inhibitor in Kombination mit Bestrahlung mit einer Signifikanz von  $p < 0,05$  bei 4 Gy und  $p < 0,01$  bei 6 Gy.



**Abb. 3.3: Zelluläres Überleben nach Bestrahlung kombiniert mit einer ATM- oder DNAPKcs Inhibition**

Exponentiell wachsende Zellen wurden ausplattiert, für 2h mit 1 µm KU55933 bzw. 0,5 µm NU7441 behandelt, bestrahlt (2, 4 und 6 Gy), fixiert, gefärbt und nach 10-15 Tagen die Kolonien quantifiziert. Dargestellt ist das zelluläre Überleben mit ansteigender Strahlendosis aus sechsfach-Bestimmungen dreier unabhängiger Experimente. Zur Normierung diente die unbestrahlte Kontrolle. Fehler sind Mittelwerte ± SEM. Statistisch signifikante Abweichungen: n.s., nicht signifikant; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001 (Student's t-test).

Abbildung 3.3 zeigt das zelluläre Überleben nach alleiniger Bestrahlung und Bestrahlung in Kombination mit dem ATM Inhibitor KU55933 bzw. dem DNAPKcs Inhibitor NU7441.

Die MCF7 zeigte eine minimale Veränderung der D<sub>37</sub> durch den Einsatz des ATM-Inhibitors. Diese betrug nach alleiniger Bestrahlung 3 ± 0,1Gy, bei der Behandlung mit dem ATM-Inhibitor in Kombination mit Bestrahlung 2,6 ± 0,1Gy. Durch den Einsatz des DNAPKcs Inhibitors verringerte sich der D<sub>37</sub> auf 1,4 ± 0,1Gy mit einer Signifikanz von p < 0,05 bei 2Gy und p < 0,01 bei 4 Gy.

Bei der MDA-MB-231 verringerte sich die  $D_{37}$  durch den Einsatz des ATM-Inhibitors von  $5,4 \pm 0,1$  Gy auf  $3,9 \pm 0,1$  Gy mit einer Signifikanz von  $p < 0,05$  für die Dosispunkte von 2 und 6 Gy. Durch den Einsatz des DNAPKcs Inhibitors verringerte sich die  $D_{37}$  auf  $3 \pm 0,1$  Gy mit einer Signifikanz von  $p < 0,05$  bei 2 Gy.

Die strahlenresistenten Klone zeigten hier wieder eine deutlich stärkere Strahlensensibilisierung durch den Einsatz der Inhibitoren:

In der MCF7 RR verringerte sich die  $D_{37}$  von  $5,2 \pm 0,1$  Gy auf  $3,4 \pm 0,1$  Gy für den ATM-Inhibitor mit  $p < 0,01$  bei einer Dosis von 4 Gy und 6 Gy. Für den DNAPKcs Inhibitor verringerte sich die  $D_{37}$  auf  $2,2 \pm 0,1$  Gy mit  $p < 0,001$  für die Dosispunkte von 2 Gy und 4 Gy.

In der MDA-MB-231 RR verringerte sich die  $D_{37}$  von  $7 \pm 0,1$  Gy mit alleiniger Bestrahlung auf  $3 \pm 0,1$  Gy bei zusätzlicher Behandlung mit dem ATM-Inhibitor mit  $p < 0,05$  für 4 Gy und  $p < 0,01$  für 6 Gy. Beim Einsatz des DNAPKcs Inhibitors verringerte sich die  $D_{37}$  auf  $3,5 \pm 0,1$  Gy mit  $p < 0,01$  für 4 Gy und  $p < 0,05$  für 6 Gy.

Insgesamt zeigte sich, dass die Inhibition von PARP1 keinen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit der MCF7 hatte, sondern tendenziell eher zu einer Strahlenresistenz im Vergleich zu nur bestrahlten Zellen führte (Abb.3.1). Da die MCF7 per se sehr strahlenempfindlich ist, zeigte sich auch nach Inhibition von ATM und CHK1 nur eine sehr geringfügige Sensitivierung (Abb.3.2+3.3). Dagegen zeigte die Inhibition von ATR eine deutlich stärkere und die DNAPKcs Inhibition die stärkste Strahlensensibilisierung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abb.3.2+3.3). Für den strahlenresistenten Klon der MCF7, MCF7 RR ergab sich ein anderes Bild. Alle Inhibitoren führten hier zu einer deutlichen Strahlensensibilisierung der Zellen im Vergleich zur Ausgangszelllinie. Am stärksten ließen sich die Zellen durch DNAPKcs sensibilisieren, gefolgt von PARPi, ATMi, CHK1i und ATRi im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abb 3.1-3.3).

Für die MDA-231 konnte festgestellt werden, dass alle Inhibitoren bereits in der Ausgangszelllinie zu einer deutlichen Strahlensensibilisierung führten. Am stärksten ließen sich diese Zellen durch Inhibition von PARP, gefolgt von DNAPKcs und ATMi und schließlich CHK1i und ATRi für Bestrahlung sensibilisieren (Abb3.1-3.3).

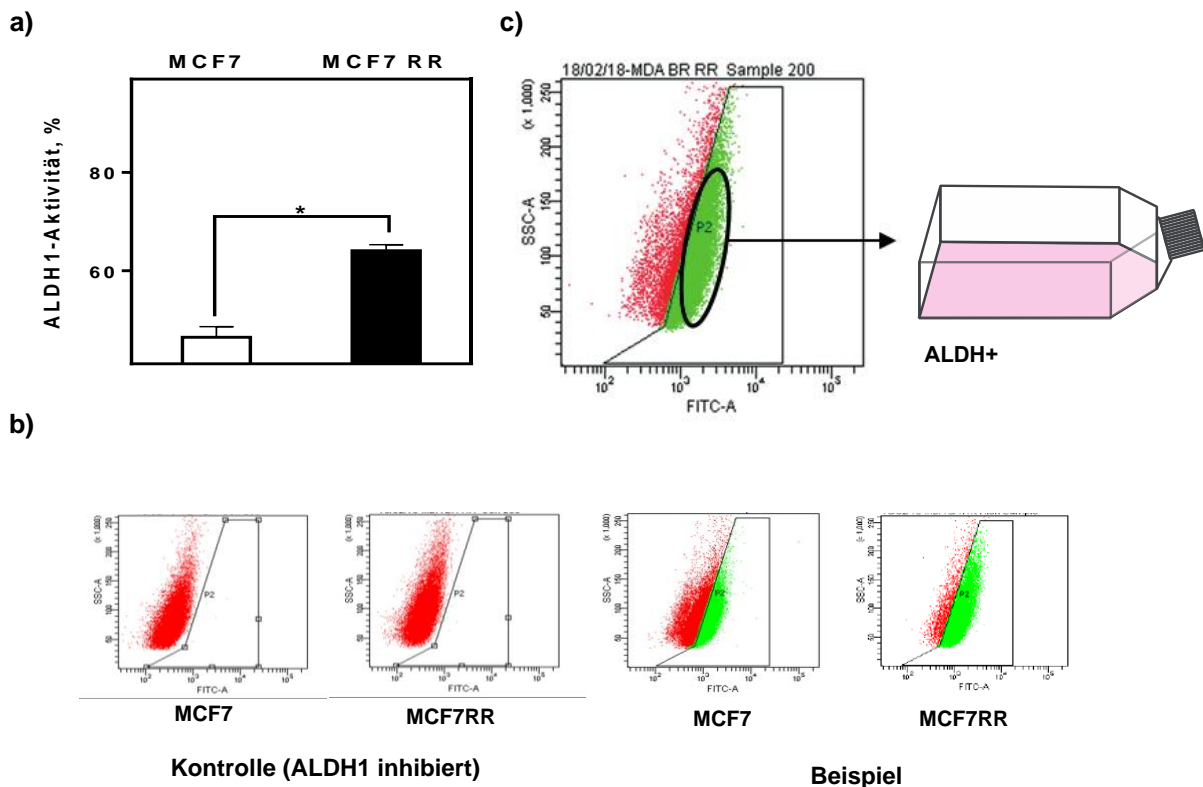
Im Vergleich zur Ausgangszelllinie ließen sich die strahlenresistenten Klone der MDA-231 Zelllinie, die MDA-MB-231 RR noch einmal deutlich stärker sensibilisieren. Am ausgeprägtesten war dies zu beobachten bei der Inhibition von PARP. Weiterhin

konnte eine Sensibilisierung durch DNA-PKcs-Inhibition, durch ATR-Inhibition und durch CHK1-Inhibition beobachtet werden (Abb 3.1-3.3).

Da TSZ DNA-Schäden vorzugsweise über die S-Phase spezifische HR reparieren, wird ihr eine besondere Bedeutung in der TSZ-bedingten Resistenz zugesprochen (Arnold et al 2020, Meyer et al 2022). Von besonderem Interesse war deshalb die Wirkung der Strahlensensibilisierung in der S-Phase, sodass das Arbeitsprogramm mit den beiden klinisch relevantesten und effektivsten S-Phase-Inhibitoren VE281 (ATRi) und Olaparib (PARPi) fortgesetzt wurde.

### **3.3 Anreicherung von TSZ und Erweiterung des Zellsystems**

Um sicherzustellen, dass die erhöhte Strahlenresistenz und HR-Kapazität und damit die Sensibilisierung für Bestrahlung durch die verwendeten Inhibitoren auf die TSZ zurückzuführen ist, wurde das Zellsystem für die weiteren Experimente um je einen Klon, MCF7 RR ALDH1+ und MDA-231-MB RR ALDH1+, erweitert. ALDH1, ist ein Marker für Brustkrebs TSZ (Ablett et al 2012). ALDH1 positive Zellen wurden mittels FACS aus den strahlenresistenten Klonen isoliert und in Zellkultur gebracht. In den strahlenresistenten Klonen sind die TSZ im Vergleich zu den elterlichen Zelllinien bereits angereichert, was durch Messung der ALDH1-Aktivität nachgewiesen wurde (Abb 3.4). Für die folgenden Experimente wurde also mit insgesamt sechs Zelllinien gearbeitet, deren Anteil an TSZ vom Wildtyp über den strahlenresistenten Klon bis zum ALDH1+ Klon ansteigt.

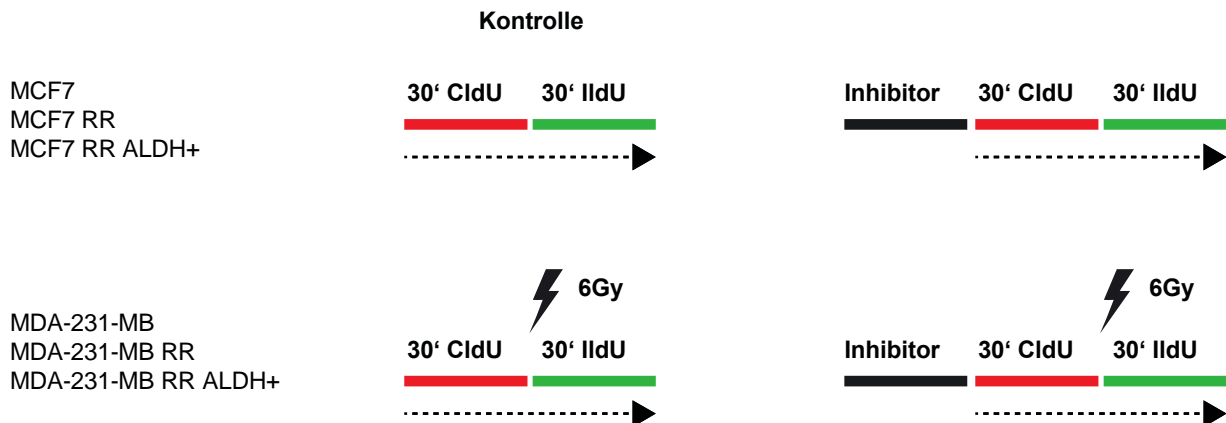


**Abb. 3.4 Isolation von ALDH1 positiven Zellen am Beispiel der MCF7 Zelllinie** (a, b) Aktivität von ALDH1 in RR Klonen im Vergleich zum Wildtyp. In den RR Klonen sind die TSZ im Vergleich zu den elterlichen Zelllinien angereichert, was durch Messung der ALDH1-Aktivität nachgewiesen wurde. (c) Anreicherung von TSZ mit Hilfe von FACS-Sorting. Die Zellen wurden mit ALDEFLOUR™-Reagenz behandelt, geerntet, die ALDH1 positiven Zellen mittels FACS quantifiziert und aus den strahlenresistenten Klonen isoliert.

