

**Die Reparatur  
Topoisomerase II $\alpha$ -Inhibitor-induzierter  
DNA-Doppelstrangbrüche und ihre  
Bedeutung für die Therapie**

**DISSERTATION**

Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Universität Hamburg  
Fakultät für Mathematik, Informatik  
und Naturwissenschaften

vorgelegt von

**Ilona Schon**

Hamburg 2006

Gutachter: JProf. Dr. Dorothee Dartsch  
Prof. Dr. Peter Heisig

Datum der Disputation: 20. Oktober 2006

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 2003 bis August 2006 am Institut für Pharmazie der Universität Hamburg unter der Leitung von

**Frau JProf. Dr. Dorothee Dartsch.**

Ihr danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas und die engagierte Betreuung meiner Arbeit, sowie für die stets freundliche Motivation.

Das Korreferat wurde von **Herrn Prof. Dr. Peter Heisig** übernommen, bei dem ich mich ebenfalls herzlich bedanke. **Herrn Prof. Dr. Detlef Geffken** gilt mein Dank für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Des Weiteren möchte ich mich bei **Prof. Dr. Frank Gieseler** von der Universitätsklinik Kiel für die freundliche Bereitstellung der verwendeten Zelllinien bedanken. In diesem Zusammenhang geht zudem ein besonderer Dank an **Dr. Michael Clark** für seine hilfreiche Unterstützung in Sachen Zellkultur.

Den Mitarbeitern des **Arbeitskreis Heisig** und des **Instituts für Toxikologie** in Stellingen danke ich für die Bereitstellung von diversen Gerätschaften und fachlichem Wissen. Mein allergrößter Dank geht dabei an **Frau Jana Hennesen**, die mich stets aktiv unterstützt und wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

**Frau Dr. Andrea Nicola Lübbe**, **Frau Katharina Wehner** und **Herrn Björn Saager** danke ich für ihre Hilfe beim Korrekturlesen. Des Weiteren bedanke ich mich bei **Frau Dr. Katrin Schlüter**, **Frau Steffi Jaeger**, **Frau Dr. Bianca Rickerts**, **Herrn Andreas Soltau**, **Frau Anke Klack**, **Herrn Guido Schmeinck** und **Frau Dr. Judith Roever** sowie allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazie für die angenehme Zusammenarbeit und die Erheiterung der Mittagspause.

Zu guter Letzt möchte ich mich von Herzen bei **meinen Eltern** bedanken, die mir das Pharmaziestudium erst ermöglicht und mich zu jeder Zeit voll unterstützt haben.

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AIF	Apoptosis inducing factor
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
Apaf -1	Apoptotic protease activating factor 1
Arg	Arginin
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
at-MDR	Atypical MDR
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATR	ATM related
AU	Arbitrary units
Bax	Bcl-2-associated protein
Bcl-2	B-cell lymphoma-2 protein
B-CLL	B-cell chronic lymphatic leukemia
BLM	Bloom's syndrome gene
B-NHEJ	Backup-NHEJ
Brca	Breast cancer susceptibility gene
BrdU	5-Bromo-2'-desoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c-Abl	Cellular Abelson leukemia protein tyrosin kinase
Cdk	Cyclin dependent kinase
cDNA	complementary DNA
Chk	Checkpoint homolog
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
dest.	destilliert
DMNB	4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzaldehyd
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS)
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNA-PK <sub>cs</sub>	Katalytische Untereinheit von DNA-PK
D-NHEJ	DNA-PK-abhängiges NHEJ
DOX	Doxorubicin
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol

EC <sub>50</sub>	Effektive Konzentration 50 %
ECL™	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
ETO	Etoposid
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FADD	Fas-associated death domain
Fas	Apoptosis stimulating fragment
FasL	Fas-Ligand
FBS	Foetal bovine serum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FSC	Forward Scatter
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
His	Histidin
Ho33258	Hoechst-Farbstoff 33258 (Bisbenzimid H33258)
HR	Homologe Rekombination
IC <sub>50</sub>	Inhibitorische Konzentration 50 %
IgG	Immunglobulin G
IRF-1	Interferon regulatory factor 1
LMPA	Low melting point agarose
LRP	Lung resistance-related protein
MAPK	Mitogen activated protein kinase
Mdm2	Murine double minute 2
MDR	Multidrug resistance
Mre11	Meiotic recombination protein 11
mRNA	messenger RNA
MRP1	Multidrug resistance-associated protein
Nbs1	Nijmegen breakage syndrome 1
NHEJ	Non-homologous end joining
NSCLC	Non-small cell lung cancer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
P-gp	P-Glykoprotein
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PP <sub>i</sub>	Anorganisches Pyrophosphat
PVDF	Polyvinylidendifluorid