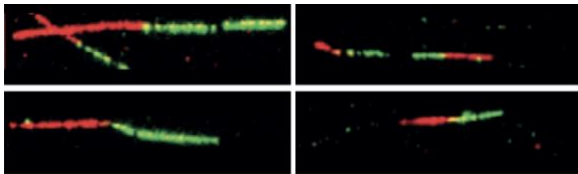
### 3.4 Auswirkungen ionisierender Strahlung in Kombination mit ATR- und PARP-Inhibition auf Replikationsprozesse der DNA

Die strahlenresistenten Klone zeigten im Vergleich zu den WT-Zelllinien ein signifikant höheres Überleben nach Bestrahlung, ließen sich jedoch durch Inhibition von ATR oder PARP sehr effektiv gegen Bestrahlung sensibilisieren (Abb. 3.1+3.2). Beide Inhibitoren wirken vor allem in der S-Phase und beeinflussen DNA-Replikationsprozesse (Maya-Mendoza et al., 2018, King et al., 2021). Deshalb wurde im nächsten Schritt mittels Fiber Assay untersucht, wie sich die Inhibitoren in Kombination mit Bestrahlung auf die Elongation auswirken (Abb 3.5). Dabei waren die strahlenresistenten Klone und die daraus isolierten, ALDH1-positiven TSZ von besonderem Interesse.

a)



b)



**Abb. 3.5 Behandlungsschemata der Fiber Assays**

**a)** Die Zellen wurden zunächst für 2 Stunden mit dem jeweiligen Inhibitor behandelt, dann für 30 Minuten mit CldU inkubiert, anschließend mit 6 Gy bestrahlt und für 30 weitere Minuten mit IdU inkubiert. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Zellen, bzw. solche, die lediglich bestrahlt wurden. **b)** Die DNA Stränge wurden danach präpariert und die eingebauten Nukleotide mit spezifischen Antikörpern detektiert, gefärbt und die Längen ausgemessen. Durch die Behandlung mit den primären und den fluoreszierenden sekundären Antikörpern stellten sich CldU rot und IdU grün dar.

### 3.4.1 Auswirkungen ionisierender Strahlung auf DNA-Replikationsprozesse

Zunächst wurden die Effekte ionisierender Bestrahlung mit 6 Gy ohne Zugabe eines Inhibitors untersucht. Abbildung 3.6 zeigt die Verteilung gemessener Chromatinfaserlängen bereits synthetisierter DNA vor der Bestrahlung (CldU-Label). Die MCF7 (Abb. 3.6A) zeigte nach Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle signifikant kürzere Chromatinfasern mit  $16,32 \pm 0,5 \mu\text{m}$  zu  $12,46 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,0001$ , während der strahlenresistente Klon (Abb. 3.6B) und die daraus isolierten, ALDH1-positiven TSZ (Abb. 3.6C) keine signifikanten Veränderungen der Chromatinfasern durch Bestrahlung aufwiesen mit  $9,7 \pm 0,1 \mu\text{m}$  zu  $9,8 \pm 0,4 \mu\text{m}$  und  $11,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$  zu  $11,57 \pm 0,3 \mu\text{m}$ .

Bei der MDA-MB-231 zeigten sich weder in der WT-Zelllinie noch im strahlenresistenten Klon Veränderungen der Chromatinfaserlängen durch Bestrahlung

im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.6D und 3.6E) mit  $6,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$  zu  $7,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$  und  $9,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$  zu  $9,8 \pm 0,4 \mu\text{m}$ . Die ALDH1-positiven Zellen (Abb. 3.6F) zeigten durch Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle sogar signifikant längere Chromatinfasern mit  $9,9 \pm 0,2 \mu\text{m}$  zu  $11,7 \pm 0,4 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,0001$ .

Abbildung 3.7 zeigt die Verteilung gemessener Chromatinfaserlängen nach der Bestrahlung (IdU-Label). Die MCF7 zeigte nach Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle in allen drei Subpopulationen signifikant kürzere Chromatinfasern. Beim Wildtyp (Abb. 3.7A) war eine Verkürzung mit  $11,43 \pm 0,3 \mu\text{m}$  zu  $5,571 \pm 0,2 \mu\text{m}$   $p < 0,0001$  zu beobachten, beim strahlenresistenten Klon mit  $7,397 \pm 0,3 \mu\text{m}$  zu  $6,147 \pm 0,2 \mu\text{m}$   $p < 0,01$  (Abb. 3.7B) und bei den ALDH1-positiven Zellen mit  $8,164 \pm 0,2 \mu\text{m}$  zu  $6,265 \pm 0,2 \mu\text{m}$   $p < 0,0001$  (Abb. 3.7C)

In allen drei Subpopulationen der MDA-MB-231 zeigten sich bei der nach der Bestrahlung synthetisierten DNA etwas kürzere Chromatinfasern (IdU-Label) (Abb. 3.7 D-F). Die Chromatinfasern der MDA-MB-231 verkürzten sich im Vergleich zur Kontrolle mit  $3,991 \mu\text{m}$  zu  $2,723 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,0001$  (Abb. 3.7D), der strahlenresistente Klon (Abb. 3.7E) und daraus isolierten ALDH1-positiven TSZ (Abb. 3.7F) zeigten eine Verkürzung mit  $6,32 \mu\text{m}$  zu  $4,714 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,0001$  und  $5,982 \mu\text{m}$  zu  $4,659 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,0001$ .

Hier war jedoch noch deutlicher als bei der MCF7 Zelllinie eine Abhängigkeit zwischen dem Neustart der Replikation nach Bestrahlung und der Strahlenresistenz zu erkennen.

### **3.4.2 Auswirkungen von PARP-Inhibition in Kombination mit ionisierender Strahlung auf DNA-Replikationsprozesse**

Abbildung 3.6 zeigt die Verteilung gemessener Chromatinfaserlängen bereits synthetisierter DNA vor der Bestrahlung (CldU-Label). Die Inhibition von PARP führte sowohl allein als auch in Kombination mit Bestrahlung zu Veränderungen: Die MCF7 zeigte nach alleiniger PARP-Inhibition kürzere Chromatinfasern als nach der Kombination aus PARPi und Bestrahlung (Abb. 3.6A) mit  $10,0 \pm 0,3 \mu\text{m}$  zu  $11,72 \pm 0,4 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,001$ . Noch stärker war dieser Effekt im strahlenresistenten Klon zu beobachten. Hier zeigten sich ebenfalls kürzere Chromatinfasern mit  $11,02 \pm 0,4 \mu\text{m}$  bei alleiniger PARP-Inhibition zu  $15 \pm 0,4 \mu\text{m}$   $p < 0,0001$  in Kombination mit Bestrahlung (Abb. 3.6B) Bei den ALDH1-positiven Zellen war keine signifikante Veränderung zu beobachten.

Bei der MDA-MB-231 zeigte sich ein ähnliches Bild: In der Wildtyp Zelllinie waren die Chromatinfasern bei alleiniger PARP-Inhibition deutlich kürzer mit  $6,72 \pm 0,1 \mu\text{m}$  zu  $11,35 \pm 0,3 \mu\text{m}$   $p < 0,0001$  in Kombination mit Bestrahlung (Abb. 3.6D). Dies war ebenfalls beim strahlenresistenten Klon mit  $10,09 \pm 0,3 \mu\text{m}$  zu  $14 \pm 0,5 \mu\text{m}$   $p < 0,0001$  (Abb. 3.6E) und bei den ALDH1-positiven Zellen mit  $10,99 \pm 0,4 \mu\text{m}$  zu  $13,45 \pm 0,4 \mu\text{m}$  zu beobachten (Abb. 3.6F).

Abbildung 3.7 zeigt die Verteilung gemessener Chromatinfaserlängen nach der Bestrahlung (IdU-Label). Die Inhibition von PARP führte in allen drei Subpopulationen zu einer Verkürzung der Chromatinfasern nach der Bestrahlung (IdU-Label). Dies war sowohl bei alleiniger PARP-Inhibition als auch in Kombination mit Bestrahlung zu beobachten.

Die Chromatinfasern der Wildtyppopulation verkürzten sich bei alleiniger PARP-Inhibition im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle mit  $5,571 \pm 0,2 \mu\text{m}$  zu  $4,088 \pm 0,2 \mu\text{m}$ . Nach PARP-Inhibition in Kombination mit Bestrahlung war eine weitere Verkürzung zu  $3,091 \pm 0,2 \mu\text{m}$   $p < 0,001$  zu beobachten (Abb. 3.7A). Der strahlenresistente Klon zeigte eine Verkürzung mit  $6,147 \pm 0,2 \mu\text{m}$  in der bestrahlten Probe zu  $4,538 \pm 0,2 \mu\text{m}$  bei alleiniger PARP-Inhibition und zu  $3,375 \pm 0,2 \mu\text{m}$  bei PARP-Inhibition in Kombination mit Bestrahlung  $p < 0,0001$ . (Abb. 3.7B). Die ALDH1-positiven Zellen zeigten eine nicht signifikante Verkürzung von  $6,265 \pm 0,2 \mu\text{m}$  in der bestrahlten Kontrolle zu  $5,122 \pm 0,2 \mu\text{m}$  bei alleiniger PARP-Inhibition und zu  $4,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$  bei PARP-Inhibition in Kombination mit Bestrahlung. (Abb. 3.7C)

Für die MDA-231-MB zeigte sich im Wildtyp keine Verkürzung der Chromatinfasern nach PARP-Inhibition. Vielmehr war hier eher eine Verlängerung der Chromatinfasern von  $2,587 \pm 0,1 \mu\text{m}$  bei alleiniger PARP-Inhibition zu  $3,52 \pm 0,1 \mu\text{m}$   $p < 0,0001$  nach PARP-Inhibition in Kombination mit Bestrahlung zu erkennen. (Abb. 3.7D)

Für die MDA-231-MB RR zeigte sich eine Verkürzung der Chromatinfasern von  $5,953 \pm 0,3 \mu\text{m}$  nach alleiniger PARP-Inhibition zu  $3,422 \pm 0,1 \mu\text{m}$   $p < 0,0001$  nach PARP-Inhibition in Kombination mit Bestrahlung. (Abb. 3.7E). Bei den ALDH1-positiven Zellen war keine signifikante Verkürzung zu beobachten (Abb. 3.7F).