RIPA	Radio Immunoprecipitation Assay
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure (RNS)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	ribosomal RNA
SAPK	Stress-activated protein kinase
SCLC	Small cell lung cancer
SDS	Sodium dodecyl sulfate
siRNA	small interfering RNA
SSA	Single strand annealing
SSC	Reagenz: Saline sodium citrate FACS: Forward Scatter
SUMO-1	Small ubiquitin-related modifier 1
T*	Temporärer Zustand
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
TNF-R <sub>1</sub>	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
Topo II $\alpha$	Topoisomerase II $\alpha$
TRADD	TNF receptor-associated death domain
V(D)J	Variable (diversity) joining
Xrcc	X-ray cross-complementing protein

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>VORWORT</b> .....	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1 Darmkrebs</b> .....	<b>2</b>
1.1.1 Inzidenz und Therapie .....	2
1.1.2 Kolonkarzinomzellen in der Forschung .....	2
<b>1.2 Ascites</b> .....	<b>3</b>
1.2.1 Definition.....	3
1.2.2 Asciteszellen in der Forschung.....	4
<b>1.3 Topoisomerasen</b> .....	<b>5</b>
1.3.1 Typ-I-Topoisomerasen .....	5
1.3.2 Typ-II-Topoisomerasen .....	5
<b>1.4 Topo II<math>\alpha</math>-Inhibitoren</b> .....	<b>8</b>
1.4.1 Entdeckung und Struktur .....	8
1.4.2 Molekulare Effekte .....	9
1.4.3 Bioverfügbarkeit und Metabolisierung .....	11
1.4.4 Topo II $\alpha$ -Inhibitoren in der Therapie .....	12
<b>1.5 DNA-Reparatur</b> .....	<b>13</b>
1.5.1 Non-homologous end-joining (NHEJ) .....	14
1.5.2 Homologe Rekombination (HR) .....	17
1.5.3 Regulation der DNA-Reparatur.....	19
<b>1.6 Apoptose und Nekrose</b> .....	<b>22</b>
1.6.1 Charakteristische Veränderungen.....	22
1.6.2 Mechanismen der Apoptoseinduktion.....	23
<b>1.7 Zelluläre Resistenzmechanismen</b> .....	<b>25</b>
1.7.1 Allgemeine Resistenzmechanismen .....	25
1.7.2 Resistenzen bei Topo II $\alpha$ -Inhibitoren.....	25
<b>2 FRAGESTELLUNG</b> .....	<b>28</b>
<b>3 ERGEBNISSE</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1 Untersuchungen am Zellmodell HT-29</b> .....	<b>30</b>
3.1.1 Auswahl geeigneter Inkubationsbedingungen.....	30
3.1.2 DNA-Schädigung durch Topo II $\alpha$ -Inhibitoren.....	31

3.1.3	Bestimmung des intrazellulären Doxorubicingehalts .....	34
3.1.4	Morphologische Untersuchung .....	36
3.1.5	Charakterisierung des Zelltods und der Zytotoxizität .....	39
3.1.6	Untersuchung der an der DNA-Reparatur beteiligten Proteine ...	54
3.1.7	Expressionshemmung und Inhibition von DNA-Reparaturproteinen .....	61
3.1.8	Ergebnisüberblick.....	74
<b>3.2</b>	<b>Untersuchungen mit Patientenzellen .....</b>	<b>75</b>
3.2.1	DNA-Schädigung durch Topo II $\alpha$ -Inhibitoren.....	75
3.2.2	Bestimmung des zellulären Doxorubicingehalts von Ascites-1-Zellen .....	79
3.2.3	Analyse der DNA-Reparaturproteine im Vergleich mit HT-29-Zellen .....	80
3.2.4	Untersuchungen zur Zytotoxizität .....	83
3.2.5	Ergebnisüberblick.....	88
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>89</b>
<b>4.1</b>	<b>Aspekte der DNA-Reparatur in der Zelllinie HT-29 .....</b>	<b>89</b>
4.1.1	Verlauf des Topo II $\alpha$ -Inhibitor-induzierten DNA-Schadens .....	89
4.1.2	Betrachtung der zytotoxischen Effekte .....	93
4.1.3	Diskussion möglicher DNA-Reparaturmechanismen .....	103
4.1.4	Modell zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen .....	113
<b>4.2</b>	<b>DNA-Reparatur und Resistenz in primären Zellen.....</b>	<b>115</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>120</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>122</b>
<b>7</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN.....</b>	<b>124</b>
<b>7.1</b>	<b>Geräte .....</b>	<b>124</b>
<b>7.2</b>	<b>Zellkultur.....</b>	<b>125</b>
7.2.1	HT-29.....	125
7.2.2	Ascites-Zelllinie 1.....	126
7.2.3	Ascites-Zelllinie 2.....	126
7.2.4	Mykoplasmen-Test .....	127
<b>7.3</b>	<b>Mikroskopie .....</b>	<b>128</b>
7.3.1	Lichtmikroskopie.....	128



---

<b>7.4</b>	<b>Methoden zur Untersuchung der DNA .....</b>	<b>129</b>
7.4.1	Comet-Assay .....	129
<b>7.5</b>	<b>Methoden zur Proteinuntersuchung.....</b>	<b>131</b>
7.5.1	Proteinisolierung.....	131
7.5.2	Western Blot .....	133
7.5.3	Slot Blot.....	135
<b>7.6</b>	<b>Transfektion mit siRNA.....</b>	<b>136</b>
<b>7.7</b>	<b>Zytotoxizitätstests .....</b>	<b>138</b>
7.7.1	Colony Formation Assay .....	138
7.7.2	alamar Blue™-Assay.....	139
7.7.3	Bestimmung der Zahl abgelöster Zellen .....	139
<b>7.8</b>	<b>Durchflusszytometrie (FACS).....</b>	<b>140</b>
7.8.1	Annexin V-Färbung.....	140
7.8.2	Bestimmung des intrazellulären DOX-Gehalts.....	142
7.8.3	Zellzyklusanalyse .....	143
<b>7.9</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>144</b>
<b>7.10</b>	<b>Gefahrstoffverzeichnis .....</b>	<b>145</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>148</b>
	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>163</b>



### Vorwort

Jährlich erkranken weltweit mehr als 10 Millionen Menschen an Krebs, darunter allein 425.000 in Deutschland. Obwohl die Forschung auf diesem Gebiet in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte erzielen konnte, erliegen in Deutschland pro Jahr immer noch 210.000 Krebspatienten ihrer Erkrankung<sup>[1]</sup>. Zwar konnten sowohl die operative Tumorentfernung als auch die chemotherapeutischen Behandlungsmöglichkeiten deutlich verbessert werden, doch liegen die größten Probleme der antineoplastischen Therapie nach wie vor in der unspezifischen Toxizität der eingesetzten Substanzen und in der Ausbildung von Resistenzen des Tumors gegenüber diesen Zytostatika. Für die Patienten bedeutet die Chemotherapie daher weiterhin, die typischen unerwünschten Wirkungen wie Übelkeit und Erbrechen, Knochenmarksdepression, Schleimhautläsion und Haarausfall erleiden zu müssen, ohne eine Garantie für den Erfolg der Therapie zu haben.

Die Resistenzentwicklung ist somit von besonderer klinischer Bedeutung, da sie für das Scheitern der meisten Therapien und letztendlich für den Tod des Patienten verantwortlich ist. Aus diesem Grund ist es wichtig, in der Krebsforschung nicht nur nach neuen Therapieoptionen und Angriffspunkten zu suchen, sondern auch die bereits eingesetzten Arzneistoffe und ihre Wirkmechanismen eingehend zu erforschen. Denn obwohl viele Zytostatika bereits seit Jahren auf der Basis von empirischen Beobachtungen eingesetzt werden, so ist doch oft wenig über ihre molekularen Mechanismen bekannt. Die Vermeidung von Resistenzen ist in der Praxis jedoch nur möglich, wenn die theoretischen Hintergründe ihrer Entstehung bekannt sind.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, inwieweit die DNA-Reparatur eine Bedeutung für die Sensitivität bzw. Resistenz von Kolonkarzinomzellen gegenüber Topo II $\alpha$ -Inhibitoren hat. Sie soll somit einen Beitrag zum Verständnis der Resistenzentwicklung in soliden Tumoren leisten.