### **3.4.3 Auswirkungen von ATR-Inhibition in Kombination mit ionisierender Strahlung auf DNA-Replikationsprozesse**

Abbildung 3.6 zeigt die Verteilung gemessener Chromatinfaserlängen bereits synthetisierter DNA vor der Bestrahlung (CldU-Label). Die Inhibition von ATR führte in



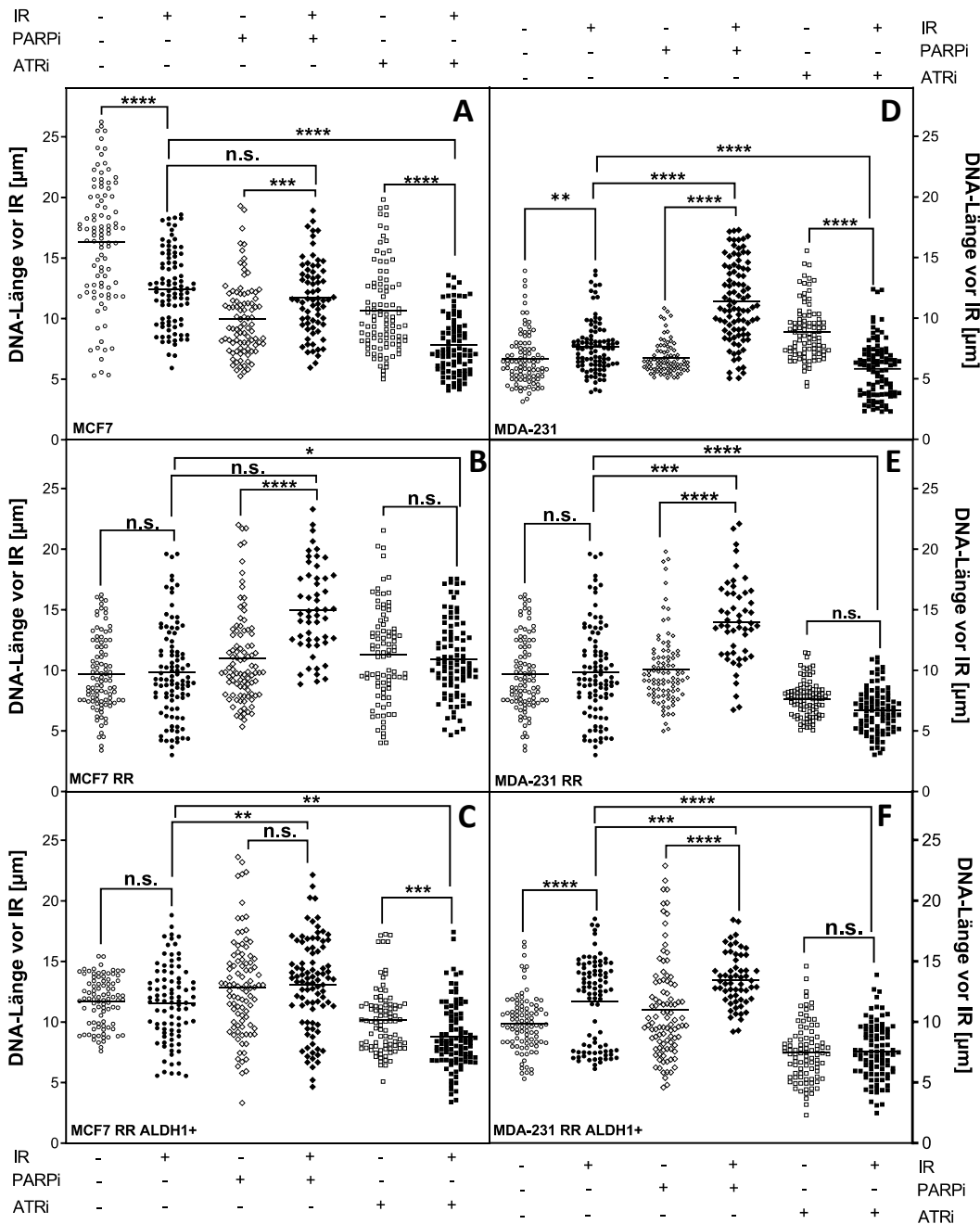
beiden Zelllinien bei fast allen Subpopulationen zu einer Verkürzung der bereits vor der Bestrahlung synthetisierten DNA. Dieser Effekt war jeweils am stärksten in den Wildtyp Populationen zu beobachten.

Die MCF7 (Abb. 3.6A) zeigte nach der Bestrahlung im Vergleich zur alleinigen ATR-Inhibition signifikant kürzere Chromatinfasern mit  $10,69 \pm 0,4 \mu\text{m}$  zu  $7,867 \pm 0,4 \mu\text{m}$   $p < 0,0001$ . Beim strahlenresistenten Klon war diese Beobachtung nicht signifikant mit  $11,3 \pm 0,4 \mu\text{m}$  zu  $10,92 \pm 0,3 \mu\text{m}$  (Abb. 3.6B). Bei den ALDH1 positiven Zellen ergab sich eine Verkürzung mit  $10,14 \pm 0,3 \mu\text{m}$  zu  $8,772 \pm 0,3 \mu\text{m}$   $p < 0,001$  (Abb. 3.6C).

Bei der MDA-MB-231 ergab sich im Wildtyp eine Verkürzung der Chromatinfasern mit  $8,887 \pm 0,2 \mu\text{m}$  zu  $5,813 \pm 0,2 \mu\text{m}$   $p < 0,0001$  (Abb. 3.6D) Beim strahlenresistenten Klon war diese Veränderung nicht signifikant mit  $7,654 \pm 0,1 \mu\text{m}$  zu  $6,678 \pm 0,2 \mu\text{m}$  (Abb. 3.6E). Bei den ALDH1-positiven Zellen zeigten sich, ebenfalls nicht signifikant, nach der Bestrahlung sogar längere Chromatinfasern im Vergleich zur alleinigen ATR-Inhibition mit  $7,467 \pm 0,2 \mu\text{m}$  zu  $7,525 \pm 0,2 \mu\text{m}$  (Abb. 3.6F).

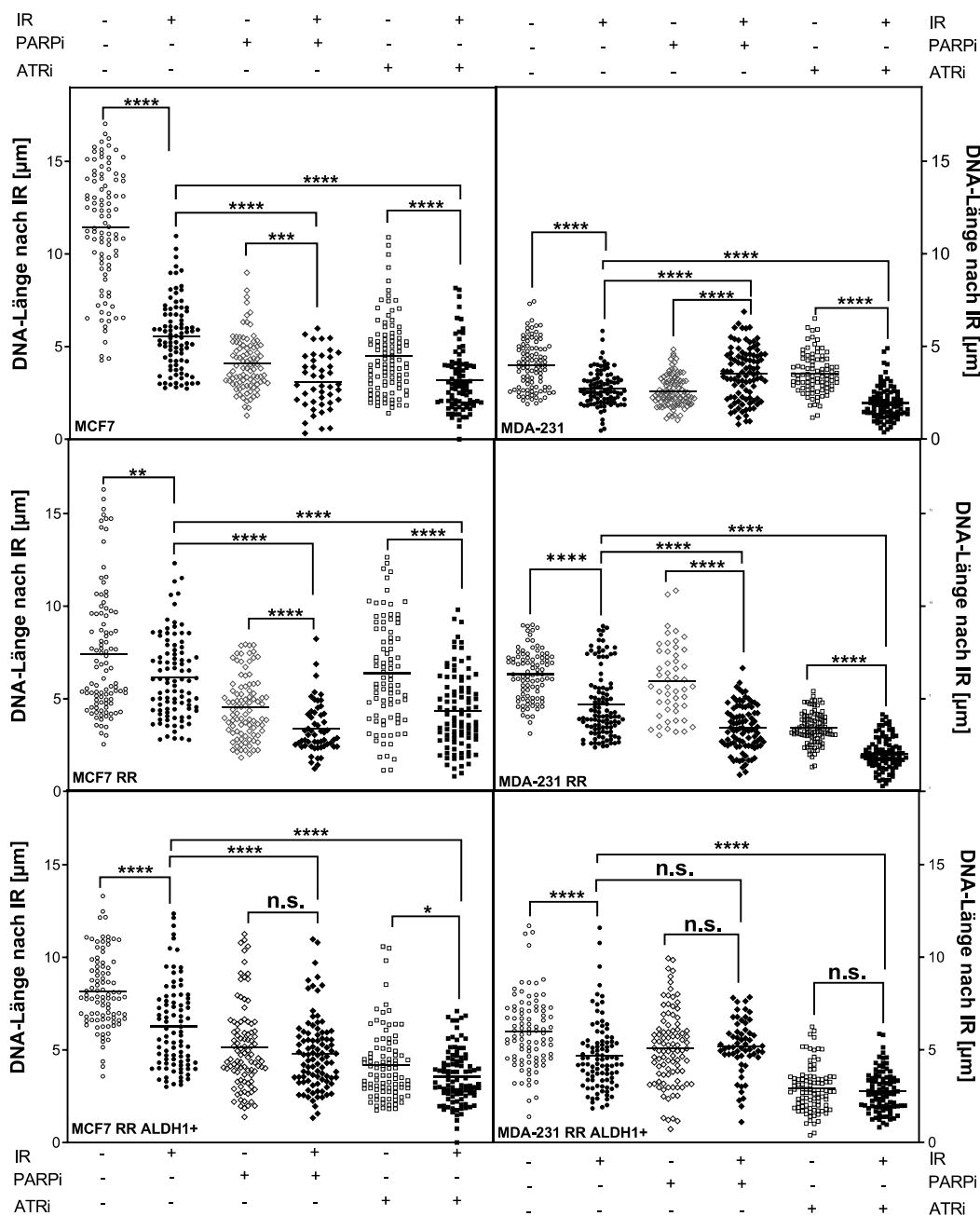
Abbildung 3.7 zeigt die Verteilung gemessener Chromatinfaserlängen nach der Bestrahlung (IdU-Label). Für die Inhibition von ATR konnte beobachtet werden, dass sich sowohl die Wildtypen, ihre strahlenresistenten Klone und insbesondere die ALDH1 positiven Subpopulationen durch ATR-Inhibition für Bestrahlung signifikant sensibilisieren ließen. Bei der MCF7 WT (Abb. 7A) war eine Verkürzung der Chromatinfasern mit  $4,49 \pm 0,2 \mu\text{m}$  nach alleiniger ATR-Inhibition zu  $3,162 \pm 0,2 \mu\text{m}$   $p < 0,0001$  in Kombination mit Bestrahlung zu beobachten. Der strahlenresistente Klon zeigte eine Verkürzung mit  $6,374 \pm 0,3 \mu\text{m}$  zu  $4,353 \pm 0,2 \mu\text{m}$   $p < 0,0001$  (Abb. 3.7B) und die ALDH1-positiven Zellen mit  $4,168 \pm 0,2 \mu\text{m}$  zu  $3,544 \pm 0,1 \mu\text{m}$  (Abb. 3.7C).

Für die MDA-MB-231 (Abb. 3.7D) zeigte sich eine Verkürzung der Chromatinfasern mit  $3,53 \pm 0,1 \mu\text{m}$  nach alleiniger ATR-Inhibition zu  $1,944 \pm 0,1 \mu\text{m}$   $p < 0,0001$  in Kombination mit Bestrahlung, beim strahlenresistenten Klon mit  $3,424 \pm 0,1 \mu\text{m}$  zu  $2,054 \pm 0,1 \mu\text{m}$   $p < 0,0001$  (Abb. 3.7E) und bei den ALDH1-positiven Zellen mit  $2,897 \pm 0,1 \mu\text{m}$  zu  $2,758 \pm 0,1 \mu\text{m}$   $p < 0,0001$  (Abb. 3.7F).