# 1 Einleitung

## 1.1 Darmkrebs

### 1.1.1 Inzidenz und Therapie

Unter dem Begriff Darmkrebs werden bösartige Tumore des Kolons und Rektums sowie des Anus zusammengefasst. Nach Angaben des Robert-Koch-Instituts wurde in Deutschland im Jahr 2002 bei rund 71.400 Einwohnern eine entsprechende Diagnose gestellt. Damit rangiert Darmkrebs hierzulande insgesamt auf Platz eins der Krebserkrankungen und wird in seiner Inzidenz bei Frauen lediglich von Brustkrebs und bei Männern von Prostatakrebs übertroffen. Das durchschnittliche Alter bei der Ersterkrankung beträgt bei Männern 69, bei Frauen 75 Jahre; die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 56 %. Pro Jahr sterben in Deutschland rund 30.000 Patienten an Darmkrebs <sup>[1]</sup>.

Den größten Anteil unter den genannten Unterarten des Darmkrebses besitzen kolorektale Karzinome, also maligne Tumore im Bereich des Dick- und Mastdarms. Analkarzinome treten hingegen äußerst selten auf. Die Therapie von kolorektalen Karzinomen besteht primär in der operativen Entfernung des Tumors und des angrenzenden Gewebes. Bei ungünstiger Prognose oder Metastasierung wird eine adjuvante Chemotherapie angeschlossen. Mittel der Wahl ist hierbei die Kombination von 5-Fluorouracil mit Folsäure. Bei Nicht-Ansprechen kann die Kombinations-therapie auch durch Oxaliplatin, Irinotecan oder Capecitabin ergänzt oder ganz durch diese ersetzt werden. Bei Rektumkarzinomen wird zusätzlich eine adjuvante Radiotherapie durchgeführt <sup>[2]</sup>.

### 1.1.2 Kolonkarzinomzellen in der Forschung

Aufgrund der klinischen Häufigkeit der Erkrankung sind Kolonkarzinomzellen auch in der Forschung von großer Bedeutung. So stammen sieben von 60 eingesetzten Zelllinien im *in vitro*-Screeningtest des amerikanischen National Cancer Institute aus dem Bereich Darmkrebs, darunter auch die hier

verwendete Zelllinie HT-29<sup>[3]</sup>. Grundsätzlich werden Kolonkarzinomzellen oftmals als Modell für solide Tumore verwendet und mit einer Vielzahl von Agenzien getestet. Dazu gehören neben Substanzen aus dem Bereich der Ernährung<sup>[4, 5]</sup> und der antineoplastischen Therapie<sup>[6]</sup> auch Chemotherapeutika, die nicht in der Behandlung des Kolonkarzinoms eingesetzt werden<sup>[7, 8]</sup>.

Die Zellen der Linie HT-29 wurden im Jahr 1964 von Fogh<sup>[9]</sup> aus dem primären Tumor einer 44-jährigen Patientin mit kolorektalem Adenokarzinom isoliert. Sie besitzen eine G→A-Punktmutation an Position 1032 des p53-Gens, was zu einer Arg→His-Substitution im Codon 273 führt. Die Folge ist eine Überproduktion von nicht-funktionalem p53-Protein<sup>[10, 11]</sup>.

## 1.2 Ascites

### 1.2.1 Definition

Der Begriff Ascites kommt von griechisch askites und beschreibt die Ansammlung von Flüssigkeit in der freien Bauchhöhle. Man unterscheidet entzündlichen, nichtentzündlichen, chylösen und hämorrhagischen Ascites. Der entzündliche Ascites tritt vor allem infolge einer Peritonitis auf und wird durch einen entzündlich bedingten Austritt von Flüssigkeit und Zellen aus den Blut- und Lymphgefäßen gebildet. Der nichtentzündliche Ascites entsteht unter anderem bei portaler Hypertension, Leberzirrhose, metastastischen Tumoren des Gastrointestinaltrakts, Peritonealkarzinom sowie Herzinsuffizienz und nephrotischem Syndrom. Er entsteht aufgrund allgemeiner oder lokaler Flüssigkeitsstauungen infolge abnormaler Durchlässigkeit der Kapillaren oder pathologischer Zusammensetzung des Bluts und der Körperkolloide. Chylöse Ascites entstehen dagegen durch Austritt von Lymphflüssigkeit bei Lymphabflussstörungen. Hämorrhagische Ascites mit Blutbeimengungen sind Folge eines Traumas oder einer Gefäßruptur<sup>[12]</sup>. In der Onkologie treten vorwiegend nicht-entzündliche Ascites auf. Sie werden in diesem Zusammenhang auch als maligne Ascites bezeichnet.

Die Diagnose von Ascites erfolgt durch Messen des Bauchumfangs, sonographische Diagnostik sowie durch zytologische Untersuchung

## Einleitung

---

abgenommener Ascitesflüssigkeit. Die Therapie richtet sich nach den Symptomen und der Ursache des Ergusses. Als Behandlungsprinzip der ersten Wahl wird bei malignen Ascites, neben der Punktion, die diuretische Behandlung mit Furosemid und Spironolacton empfohlen. Bei Versagen dieser Therapie kann eine intraperitoneale Chemotherapie mit Mitoxantron erfolgen <sup>[13, 14]</sup>. Als letzte Palliativmaßnahme gilt die operative Anwendung eines peritoneo-venösen Shunts <sup>[15]</sup>.

Neben Flüssigkeitsansammlungen in der Bauchhöhle kommt es bei Tumorpatienten auch zu Pleuraergüssen, d.h. Flüssigkeitsansammlungen in der Pleurahöhle. Sie entstehen durch metastatischen Befall der Pleurablätter und werden ebenfalls durch Punktion therapiert <sup>[12]</sup>.

### 1.2.2 Asciteszellen in der Forschung

Da maligne Ergüsse bei Tumorpatienten in der Regel durch Metastasen des Primärtumors entstehen, enthält die punktierte Flüssigkeit gestreute Tumorzellen. Diese lassen sich wie in Abschnitt 6.1 beschrieben in Kultur nehmen und in ihren Eigenschaften mit Zellen des Primärtumors bzw. mit Zelllinien der gleichen Tumorart vergleichen.

Asciteszellen zeichnen sich dabei durch eine veränderte biologische Aktivität aus. Insbesondere die Sensitivität gegenüber Zytostatika ist häufig verringert, was ein besonderes Problem für die chemotherapeutische Behandlung darstellt <sup>[16, 17]</sup>. Diese Änderungen der zellulären Eigenschaften sind zum Einen auf den durch die Therapie entstandenen Selektionsdruck zurückzuführen, zum Anderen auf genetische Instabilität <sup>[17]</sup>.

Asciteszellen sind somit ein geeignetes Modell zur Untersuchung von Resistenzmechanismen.

### 1.3 Topoisomerasen

Topoisomerasen sind DNA-schneidende Enzyme, deren Aufgabe die Änderung der Topologie, also des Verdrillungsgrades der DNA ist. Grundsätzlich gibt es zwei Typen von Topoisomerasen, welche sich durch ihren Reaktionsmechanismus unterscheiden: Typ-I-Topoisomerasen schneiden nur einen Strang der DNA und benötigen dazu keine Energie in Form von ATP. Typ-II-Topoisomerasen durchtrennen hingegen unter ATP-Verbrauch beide DNA-Stränge <sup>[18]</sup>.

#### 1.3.1 Typ-I-Topoisomerasen

In humanen Zellen wurden bisher drei Typ-I-Topoisomerasen identifiziert: Topoisomerase I, Topoisomerase III $\alpha$  und Topoisomerase III $\beta$  <sup>[19]</sup>. Diese lassen sich wiederum in Typ-IA (Topo III) und Typ-IB (Topo I) unterteilen. Während die Enzyme des Typs IA nur in der Lage sind, negativ überspiralisierte DNA zu relaxieren, können die des Typs IB Superhelices beider Vorzeichen entspannen. Alle Typ-I-Topoisomerasen liegen monomer vor <sup>[20]</sup>.

#### 1.3.2 Typ-II-Topoisomerasen

In menschlichen Zellen wurden zwei Isoenzyme der Typ-II-Topoisomerasen nachgewiesen, Topoisomerase II $\alpha$  und Topoisomerase II $\beta$  <sup>[21]</sup>. Beide liegen als Dimer zweier identischer Polypeptide vor und können wie Topoisomerase I Superhelices beider Vorzeichen relaxieren, allerdings durch Trennung beider DNA-Stränge <sup>[20, 22]</sup>. Die Eigenschaften der Topoisomerasen sind noch einmal in Tabelle 1.1 zusammen gefasst.