**Abb.3.6: Auswirkung der Bestrahlung auf die Replik bereits synthetisierter DNA**

Exponentiell wachsende Zellen wurden 2 Stunden mit Olaparib bzw. VE-821 inkubiert, sequentiell für je 30 Minuten mit CldU und IdU markiert und zwischen beiden Markierungen mit 6 Gy bestrahlt. Die DNA wurde auf Objektträgern ausgebreitet, fixiert und die eingebauten Nukleotide durch Immunfluoreszenz nachgewiesen. Abgebildet sind die mit CldU markierten Längen der Chromatinfasern vor der Bestrahlung. Die Länge der Chromatinfasern wurde mit der Software Image J gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  SEM. Sternchen (\*) stehen für signifikante Unterschiede (n.s., nicht signifikant; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , Student's t-test).



**Abb.3.7 Auswirkung der Bestrahlung auf die Neusynthese von DNA**

Exponentiell wachsende Zellen wurden 2 Stunden mit Olaparib bzw. VE-821 inkubiert und anschließend nacheinander 30 Minuten lang mit CldU und IdU markiert und zwischen beiden Markierungen mit 6 Gy bestrahlt. Als Kontrolle dienten unbehandelte und lediglich bestrahlte Proben. Die DNA wurde auf Objektträgern ausgebreitet, fixiert und die eingebauten Nukleotide durch Immunfluoreszenz nachgewiesen. Abgebildet sind die mit Idu markierten Längen der DNA Fasern nach der Bestrahlung. Die Länge der DNA-Fasern wurde mit der Software Image J gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  SEM. Sternchen (\*) stehen für signifikante Unterschiede (n.s., nicht signifikant; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , Student's t-test).

## 4. Diskussion

Das Ausmaß der DNA-Schäden, die durch Bestrahlung in den Zellen von Tumorgewebe hervorgerufen werden, bestimmt das kurative Potential der Strahlentherapie. IR induziert verschiedene Arten von DNA-Schäden, wobei DSB die bedeutendste DNA-Läsion darstellen. Nach Bestrahlung hängt das Schicksal der Zellen von der Menge der kritischen DNA-Schäden ab. Ein geringes Maß an DNA-Läsionen löst in den Zellen DNA-Reparatur- und Schutzmechanismen aus, die den Zellen die Möglichkeit geben, die DNA zu reparieren, bevor sie in den proliferativen Pool zurückkehren. Ist die DNA-Schädigung zu hoch, gehen die Zellen in die Apoptose, Nekrose, Seneszenz, mitotischen oder immunogenen Zelltod um einige der möglichen Zelltodmechanismen zu benennen (Morgan et al. 2015; Roos et al. 2016; Schulz/Meyer et al., 2019). Die Zellen setzen zwei Hauptmechanismen ein, um DSB zu reparieren: das fehleranfälligere NHEJ und die genauere HR. Darüber hinaus verfügen Tumorzellen auch über zwei weitere fehleranfällige DSB-Backup-Reparaturmechanismen für NHEJ und HR, das alt-EJ und das Einzelstrang-Annealing (Mladenov et al., 2016). Einige präklinische Beobachtungen deuten darauf hin, dass viele dieser Reparatur- und Schutzmechanismen in TSZ-Populationen verschiedener Tumorentitäten aktiviert sind, was möglicherweise zu einer Behandlungsresistenz führt (Schulz/Meyer et al 2019). Signalwege, die die DNA-Integrität und -Reparatur in TSZ kontrollieren, könnten daher als vielversprechendes Ziel in der Krebstherapie dienen (Schulz/Meyer et al., 2019). In dieser Arbeit wurde anhand des zellulären Überlebens im Kolonietest untersucht, durch welche Inhibitoren der DNA-Reparatur und – Schadensantwort TSZ des Brustkrebses für Bestrahlung sensibilisiert werden können. Von besonderem Interesse war hierbei, wie sich die Inhibition auf die Strahlenempfindlichkeit der strahlenresistenten Klone, die einen im Vergleich zu den Wildtyp Zellen deutlich gesteigerten Anteil ALDH1-positiver TSZ aufwiesen, auswirkt. Im Weiteren wurde mittels Fiber Assay untersucht, welchen Einfluss die Beeinträchtigung von Replikationsprozessen für diese Sensibilisierung hat.

### 4.1 Modulation der Strahlenempfindlichkeit durch PARP1-Inhibition

Das Protein PARP1 bindet sowohl an DNA-ESB als auch an DSB und initiiert und moduliert mehrere DNA-Reparaturwege (Petrucco et al., 2008; Khodyreva et al., 2010). Somit spielt PARP1 eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der

genomischen Integrität. Olaparib stört durch Inhibition des Proteins PARP1 den DNA-Reparaturweg BER und führt in der Folge zu einer Anhäufung nicht reparierter ESB, die kollabierte Replikationsgabeln in der S-Phase hervorrufen und so zu DSB konvertiert werden (Bochum et al., 2018). In der Folge ist die Zelle auf die DNA-Reparatur mittels HR angewiesen.

In einem ersten Schritt sollte überprüft werden, ob die Hemmung von PARP1 mit dem Inhibitor Olaparib zu einer Strahlensensibilisierung in strahlenresistenten Klonen mit erhöhtem Anteil von TSZ führt. In der vorliegenden Arbeit führte Olaparib zu einer signifikanten Verringerung der Strahlenresistenz in den strahlenresistenten Klonen. Diese fiel deutlich stärker aus als in den Wildtypzellen. Die beiden WT-Zelllinien zeigten keine einheitliche Veränderung der Strahlenempfindlichkeit: Während die MCF7 durch Olaparib keine Veränderung der Strahlenempfindlichkeit zeigte, führte die Inhibition von PARP1 in der MDA-231 zu einer deutlichen Verringerung der Strahlenresistenz. Unterschiede bei der Empfindlichkeit gegen Olaparib in Abhängigkeit des TSZ-Anteils wurden bereits beobachtet. Liu und Kollegen konnten zeigen, dass die Olaparib-Empfindlichkeit mit dem Anteil der TSZ in Brustreiszellpopulationen korrelierte (Liu et al., 2017). Dies wurde auf eine erhöhte Expression des HR-Proteins RAD51 in den TSZ zurückgeführt. Die Expression von RAD51 wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, könnte aber zu den Unterschieden der Olaparib-abhängigen Strahlensensibilisierung beigetragen haben. Dass der endogene PARP1-Spiegel eine Rolle für die Strahlenempfindlichkeit spielt, wurde auch in strahlenresistenten Hypopharynx Krebszellen beobachtet; hier korrelierte die Expression von PARP1 direkt mit der Strahlenempfindlichkeit (Liu et al., 2017). Eine weitere Arbeit konnte zeigen, dass die Strahlensensibilisierung mittels Olaparib von der HR-Kapazität abhing: nach Kombinationsbehandlung von zehn HNSCC-Zelllinien (HNSCC, *Head and neck squamous cell carcinoma*) mit Olaparib und Bestrahlung zeigten die Zelllinien mit geringer HR-Kapazität signifikant mehr radiale Chromosomen als die Zelllinien mit hoher HR-Kapazität (Wurster et al., 2016). Dies steht den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit entgegen, da für die strahlenresistenten Klone dieser Arbeit eine höhere HR-Kapazität gezeigt wurde als für die WT-Zellen (Daten nicht gezeigt, aber einsehbar in Meyer/Engel et al., 2022). Eine Studie, die in TSZ des Glioblastoms durchgeführt wurde, zeigte hingegen eine deutliche Reduktion des Tumorstammzellanteils nach Kombinationsbehandlung von Olaparib mit Bestrahlung (Lesueur et al., 2018), was die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt und zu

der erhöhten Strahlensensibilisierung der strahlenresistenten Klone beigetragen haben könnte. Insgesamt zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass die strahlenresistenten Klone mit erhöhtem TSZ-Anteil effektiv mit Olaparib gegen Bestrahlung sensibilisiert werden können. Dies könnte dazu beitragen, die Ergebnisse von Patienten mit Mammakarzinom, die mit Bestrahlung behandelt werden, zu verbessern.

#### **4.2 Modulation der Strahlenempfindlichkeit durch CHK1- oder ATR Inhibition**

Die S-Phase-Kinase Ataxia-Telangiectasia-Mutated-and-Rad3-Related Kinase (ATR) und ihr wichtigster nachgeschalteter Effektor Checkpoint Kinase 1 (CHK1) sind die wichtigsten Kinasen der S-Phase. Durch ihre Aktivierung verhindern sie den Eintritt von Zellen mit beschädigter oder unvollständig replizierter DNA in die Mitose, wenn die Zellen durch DNA-schädigende Mittel wie Strahlentherapie oder Chemotherapeutika angegriffen werden (Zhaojun et al., 2018). Darüber hinaus aktiviert CHK1 die DNA-Reparatur durch HR (Sorensen et al., 2005; Jazayeri et al. 2006). Während der DNA-Replikation regulieren sie Aktivierung von Replikationsurprüngen und schützen DNA-Replikationsgabel vor nukleolytischer Degradation (Kim et al., 2017; Jazayeri et al 2006; Forment et al., 2011; Thompson et al., 2012; Zhaojun et al., 2018). Diese Funktionen von ATR/CHK1 machen sie zu vielversprechenden therapeutischen Zielen. ATR/CHK1-Inhibitoren werden derzeit in präklinischen und klinischen Studien entweder als Einzelwirkstoffe oder in Kombination mit Strahlentherapie oder einer Reihe von genotoxischen Chemotherapien eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit zeigten die strahlenresistenten Klone sowohl nach Inhibition von ATR als auch nach der Inhibition von CHK1 eine signifikante Verringerung der Strahlenresistenz in allen untersuchten Dosispunkten, die insgesamt deutlich stärker ausfiel als in den Wildtyp-Zellen. Dabei zeigten beide Inhibitoren eine sehr vergleichbare Wirkung (Vgl. Abb. 3.2).

In den Wildtyp-Zellen zeigte sich hingegen keine einheitliche Veränderung der Strahlenempfindlichkeit: Während die MCF7 nach Inhibition kaum Veränderungen der ohnehin hohen Strahlenempfindlichkeit zeigte, führten in der MDA-MB-231 sowohl die Inhibition von ATR als auch die Inhibition von CHK1 zu einer signifikanten Strahlensensibilisierung in den Dosispunkten 2 und 4Gy.

Eine spezifische Inhibition von TSZ durch Störung des ATR-CHK1 Signalwegs wurde bereits beobachtet: In der Arbeit von Bartucci et al. führte die Inhibition des ATR-CHK1-Signalwegs zu einer Reduktion des TSZ-Anteils in Zelllinien des kleinzelligen Lungenkarzinoms (Bartucci et al., 2012). In einer weiteren Arbeit führte die Inhibition von ATR zu einer Verringerung der Tumorigenität in CD133<sup>+</sup> TSZ des Colonkarzinoms (Gallmeier et al., 2011).

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Funktionalität des ATR-CHK1-Signalweges für TSZ von besonderer Bedeutung ist; möglicherweise sind für diese Zellen die Vermeidung von strahleninduziertem RS und der Schutz von Replikationsgabeln von besonderer Bedeutung. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit Ergebnissen, die Meyer und Kollegen gezeigt haben. Sie schlussfolgerten, dass die Aktivierung der ATR-Signalkaskade die Strahlenresistenz in Brustkrebs TSZ durch Aktivierung der HR vermittelt (Meyer/Engel et al 2022).

#### **4.3 Modulation der Strahlenempfindlichkeit durch ATM- oder DNA-PKcs-Inhibition**

ATM ist eine Kinase, die für die globale Orchestrierung der zellulären Reaktionen auf DSB verantwortlich ist. Dazu gehören DNA-Reparatur, Checkpoint-Aktivierung, Apoptose, Seneszenz und Veränderungen der Chromatinstruktur, der Transkription und des prä-mRNA-Spleißens (Shiloh und Ziv, 2013; Andrew et al., 2017). Um dies zu erreichen, phosphoryliert ATM als Reaktion auf DNA-Schäden hunderte von Substraten (Matsuoka et al., 2007). Die Hemmung von ATM führte bereits in anderen Studien selektiv zu einer Strahlensensibilisierung in Glioblastom-TSZ (Ahmed et al., 2015; Carruthers et al., 2015). Die Kinase DNAPKcs hingegen ist kein klassisches Aktivatorprotein, sondern ein Bestandteil des DNA-Reparaturwegs NHEJ. Dabei werden zwei gebrochenen DNA-Enden wieder miteinander verknüpft, ohne dass eine Sequenzhomologie benötigt wird. DNAPKcs wird dabei von Kofaktoren an DSB rekrutiert, um weitere Reparaturschritte einzuleiten (Jette und Lees-Miller, 2015, Andrew et al 2017). Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein Defekt oder die Inhibition von DNAPKcs zu einer signifikanten Verringerung der Strahlenresistenz führte (Wang et al., 2018; Mir et al., 2010; Timme et al., 2018; Kahn et al., 2014; Zhang et al., 2010; Zhou et al., 2015; Schulz/Meyer et al., 2019). Während ATM in allen Zellzyklusphasen aktiv ist, ist DNAPKcs hauptsächlich in der G1-Phase von Bedeutung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl die Inhibition von ATM als auch von DNAPKcs zu einer signifikanten Strahlensensibilisierung der strahlenresistenten Klone mit erhöhtem TSZ-Anteil führte. Die Wirkung war jedoch nicht einheitlich: im RR Klon der MCF7 führte die Inhibition von DNAPKcs zu einer stärkeren Sensibilisierung als die Inhibition von ATM, während sie in der MDA-MB-231 einen vergleichbar sensibilisierenden Effekt erzielten (Vgl. Abbildung 3.3) Die Wildtypzellen MCF7 und MDA-MB-231 zeigten ebenfalls kein einheitliches Bild: Während die Inhibitoren in der MDA-MB-231 zu einer vergleichsweise geringen Strahlensensibilisierung führte, führte bei der MCF7 insbesondere die Inhibition von DNAPKcs zu einer signifikanten Sensibilisierung. Eine Verringerung der Strahlenresistenz nach Inhibition von ATM wurde bereits in TSZ des Glioblastoms beobachtet (Ahmed, Carruthers et al 2015) Sowohl die Inhibition von ATM als auch DNAPKcs waren in allen in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien zwar sehr effektiv für die Strahlensensibilisierung, jedoch ist allgemein bekannt, dass sie auch für Normalgewebszellen, die wenig proliferieren und sich vorwiegend in der G1 Phase des Zellzyklus befinden, sehr schädlich sind, weshalb sie in der Klinik derzeit keine Anwendung finden.

#### **4.4 Korrelation des Stammzellmarkers ALDH1 und Strahlenresistenz**

Für die Identifizierung von Brustkrebs TSZ sind sowohl der CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup>-Phänotyp als auch die ALDH1-Aktivität von Bedeutung, allerdings ist CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> auf einen mesenchymalen Phänotyp beschränkt, während ALDH1 aufgrund seiner Unabhängigkeit vom aktuellen Zellstatus ein allgemeinerer BCSC-Marker ist (Ricardo et al., 2011; Colacino et al., 2018) Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine klare Korrelation zwischen Strahlenresistenz und dem Anteil ALDH1-positiver TSZ. Es zeigte sich, dass die Strahlenresistenz tatsächlich durch die ALDH1-positive Zellfraktion bestimmt wird und dass die ALDH1-positiven Zellen der MCF7-Zelllinie strahlenempfindlicher waren als der strahlenresistente Klon. Diese Ergebnisse werden durch die Arbeit von Meyer und Kollegen gestützt (Meyer/Engel et al. 2022). In den TNBC-Zelllinien wurde im Vergleich zur luminalen MCF7-Zelllinie eine Häufung von CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup>- und ALDH1-positiven Zellen beobachtet (Meyer/Engel et al. 2022), was erklären könnte, weshalb die MDA-MB-231 per se bereits strahlenresistenter ist als die MCF7.



#### **4.5 Auswirkungen ionisierender Strahlung auf Replikationsprozesse in TSZ**

Trotz der weitreichenden Bedeutung für das Verständnis der TSZ sind die Ursachen der hochregulierten DDR und der anschließenden Strahlenresistenz der TSZ weitgehend unbekannt. Ausgangspunkt für die verstärkte DDR scheint unter anderem eine allgemeine Anpassung an erhöhten RS bereits im unbehandelten Zustand zu sein, was zu einer verstärkten Aktivierung der DDR auch nach Bestrahlung führt (Carruthers et al., 2018; Diehn et al., 2009). RS kann als ineffiziente und inakkurate DNA-Replikation definiert werden, die dazu führt, dass Replikationsgabeln langsam fortschreiten, zum Stillstand kommen oder enzymatisch abgebaut werden. Dies kann durch eine Vielzahl von zellulären und umweltbedingten Faktoren verursacht werden. (Zeman/Cimprich 2014; Foskolou et al., 2017) Da RS nachteilige Folgen haben kann, einschließlich dauerhafter DNA-Schäden und genomischer Instabilität, ruft es ein Spektrum zellulärer Reaktionen hervor, die darauf abzielen, blockierte Replikationsgabeln zu stabilisieren und das Risiko eines Kollapses der Replikationsgabeln und daraus resultierender DNA-Schäden zu verringern. Weitgehende Überschneidungen zwischen den zellulären Reaktionen auf RS und strahleninduzierte DNA-Schäden unterstützen die Hypothese, dass konstitutiver RS für die Strahlenresistenz verantwortlich sein könnte (Carruthers et al., 2018). RS wurde vor kurzem in nicht bösartigen embryonalen Stammzellen nachgewiesen, die aufgrund einer abnormalen Zellzyklusprogression eine konstitutiv aktive DDR und eine verlängerte S-Phase aufweisen. Diese Merkmale nehmen bei der Differenzierung rasch ab (Ahuja et al., 2016). Carruthers und Kollegen konnten in Glioblastomzellen zeigen, dass die konstitutive DDR-Aktivierung und die Strahlenresistenz durch ein hohes Maß an RS bedingt sind (Carruthers et al., 2018).

Um die Auswirkungen von Bestrahlung auf Replikationsprozesse in TSZ des Brustkrebses zu untersuchen und so Rückschlüsse auf veränderte DNA-Replikations- und -Reparaturprozesse zu ermöglichen, wurden ihre DNA-Replikationsprozesse nach Bestrahlung mittels DNA-Fiber Assay untersucht.

In dieser Arbeit konnte in beiden Zelllinien, der MCF7 und der MDA-MB-231 erstmalig beobachtet werden, dass die Replikation in den strahlenresistenten Klonen und ALDH1-positiven Zellen durch die Bestrahlung nur wenig beeinträchtigt wurde. (vgl. Abbildung 3.6 und 3.7). Die Ergebnisse legen nahe, dass, je höher der Anteil an TSZ und damit der bereits im unbehandelten Zustand erhöhte RS ist, desto geringer sind die Auswirkungen auf DNA-Replikationsprozesse nach der Bestrahlung. Außerdem

zeigten sowohl die strahlenresistenten Klone als auch die daraus isolierten, ALDH1-positiven TSZ keine strahleninduzierten Veränderungen der Chromatinfasern der bereits vor der Bestrahlung synthetisierten DNA, was zusätzlich auf eine funktionale Stabilisierung von Replikationsgabeln hinwies.

#### **4.6 Auswirkung ionisierender Strahlung mit PARP-Inhibition auf Replikationsprozesse**

In dieser Arbeit konnte für die Inhibition von PARP in beiden Zelllinien, der MCF7 und der MDA-MB-231 mittels Kolonietests gezeigt werden, dass sie sich gegen Bestrahlung sensibilisieren ließen und die Analyse der Replikationsprozesse zeigte starke Auswirkungen auf selbige: In fast allen Zellen ist die Replikationsgeschwindigkeit und der Neustart der Replikation nach Inhibition von PARP durch Olaparib und anschließender Bestrahlung verringert, allerdings war dieser Effekt bei der MCF7 Zelllinie signifikant stärker ausgeprägt als bei der MDA-231-MB. Die MCF7 WT Zellen zeigten außerdem eine signifikante Verkürzung der CldU-Markierung, also einen ausgeprägten Bestrahlungseffekt auf die bereits vor Bestrahlung synthetisierte DNA, während sich für die strahlenresistenten Klone und die ALDH1 positiven Subpopulationen der MDA-231-MB Zelllinie zeigte, dass die Replikationsgeschwindigkeit nach der Behandlung mit Olaparib initial zunächst anstieg. Vergleicht man die Längen der Chromatinfasern der unbehandelten Kontrollen mit denen der mit Olaparib behandelten Zellen dieser Subpopulationen, zeigte sich eine Verlängerung Letzterer. Die Replikationsgeschwindigkeit ist hier nach der Behandlung mit Olaparib initial erhöht. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit einer Arbeit von Maya Mendoza und Kollegen, die ebenfalls beobachteten, dass die Inhibition von PARP die Replikationsgeschwindigkeit signifikant erhöhte. Dies führte zu erhöhtem Replikationsstress und genomischer Instabilität (Maya-Mendoza et al., 2018). Trotz der möglicherweise erhöhten RS-Toleranz der TSZ kann vermutet werden, dass es bei selbigen einen Schwellenwert gibt, der durch die Kombination von PARP-Inhibitor und Bestrahlung überschritten wird.