Für diese Arbeit ist besonders das Topoisomerase II $\alpha$ -Isoenzym (Topo II $\alpha$ ) von Bedeutung. Topo II $\alpha$  katalysiert ATP-abhängig die DNA-Strangtrennung und -passage und ist so ein wichtiges Enzym bei der DNA-Replikation sowie der Chromosomenkondensation und -trennung während der Mitose <sup>[18, 20]</sup>. Die Exprimierung erfolgt daher vor allem in der späten S- sowie in der G<sub>2</sub>-Phase <sup>[23]</sup>. Topo II $\beta$  hingegen wird über den gesamten Zellzyklus konstant exprimiert <sup>[24, 25]</sup>.

## Einleitung

<i>Klassifizierung</i>	<i>Aufbau</i>	<i>Relaxation</i>	<i>Aufgaben</i> <sup>[18, 26]</sup>
<b>Typ-I-Topoisomerasen</b>			
Topoisomerase I	Monomer	Positiv und negativ superhelikale DNA	DNA-Replikation, RNA-Transkription, Chromosomentrennung
Topoisomerase III $\alpha$	Monomer	Negativ superhelikale DNA	Weitgehend unbekannt, Topo III $\alpha$ vermutlich beteiligt bei DNA-Replikation
Topoisomerase III $\beta$			
<b>Typ-II-Topoisomerasen</b>			
Topoisomerase II $\alpha$	Homodimer	Positiv und negativ superhelikale DNA	DNA-Replikation, RNA-Transkription, Chromosomentrennung
Topoisomerase II $\beta$	Homodimer		Unbekannt

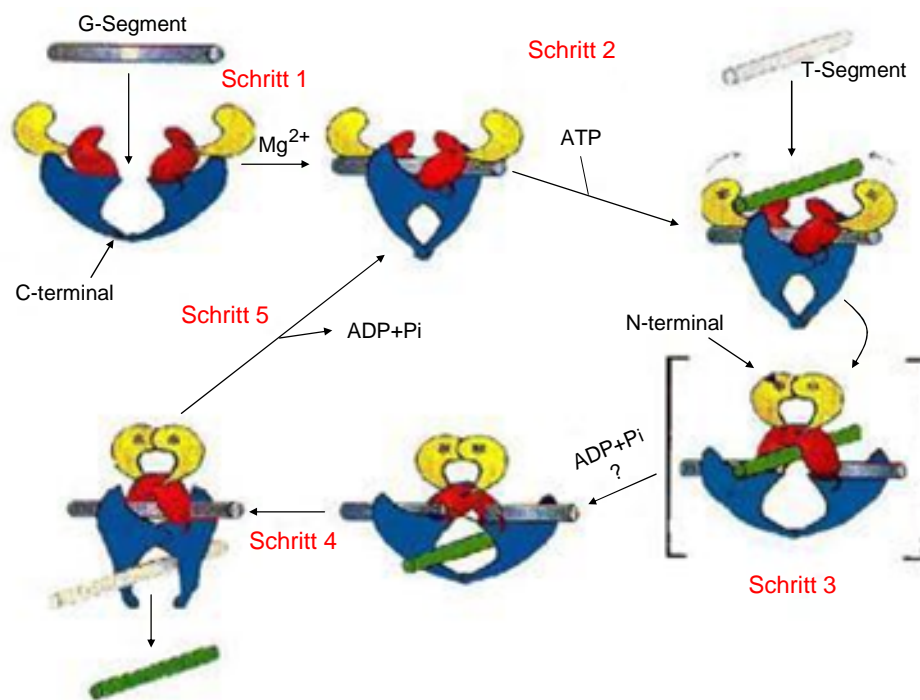
**Tabelle 1.1:** Einteilung der eukaryontischen Topoisomerasen