#### **4.7 Auswirkung ionisierender Strahlung mit ATR-Inhibition auf Replikationsprozesse**

Die Inhibition von ATR zeigte in beiden Zelllinien, der MCF7 und der MDA-MB-231 in fast allen Subpopulationen, dass bereits die alleinige Behandlung mit dem VE-821 im Vergleich zur Kontrolle zu kürzeren Chromatinfasern führte und somit auch ohne Bestrahlung RS in den Zellen auslöste. Es konnte außerdem für beide Zelllinien beobachtet werden, dass sich die Wildtypen, ihre strahlenresistenten Klone und insbesondere die ALDH1 positiven Subpopulationen durch VE-821 für Bestrahlung signifikant sensibilisieren lassen. In allen Zellen ist die Replikationsgeschwindigkeit, im Vergleich zur Kontrolle, nach Inhibition von ATR und Bestrahlung stark verringert. Die MCF7 WT Zellen zeigten auch hier eine signifikante Verkürzung der CldU-Markierung, also einen ausgeprägten Bestrahlungseffekt auf die bereits vor Bestrahlung synthetisierte DNA. Dies konnte in der MCF7 RR und MCF7 ALDH1+ im Vergleich zu den nur bestrahlten Proben nicht beobachtet werden. Der Neustart der Replikation in den Populationen mit erhöhtem TSZ Anteil war bei beiden Zelllinien deutlich geringer als in den lediglich bestrahlten Proben, was darauf hindeutet, dass die ATR Inhibition durch VE-821 den RS durch die Bestrahlung signifikant erhöhte. Dieser Effekt gilt in größerem Maße für die ALDH1 positiven Zellen als für die RR Klone und ist bei der MDA-231 Zelllinie, die bereits in der Ausgangspopulation einen höheren TSZ Anteil aufweist, am ausgeprägtesten. Insgesamt zeigte sich also: Je größer der Anteil an TSZ, desto stärker lassen sich die Zellen durch VE-821 für Bestrahlung sensibilisieren. Diese Ergebnisse werden gestützt durch eine Arbeit von Carruthers und Kollegen, die gezeigt haben, dass die gezielte Beeinflussung der RS-Reaktion durch eine kombinierte Hemmung von ATR und PARP ein wirksamer Ansatz zur Überwindung der intrinsischen Strahlenresistenz von Tumorstammzellen des Glioblastoms ist (Carruthers et al., 2018). Zum anderen konnten auch King und Kollegen eine Verkürzung der Chromatinfasern und damit RS nach Inhibition von ATR in Neuroblastomzellen nachweisen, (King et al 2021) Um den RS und seine Konsequenzen durch Inhibition von ATR oder PARP weiter zu bestätigen wäre es gegebenenfalls sinnvoll, weitere Experimente wie z.B. RPA yH2AX foci nach Inhibition durchzuführen [vgl. Toledo et al., 2017: When a Checkpoint Fails because of Exhaustion). Dies war im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht mehr möglich.

#### **4.8 Fazit**

Proteine der DNA-Reparaturmechanismen stellen vielversprechende Zielproteine in der Entwicklung neuer Therapeutika dar. Die Ergebnisse dieser Arbeit werfen insgesamt ein neues Licht auf die Biologie von TSZ und zeigen mögliche neue Therapeutika auf, die das Potenzial haben, die (Re-) Sensibilisierung der Tumor(stamm)zellen für IR zu bewirken. Eine Effektivitätssteigerung der Strahlentherapie könnte die klinischen Ergebnisse bei Brustkrebspatientinnen verbessern, indem sie die Strahlenresistenz von Brustkrebs TSZ überwindet.

## 5. Zusammenfassung

Tumorstammzellen (TSZ) sind eine mögliche Ursache für das Versagen von Bestrahlung im Rahmen der Tumorthherapie. Ihre erhöhte Strahlenresistenz wird hauptsächlich auf eine verstärkte Aktivierung der DNA-Schadensantwort und -Reparatur zurückgeführt. Unklar ist, durch welche Inhibitoren der DNA-Schadensantwort TSZ des Brustkrebses sensibilisiert werden können und welchen Einfluss die Beeinträchtigung von DNA-Replikationsprozessen für diese Sensibilisierung hat. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde in dieser Arbeit ein bereits etabliertes Zellsystem, bestehend aus zwei Brustkrebszelllinien, daraus hergestellten strahlenresistenten Klonen mit stark erhöhtem TSZ-Anteil und daraus isolierten, ALDH1-positiven TSZ eingesetzt. Um strahlenresistenzvermittelnde Signalwege der DNA-Schadensantwort und DNA-Reparaturwege in TSZ des Mammakarzinoms zu identifizieren, wurden diese in einem ersten Schritt inhibiert und die Auswirkungen auf die Strahlenempfindlichkeit anhand des zellulären Überlebens überprüft. Insgesamt zeigten die Daten der vorliegenden Arbeit hierbei, dass die strahlenresistenten Klone mit erhöhtem TSZ-Anteil effektiv mit Olaparib gegen Bestrahlung sensitiviert werden konnten. Darüber hinaus wiesen die Experimente darauf hin, dass auch die Funktionalität des ATR-CHK1- Signalweges für TSZ des Mammakarzinoms von besonderer Bedeutung ist. Die Inhibition von ATM und DNAPKcs führten ebenfalls zu einer signifikanten Strahlensensibilisierung der Zellen mit erhöhtem TSZ-Anteil, sind allerdings unter therapeutischen Gesichtspunkten wegen ihrer Auswirkungen auf das nicht-proliferierende Normalgewebe weniger geeignet als PARPi und ATRi, die nur replizierende Zellen betreffen. Die Ergebnisse zeigten weiterhin eine Korrelation zwischen Strahlenresistenz und TSZ-Anteil. Im zweiten Schritt wurden für die effektivsten Inhibitoren die molekularen Mechanismen der Strahlensensibilisierung durch Untersuchungen von DNA-Replikationsprozessen mittels DNA-Fiber Assay untersucht. Die Ergebnisse legten hierbei nahe, dass: Je höher der Anteil an TSZ, desto geringer waren die Auswirkungen auf DNA-Replikationsprozesse nach der Bestrahlung. Für die Inhibition von PARP konnte in beiden verwendeten Zelllinien beobachtet werden, dass sich sowohl die Wildtypen als auch alle Subpopulationen für Bestrahlung sensibilisieren ließen. Nach Inhibition von ATR ließen sich besonders die Zelllinien, deren Anteil an TSZ hoch ist, für Bestrahlung sensitivieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen mögliche neue Therapeutika auf, die das Potenzial haben, die (Re-) Sensibilisierung der Tumorzellen für Bestrahlung

zu bewirken. Eine Effektivitätssteigerung der Strahlentherapie könnte die klinischen Ergebnisse bei Brustkrebspatientinnen verbessern, indem sie die Strahlenresistenz von Brustkrebs TSZ überwindet.

## 5.1 Summary

Cancer stem cells (CSCs) are a cause of radiation failure in the context of tumor therapy. Their increased resistance to radiation is mainly attributed to enhanced activation of the DNA damage response. It is unclear by which inhibitors of the DNA damage response CSCs of breast cancer can be sensitized and what influence the impairment of DNA replication processes has for this sensitization. To investigate this, an already established cell system consisting of two breast cancer cell lines, radiation-resistant clones with strongly increased CSC content produced from them, and ALDH1-positive CSCs isolated from them was used in this work.

To identify radioresistant signaling pathways of DNA damage response and DNA repair pathways in CSCs of breast carcinoma, these were inhibited in a first step and the effects on radiosensitivity were assessed by cellular survival. Overall, the data of the present work showed here that the radioresistant clones with increased CSC content could be effectively sensitized to radiation with Olaparib. Also, the functionality of the ATR-CHK1- signaling pathway appeared to be of particular importance for CSCs of breast carcinoma. Inhibition of ATM and DNAPKcs also resulted in significant radiation sensitization of cells with increased CSC content. The results further showed a correlation between radiation resistance and CSC percentage. In the second step, for the most effective inhibitors, the molecular mechanisms of radiation sensitization were investigated by studying DNA replication processes by DNA fiber assay. The results here suggested that: The higher the level of CSC, the lower the effects on DNA replication processes after irradiation appeared to be. For inhibition of PARP, it was observed in both cell lines used that both wild-type and all subpopulations could be sensitized to irradiation. After inhibition of ATR, especially the cell lines with a high percentage of CSCs could be sensitized for irradiation. The results of this work indicate possible new therapeutics that have the potential to (re)sensitize tumor cells to irradiation. Increasing the effectiveness of radiotherapy could improve clinical outcomes in breast cancer patients by overcoming the radioresistance of breast cancer CSCs.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

<b>ALDH1</b>	Aldehyddrhydrogenase 1
<b>ATM</b>	Ataxia-Teleangiectasia Mutated
<b>ATR</b>	Ataxia-Teleangiectasia Mutated und RAD3 related
<b>BER</b>	Basen-Exzisionsreparatur
<b>BRCA1</b>	Breast Cancer gene 1
<b>BRCA2</b>	Breast Cancer 2 gene 2
<b>BCSC</b>	Brusttumorstammzellen
<b>CD24</b>	Cluster of Differentiation 24
<b>CD44</b>	Cluster of Differentiation 44
<b>CD 49f</b>	Cluster of Differentiation 49f
<b>CD 133</b>	Cluster of Differentiation 133
<b>CHK1</b>	Checkpoint Kinase 1
<b>CHK2</b>	Checkpoint Kinase 2
<b>CldU</b>	5-Chloro-2'-desoxyuridine
<b>CSCs</b>	Cancer Stem Cells
<b>DEAB</b>	Diethylaminobenzaldehyd
<b>DDR</b>	DNA-Schadensreaktion
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eage'l's Medium
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid
<b>DNA PKcs</b>	DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit
<b>DSB</b>	Doppelstrangbruch
<b>ESB</b>	Einzelstrangbruch
<b>EMT</b>	Epithelial Mesenchymal Transition
<b>FKS</b>	Fetales Kälberserum
<b>FACS</b>	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
<b>GSC</b>	Glioblastoma stem cells
<b>HER2</b>	Human Epidermal Growthfactor Receptor 2
<b>HNSCC</b>	Head and neck squamous cell carcinoma
<b>HR</b>	Homologe Rekombination
<b>IdU</b>	5-Iodo2'-desoxyuridine
<b>IR</b>	Ionisierende Strahlung (engl. ionizing radiation)
<b>NER</b>	Nukleotid-Exzisionsreparatur
<b>NHEJ</b>	Nicht-homologe Endverbindung (engl. Non-homologous end joining)

<b>PARP1</b>	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PE</b>	Plattierungseffizienz
<b>RPA</b>	ReplikationsproteinA
<b>SF</b>	Überleben (engl. Surviving fraction)
<b>SZ</b>	Stammzellen
<b>TSZ</b>	Tumorstammzellen
<b>RS</b>	Replikationsstress



## 7. Literaturverzeichnis

Ablett, M.P.; Singh, J.K.; Clarke, R.B. Stem cells in breast tumours: Are they ready for the clinic? *Eur. J. Cancer* 2012, 48, 2104–2116.

Ahmed, S.U.; Carruthers, R.; Gilmour, L.; Yildirim, S.; Watts, C.; Chalmers, A.J. Selective Inhibition of Parallel DNA Damage Response Pathways Optimizes Radiosensitization of Glioblastoma Stem-like Cells. *Cancer Res.* 2015, 75, 4416–4428.

Ahuja AK, Jodkowska K, Teloni F, Bizard AH, Zellweger R, Herrador R, et al. A short G1 phase imposes constitutive replication stress and fork remodelling in mouse embryonic stem cells. *Nat Commun.* 2016; 7:10660.

Alferez, D.G.; Simoes, B.M.; Howell, S.J.; Clarke, R.B. The Role of Steroid Hormones in Breast and Effects on Cancer Stem Cells. *Curr. Stem Cell Rep.* 2018, 4, 81–94.

Al-Hajj, M.; Wicha, M.S.; Benito-Hernandez, A.; Morrison, S.J.; Clarke, M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 3983–3988.

Andrew N. Blackford, Stephen P. Jackson, ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response, *Molecular Cell*, Volume 66, Issue 6, 2017, Pages 801-817, ISSN 1097-2765.

Arnold, C. R., Mangesius, J., Skvortsova, I. I., & Ganswindt, U. (2020). The Role of Cancer Stem Cells in Radiation Resistance. *Frontiers in Oncology*, 10, 164.

Atun, R.; Jaffray, D.A.; Barton, M.B.; Bray, F.; Baumann, M.; Vikram, B.; Hanna, T.P.; Knaul, F.M.; Lievens, Y.; Lui, T.Y.; et al. Expanding global access to radiotherapy. *Lancet Oncol.* 2015, 16, 1153–1186.

Bao, S.; Wu, Q.; McLendon, R.E.; Hao, Y.; Shi, Q.; Hjelmeland, A.B.; Dewhirst, M.W.; Bigner, D.D.; Rich, J.N. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006, 444, 756–760.

Bartkova, J.; Hamerlik, P.; Stockhausen, M.T.; Ehrmann, J.; Hlobilkova, A.; Laursen, H.; Kalita, O.; Kolar, Z.; Poulsen, H.S.; Broholm, H.; et al. Replication stress and oxidative damage contribute to aberrant constitutive activation of DNA damage signalling in human gliomas. *Oncogene* 2010, 29, 5095–5102.

Bartucci, M.; Svensson, S.; Romania, P.; Dattilo, R.; Patrizii, M.; Signore, M.; Navarra, S.; Lotti, F.; Biffoni, M.; Pillozzi, E.; et al. Therapeutic targeting of Chk1 in NSCLC stem cells during chemotherapy. *Cell Death Differ.* 2012, 19, 768–778.

Battle, E.; Clevers, H. Cancer stem cells revisited. *Nat. Med.* 2017, 23, 1124–1134.

Baumann, M.; Dubois, W.; Suit, H.D. Response of human squamous cell carcinoma xenografts of different sizes to irradiation: Relationship of clonogenic cells, cellular radiation sensitivity in vivo, and tumor rescuing units. *Radiat. Res.* 1990, 123, 325–330.

Baumann, M.; Krause, M.; Hill, R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nat. Rev. Cancer* 2008, 8, 545–554.

Baumann, M.; Krause, M.; Overgaard, J.; Debus, J.; Bentzen, S.M.; Daartz, J.; Richter, C.; Zips, D.; Bortfeld, T. Radiation oncology in the era of precision medicine. *Nat. Rev. Cancer* 2016, 16, 234–249.

Beck, B., Blanpain, C. Unravelling cancer stem cell potential. *Nat Rev Cancer* 13, 727–738 (2013).

Bétermier M, Bertrand P, Lopez BS (2014) Is Non-Homologous End-Joining Really an Inherently Error-Prone Process?. *PLOS Genetics*10(1): e1004086.

Beucher, A., Birraux, J., Tchouandong, L., Barton, O., Shibata, A., Conrad, S., Goodarzi, A.A., Krempler, A., Jeggo, P.A. and Löbrich, M. (2009), ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *The EMBO Journal*, 28: 3413-3427. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.276>

Bjornstrom L, Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol.* 2005;19(4):833–842.

Bochum, S., Berger, S., Martens, U.M. (2018). Olaparib. In: Martens, U. (eds) *Small Molecules in Oncology. Recent Results in Cancer Research*, vol 211. Springer, Cham.

Borgmann, K.; Kocher, S.; Kriegs, M.; Mansour, W.Y.; Parplys, A.C.; Rieckmann, T.; Rothkamm, K. DNA Repair. In *Molecular Radio-Oncology, Recent Results in Cancer Research*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2016; Volume 198, pp. 1–24.

Borrego-Soto G, Ortiz-López R, Rojas-Martínez A. Ionizing radiation-induced DNA injury and damage detection in patients with breast cancer. *Genet Mol Biol.* 2015 Dec;38(4):420-32. doi: 10.1590/S1415-475738420150019. Epub 2015 Nov 24. PMID: 26692152; PMCID: PMC4763322.

Budke B, Logan HL, Kalin JH, Zelivianskaia AS, Cameron McGuire W, Miller LL, Stark JM, Kozikowski AP, Bishop DK, Connell PP. RI-1: a chemical inhibitor of RAD51 that disrupts homologous recombination in human cells. *Nucleic Acids Res.* 2012

Butof, R.; Dubrovskaya, A.; Baumann, M. Clinical perspectives of cancer stem cell research in radiation oncology. *Radiother. Oncol.* 2013, 108, 388–396.

Carruthers, R.; Ahmed, S.U.; Strathdee, K.; Gomez-Roman, N.; Amoah-Buahin, E.; Watts, C.; Chalmers, A.J. Abrogation of radioresistance in glioblastoma stem-like cells by inhibition of ATM kinase. *Mol. Oncol.* 2015, 9, 192–203.

Carruthers, R.D.; Ahmed, S.U.; Ramachandran, S.; Strathdee, K.; Kurian, K.M.; Hedley, A.; Gomez-Roman, N.; Kalna, G.; Neilson, M.; Gilmour, L.; et al. Replication Stress Drives Constitutive Activation of the DNA Damage Response and Radioresistance in Glioblastoma Stem-like Cells. *Cancer Res.* 2018, 78, 5060–5071.

Chang, J.C. Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance. *Medicine* 2016, 95, S20–S25.

Colacino JA, Azizi E, Brooks MD, Harouaka R, Fouladdel S, McDermott SP, et al. Heterogeneity of Human Breast Stem and Progenitor Cells as Revealed by Transcriptional Prolongation. *Stem Cell Rep* (2018) 10(5):1596–609.

Crocker, A.K.; Goodale, D.; Chu, J.; Postenka, C.; Hedley, B.D.; Hess, D.A.; Allan, A.L. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J. Cell Mol. Med.* 2009, 13, 2236–2252.

De Vivo I, Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJ. A functional polymorphism in the progesterone receptor gene is associated with an increase in breast cancer risk. *Cancer Res.* 2003;63(17):5236–5238.

Desai, A.; Webb, B.; Gerson, S.L. CD133+ cells contribute to radioresistance via altered regulation of DNA repair genes in human lung cancer cells. *Radiother. Oncol.* 2014, 110, 538–545.

Diehn, M.; Cho, R.W.; Lobo, N.A.; Kalisky, T.; Dorie, M.J.; Kulp, A.N.; Qian, D.; Lam, J.S.; Ailles, L.E.; Wong, M.; et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 2009, 458, 780–783.

Domina, E.A.; Philchenkov, A.; Dubrovskaya, A. Individual Response to Ionizing Radiation and Personalized Radiotherapy. *Crit. Rev. Oncog.* 2018, 23, 69–92.

Fan C, Oh DS, Wessels L, et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med.* 2006;355(6):560–569.

Foskolou IP, Jorgensen C, Leszczynska KB, Olcina MM, Tarhonskaya H, Haisma B, et al. Ribonucleotide reductase requires subunit switching in hypoxia to maintain DNA replication. *Mol Cell* 2017;66:206–20 e9.

Gallmeier, E and others, Inhibition of Ataxia Telangiectasia- and Rad3 -Related Function Abrogates the In Vitro and In Vivo Tumorigenicity of Human Colon Cancer Cells Through Depletion of the CD133+ Tumor-Initiating Cell Fraction, *Stem Cells*, Volume 29, Issue 3, March 2011, Pages 418–429.

Graham Thomas G.W., Walter Johannes C., Loparo Joseph J., Two-Stage Synapsis of DNA Ends during Non-homologous End Joining, *Molecular Cell*, Volume 61, Issue 6, 2016, Pages 850-858, ISSN 1097-2765.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9. PMID: 10647931.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PMID: 21376230.

Hill, R.P.; Marie-Egyptienne, D.T.; Hedley, D.W. Cancer stem cells, hypoxia and metastasis. *Semin. Radiat. Oncol.* 2009, 19, 106–111.

Hill, R.P.; Milas, L. The proportion of stem cells in murine tumors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1989, 16, 513–518.

Hu Z, Fan C, Oh DS, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics.* 2006;7:96.

Huang F, Mazin AV. A small molecule inhibitor of human RAD51 potentiates breast cancer cell killing by therapeutic agents in mouse xenografts. *PLoS One.* 2014

Hudis CA. Trastuzumab—mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med.* 2007;357(1): 39–51.

Hufnagl, A.; Herr, L.; Friedrich, T.; Durante, M.; Taucher-Scholz, G.; Scholz, M. The link between cell-cycle dependent radiosensitivity and repair pathways: A model based on the local, sister-chromatid conformation dependent switch between NHEJ and HR. *Dna. Repair* 2015, 27, 28–39.

Jazayeri A, Falck J, Lukas C, Bartek J, Smith GC, Lukas J, et al. ATM- and Cell Cycle-Dependent Regulation of ATR in Response to DNA Double-Strand Breaks. *Nat Cell Biol* (2006) 8(1):37–45.

Jette N, Lees-Miller S, The DNA-dependent protein kinase: A multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosis, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, Volume 117, Issues 2–3, 2015, Pages 194-205, ISSN 0079-6107.

Kahn, J.; Hayman, T.J.; Jamal, M.; Rath, B.H.; Kramp, T.; Camphausen, K.; Tofilon, P.J. The mTORC1/mTORC2 inhibitor AZD2014 enhances the radiosensitivity of glioblastoma stem-like cells. *Neuro Oncol.* 2014, 16, 29–37.

Kakarougkas, A.; Jeggo, P.A. DNA DSB repair pathway choice: An orchestrated handover mechanism. *Br. J. Radiol.* 2014, 87, 20130685.

Karanam, K.; Kafri, R.; Loewer, A.; Lahav, G. Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase. *Mol. Cell* 2012, 47, 320–329.

Khodyreva SN, Prasad R, Iliina ES, et al. Apurinic/aprimidinic (AP) site recognition by the 5'-dRP/AP lyase in poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(51):22090-22095

Kim H, George E, Ragland R, Rafail S, Zhang R, Krepler C, et al. Targeting the ATR/CHK1 Axis With PARP Inhibition Results in Tumor Regression in BRCA-Mutant Ovarian Cancer Models. *Clin Cancer Res* (2017) 23(12):3097– 108. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2273

King, D.; Southgate, H.E.D.; Roetschke, S.; Gravells, P.; Fields, L.; Watson, J.B.; Chen, L.; Chapman, D.; Harrison, D.; Yeomanson, D.; et al. Increased Replication Stress Determines ATR Inhibitor Sensitivity in Neuroblastoma Cells. *Cancers* 2021, 13, 6215.

Koch, U.; Krause, M.; Baumann, M. Cancer stem cells at the crossroads of current cancer therapy failures—radiation oncology perspective. *Semin. Cancer Biol.* 2010, 20, 116–124.

Krause, M.; Dubrovskaja, A.; Linge, A.; Baumann, M. Cancer stem cells: Radioresistance, prediction of radiotherapy outcome and specific targets for combined treatments. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2017, 109, 63–73.

Krause, M.; Yaromina, A.; Eicheler, W.; Koch, U.; Baumann, M. Cancer stem cells: Targets and potential biomarkers for radiotherapy. *Clin. Cancer Res.* 2011, 17, 7224–7229.

Kreso, A.; Dick, J.E. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* 2014, 14, 275–291.

Lesueur, P.; Chevalier, F.; El-Habr, E.A.; Junier, M.P.; Chneiweiss, H.; Castera, L.; Muller, E.; Stefan, D.; Saintigny, Y. Radiosensitization Effect of Talazoparib, a Parp Inhibitor, on Glioblastoma Stem Cells Exposed to Low and High Linear Energy Transfer Radiation. *Sci. Rep.* 2018, 8, 3664.

Liu, Y.; Burness, M.L.; Martin-Trevino, R.; Guy, J.; Bai, S.; Harouaka, R.; Brooks, M.D.; Shang, L.; Fox, A.; Luther, T.K.; et al. RAD51 Mediates Resistance of Cancer Stem Cells to PARP Inhibition in Triple-Negative Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* 2017, 23, 514–522.