Topo II $\alpha$  besteht aus einer N-terminalen Domäne für die Bindung und Hydrolyse von ATP, einer zentralen Domäne für die Durchtrennung und spätere Ligation der DNA-Stränge und einem C-terminalen Bereich, der nicht an der Enzymaktivität beteiligt ist, diese aber vermutlich ebenso wie die Lokalisation des Enzyms an der DNA reguliert <sup>[27]</sup>. Eine Analyse der Kristallstruktur hat zudem ergeben, dass das Topo II $\alpha$ -Dimer herzförmig gebaut ist und zwei große Taschen aufweist, in die die DNA-Doppelhelix aufgenommen werden kann <sup>[28]</sup>. Für das Verständnis des Mechanismus von Topo II $\alpha$ -Inhibitoren ist zunächst der Mechanismus der Topo II $\alpha$  in seinen einzelnen Schritten zu betrachten (Abbildung 1.1): Topo II $\alpha$  interagiert mit zwei DNA-Doppelsträngen. Ein Doppelstrang wird von dem Enzym durchgeschnitten (G-Segment) und ein weiterer durch die entstandene Lücke passagiert (T-Segment). Im ersten Schritt nimmt die Topoisomerase dabei zunächst ein G-Segment über ihre N-terminale Öffnung auf und bindet daran (Schritt 1). Nach anschließender Bindung von ATP (Schritt 2) dimerisiert das Enzym auch N-terminal, wobei das T-Segment erfasst wird (Schritt 3).



## Einleitung

Gleichzeitig wird der DNA-Doppelstrang des G-Segments durchgeschnitten. Hierbei kommt es zu einer kovalenten Bindung zwischen DNA und Topoisomerase. Dieser Komplex wird als Cleavage Complex bezeichnet. Durch die entstandene Lücke wird dann das intakte T-Segment, wahrscheinlich unter ATP-Verbrauch, passagiert. Im weiteren Verlauf kommt es zur Religation des gesetzten Doppelstrangbruchs und zum Austritt des T-Segments über das nun geöffnete C-terminale Ende des Enzyms (Schritt 4). Abschließend wird ADP freigesetzt, so dass die Topo II $\alpha$  in ihre ursprüngliche Konformation zurückkehrt (Schritt 5) und sich vom G-Segment ablösen kann (nicht abgebildet) <sup>[20, 28, 29]</sup>. Nach einmaligem Durchlaufen des Zyklus ist die Topologie der DNA folglich um eins geändert.



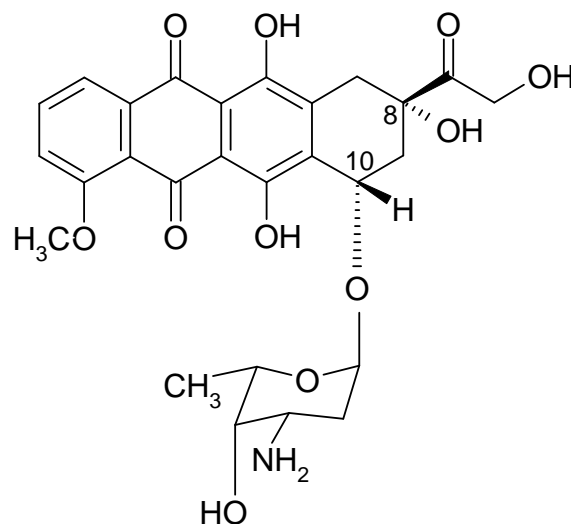
**Abbildung 1.1:** Der katalytische Mechanismus der Typ-II-Topoisomerasen, nach Berger und Wang 1996 <sup>[29]</sup>.

## 1.4 Topo II $\alpha$ -Inhibitoren

### 1.4.1 Entdeckung und Struktur

Obwohl es in der klinischen Anwendung heute eine Reihe von Topo II $\alpha$ -inhibierenden Zytostatika gibt, gehören diese zu nur zwei Klassen: den Anthrachinon-Derivaten, die neben den Anthracyclinen Daunorubicin, Doxorubicin, Idarubicin und Epirubicin das Anthracendion Mitoxantron umfassen, und die Epipodophyllotoxine Etoposid und Teniposid.