Lieber, M.R.; Ma, Y.; Pannicke, U.; Schwarz, K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003, 4, 712–720.

Lynn N et al. Cancer of the breast chapter 88 <https://eu-ireland-custom-media-prod.s3-eu-west-1.amazonaws.com/UKMEAEU/eSample/9780323476744-sample-chapter.pdf>

Mandal, P.K.; Blanpain, C.; Rossi, D.J. DNA damage response in adult stem cells: Pathways and consequences. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2011, 12, 198–202.

Mao, Z.; Bozzella, M.; Seluanov, A.; Gorbunova, V. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle* 2008, 7, 2902–2906.

Mao Z, Jiang Y, Liu X, Seluanov A, Gorbunova V (2009) DNA repair by homologous recombination, but not by nonhomologous end joining, is elevated in breast cancer cells. *Neoplasia* 11: 683–691.

Matsuoka, Shuhei, et al. "ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage." *science* 316.5828 (2007): 1160-1166.

MarieEgyptienne, D.T.; Lohse, I.; Hill, R.P. Cancer stem cells, the epithelial to mesenchymal transition (EMT) and radioresistance: Potential role of hypoxia. *Cancer Lett.* 2013, 341, 63–72.

Maya-Mendoza, A., Moudry, P., Merchut-Maya, J.M. et al. High speed of fork progression induces DNA replication stress and genomic instability. *Nature* 559, 279–284 (2018).

Maynard, S.; Schurman, S.H.; Harboe, C.; de Souza-Pinto, N.C.; Bohr, V.A. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis* 2009, 30, 2–10.

Meyer F, Engel AM, Krause AK, Wagner T, Poole L, Dubrovskaja A, Peitzsch C, Rothkamm K, Petersen C, Borgmann K. Efficient DNA Repair Mitigates Replication Stress Resulting in Less Immunogenic Cytosolic DNA in Radioresistant Breast Cancer Stem Cells. *Front Immunol.* 2022 Feb 25;13:765284.

Meyer F, Becker S, Classen S, Parplys AC, Mansour WY, Riepen B, et al. Prevention of DNA Replication Stress by CHK1 Leads to Chemoresistance Despite a DNA Repair Defect in Homologous Recombination in Breast Cancer. *Cells* (2020) 9(1):238.

Meyer, Felix et al. “Efficient DNA Repair Mitigates Replication Stress Resulting in Less Immunogenic Cytosolic DNA in Radioresistant Breast Cancer Stem Cells.” *Frontiers in immunology* vol. 13 765284. 25 Feb. 2022.

Miller AL, Fehling SC, Garcia PL, et al. The BET inhibitor JQ1 attenuates double-strand break repair and sensitizes models of pancreatic ductal adenocarcinoma to PARP inhibitors. *EBioMedicine.* 2019;44:419-430.

Mir, S.E.; De Witt Hamer, P.C.; Krawczyk, P.M.; Balaj, L.; Claes, A.; Niers, J.M.; Van Tilborg, A.A.; Zwinderman, A.H.; Geerts, D.; Kaspers, G.J.; et al. In silico analysis of kinase expression identifies WEE1 as a gatekeeper against mitotic catastrophe in glioblastoma. *Cancer Cell* 2010, 18, 244–257.

Mjelle, R.; Hegre, S.A.; Aas, P.A.; Slupphaug, G.; Drablos, F.; Saetrom, P.; Krokan, H.E. Cell cycle regulation of human DNA repair and chromatin remodeling genes. *Dna. Repair* 2015, 30, 53–67.

Mladenov, E.; Magin, S.; Soni, A.; Iliakis, G. DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: Cell cycle and proliferation-dependent regulation. *Semin. Cancer Biol.* 2016, 37–38, 51–64.

Moncharmont, C.; Levy, A.; Guy, J.B.; Falk, A.T.; Guilbert, M.; Trone, J.C.; Alphonse, G.; Gilormini, M.; Ardail, D.; Toillon, R.A.; et al. Radiation-enhanced cell migration/invasion process: A review. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2014, 92, 133–142.

Morgan, M.A.; Lawrence, T.S. Molecular Pathways: Overcoming Radiation Resistance by Targeting DNA Damage Response Pathways. *Clin. Cancer Res.* 2015, 21, 2898–2904.

Nitta M, Kozono D, Kennedy R, et al. Targeting EGFR induced oxidative stress by PARP1 inhibition in glioblastoma therapy. *PLoS ONE.* 2010;5(5):e10767.

Petrucco S, Percudani R. Structural recognition of DNA by poly(ADP-ribose)polymerase-like zinc finger families. *FEBS J.* 2008;275(5):883-893.

Perou CM. Molecular Stratification of Triple-Negative Breast Cancers. *Oncologist*. 2011;16 Suppl 1:61-70. doi:10.1634/theoncologist.2011-S1-61

Ramakrishna N, Temin S, Chandarlapaty S, et al. Recommendations on disease management for patients with advanced human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer and brain metastases: American society of clinical oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol*. 2014;32(19):2100–2108.

Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitao D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, et al. Breast Cancer Stem Cell Markers CD44, CD24 and ALDH1: Expression Distribution Within Intrinsic Molecular Subtype. *J Clin Pathol* (2011) 64 (11):937–46.

Roos, W.P.; Thomas, A.D.; Kaina, B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat. Rev. Cancer* 2016, 16, 20–33.

Schulz A, Meyer F, Dubrovskaja A, Borgmann K. Cancer Stem Cells and Radioresistance: DNA Repair and Beyond. *Cancers* (Basel). 2019;11(6):862. Published 2019 Jun 21.

Shiloh, Yosef, and Yael Ziv. "The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more." *Nature reviews Molecular cell biology* 14.4 (2013): 197-210.

Sin, W.C.; Lim, C.L. Breast cancer stem cells-from origins to targeted therapy. *Stem Cell Investig*. 2017, 4, 96.

Siraj AK, Pratheeshkumar P, Parvathareddy SK, Divya SP, Al-Dayel F, Tulbah A, Ajarim D, Al-Kuraya KS. Overexpression of PARP is an independent prognostic marker for poor survival in Middle Eastern breast cancer and its inhibition can be enhanced with embelin co-treatment. *Oncotarget*. 2018 Dec 18;9(99):37319-37332.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235(4785):177– 182.

Sorensen CS, Hansen LT, Dziegielewska J, Syljuasen RG, Lundin C, Bartek J, et al. The Cell-Cycle Checkpoint Kinase Chk1 is Required for Mammalian Homologous Recombination Repair. *Nat Cell Biol* (2005) 7(2):195–201.

Sørli T, Tibshirani R, Parker J et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:8418–8423

Thompson R, Montano R, Eastman A. The Mre11 Nuclease Is Critical for the Sensitivity of Cells to Chk1 Inhibition. *PloS One* (2012) 7(8):e44021

Timme, C.R.; Rath, B.H.; O'Neill, J.W.; Camphausen, K.; Tofilon, P.J. The DNA-PK Inhibitor VX-984 Enhances the Radiosensitivity of Glioblastoma Cells Grown In Vitro and as Orthotopic Xenografts. *Mol. Cancer Ther*. 2018, 17, 1207–1216.

Van Vuurden DG, Hulleman E, Meijer OL, et al. PARP inhibition sensitizes childhood high grade glioma, medulloblastoma and ependymoma to radiation. *Oncotarget*. 2011;2(12):984-996.

Vitale, I.; Manic, G.; De Maria, R.; Kroemer, G.; Galluzzi, L. DNA Damage in Stem Cells. *Mol. Cell* 2017, 66, 306–319.

Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell*. 2012;10(6):717-728.

Wang,S.S.;Jiang,J.;Liang,X.H.;Tang,Y.L.Linksbetweencancerstemcellsandepithelial-mesenchymal transition. *Onco Targets Ther*. 2015, 8, 2973–2980.

Wang, Y.; Xu, H.; Liu, T.; Huang, M.; Butter, P.P.; Li, C.; Zhang, L.; Kao, G.D.; Gong, Y.; Maity, A.; et al. Temporal DNA-PK activation drives genomic instability and therapy resistance in glioma stem cells. *JCI Insight* 2018, 3, 98096.

Wicha, M.S.; Liu, S.; Dontu, G. Cancer stem cells: An old idea—A paradigm shift. *Cancer Res*. 2006, 66, 1883–1890.

Wurster S, Hennes F, Parplys AC, et al. PARP1 inhibition radiosensitizes HNSCC cells deficient in homologous recombination by disabling the DNA replication fork elongation response. *Oncotarget*. 2016;7(9):9732-9741.

Zeman MK, Cimprich KA. Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol* 2014;16:2–9.

Zhang, M.; Atkinson, R.L.; Rosen, J.M. Selective targeting of radiation-resistant tumor-initiating cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107, 3522–3527.

Zhaojun Qiu, Nancy L. Oleinick, Junran Zhang, ATR/CHK1 inhibitors and cancer therapy, *Radiotherapy and Oncology*, Volume 126, Issue 3, 2018, Pages 450-464, ISSN 0167-8140.

Zhou,L.;Zhang,Y.;Chen,S.;Kmieciak,M.;Leng,Y.;Lin,H.;Rizzo,K.A.;Dumur,C.I.;Ferreira-Gonzalez,A.; Dai, Y.; et al. A regimen combining the Wee1 inhibitor AZD1775 with HDAC inhibitors targets human acute myeloid leukemia cells harboring various genetic mutations. *Leukemia* 2015, 29, 807–818.



## 8. Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle die Gelegenheit nutzen, um mich bei allen zu bedanken, die mich unterstützt haben und die mir das Verfassen dieser Arbeit ermöglicht haben. Besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. Kerstin Borgmann für die Bereitstellung meines interessanten Themas und die Möglichkeit der Mitarbeit im Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Dr. Felix Meyer, der mir geholfen hat, meine Forschungsfragen zu formulieren, und stets wertvolle Ratschläge und Anregungen gegeben hat. Seine Expertise und sein Engagement haben maßgeblich dazu beigetragen, dass ich meine Experimente effizient durchzuführen und die Ergebnisse analysieren konnte. Vielen Vielen Dank!

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Lena Schuckenbrock bedanken, die mich zu Beginn meiner Arbeit in die Labormethoden einführte, mich beim Durchführen einiger Experimente unterstützte und mir immer hilfsbereit zur Seite stand.

Auch Britta Riepen möchte ich für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Labor danken.

Besonderer Dank gilt auch meiner Familie, meinem Mann Tom, der mich in schwierigen Phasen motiviert hat, meinen Söhnen Finn und Mattis, die während der ganzen Zeit viel Verständnis aufgebracht haben und meinen Eltern für ihre Unterstützung und Motivation und ganz besonders meiner Mutter für das äußerst hilfreiche Korrekturlesen und Lektorat.

## 9. Lebenslauf

<b>Tätigkeit als Ärztin in Weiterbildung Allgemeinmedizin</b>	07/2023 – heute
<b>Approbation als Ärztin</b>	05/2023
<b>Studium Humanmedizin in Hamburg</b> Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf	2016 –2023
<b>Dissertationsarbeit in der Radioonkologie</b> Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie	11/2019 – 07/2021
<b>Verfassen der Dissertationsschrift</b>	07/2022 – 09/2023
<b>Tätigkeit als Grafikerin und Art Direktorin</b>	2004 – 2016
<b>Studium Kommunikationsdesign</b> Hamburger Akademie für Kommunikationsdesign und Art Direktion	1999 – 2003

## 10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....