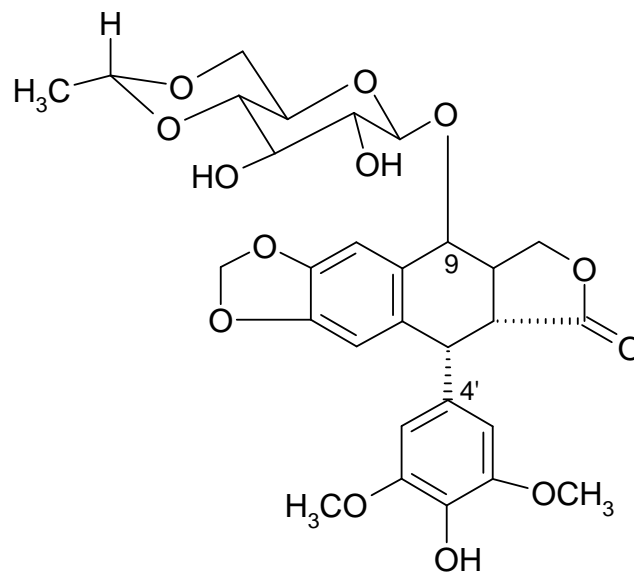
Die Entdeckung der Anthracycline erfolgte im Jahr 1963, als Daunorubicin in zwei unabhängigen Laboratorien aus dem Kulturmedium von *Streptomyces coeruleorubidus* isoliert und als antineoplastisch wirksame Substanz nachgewiesen werden konnte. 1969 wurde aus *Streptomyces peucetius* als nächste und potentere Substanz dieser Klasse Doxorubicin (DOX) gewonnen. Es besteht aus dem coplanaren Doxorubicinon-Aglykon und dem  $\alpha$ -glykosidisch verknüpften Aminozucker L-Daunosamin und unterscheidet sich von Daunorubicin nur durch eine zusätzliche Hydroxylgruppe am C8-Substituenten <sup>[30]</sup>.



**Abbildung 1.2:** Struktur von Doxorubicin (DOX)

## Einleitung

Die Synthetisierung von Etoposid (ETO) erfolgte erstmals 1966, als versucht wurde, Podophyllotoxin zu derivatisieren. Podophyllotoxin ist ein aus den Rhizomen von Podophyllumarten gewonnenes Mitosegift, das zwar eine starke antineoplastische Aktivität besitzt, aufgrund seiner Toxizität jedoch für die Therapie ungeeignet ist. Der Durchbruch gelang durch die partialsynthetische Umwandlung zu 4'-Desmethyl-9-epipodophyllotoxin<sup>[31]</sup>. Durch glykosidische Bindung an 4,6-O-Ethyliden-β-D-glucopyranosid gelangte man schließlich zu Etoposid.



**Abbildung 1.3:** Struktur von Etoposid (ETO)

### 1.4.2 Molekulare Effekte

Sowohl Anthracycline als auch Epipodophyllotoxine inhibieren die Topo II $\alpha$ . Sie unterscheiden sich jedoch in ihrem Mechanismus: Während die Epipodophyllotoxine durch direkte Hemmung des Enzyms wirken, geschieht dies bei den Anthracyclinen auf indirektem Weg.

Im klinisch relevanten Konzentrationsbereich hat DOX zwei für die erwünschte Wirkung bedeutsame Effekte: die Interkalation in die DNA und die Hemmung der Topo II $\alpha$ <sup>[32]</sup>. Die Interkalation von DOX erfolgt durch das planare Ringsystem des Moleküls, welches sich sequenzabhängig zwischen die Basen der DNA-Doppelhelix schiebt. Der entstehende Komplex wird durch Wasserstoffbrücken stabilisiert. Die Ausbildung erfolgt von den DNA-

## Einleitung

---

Basen zum interkalierten Molekülteil des DOX sowie zu der  $\text{NH}_2$ -Gruppe des gewinkelt vorliegenden Aminozyckers, der auf diese Weise in der kleinen Furche der DNA bindet<sup>[33, 34]</sup>. Die Interkalation führt zu einer sterischen Veränderung der DNA<sup>[33]</sup>, die die Arbeit der Helikasen beeinträchtigt und nachfolgend zur Inhibition der DNA- und RNA-Synthese führt<sup>[30]</sup>. Trifft ein Topo II $\alpha$ -Enzym auf interkaliertes DOX, so kommt es zur sequenzabhängigen Bindung von DOX an den Cleavage Complex<sup>[34-36]</sup>. Durch Einwirkung der Replikations- oder Transkriptionsmaschinerie wird die Topo II $\alpha$  von der DNA abgelöst, und es resultieren freie DNA-Doppelstrangbrüche<sup>[27, 37]</sup>.

Darüber hinaus werden bei den Anthracyclinen weitere Wirkmechanismen wie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies mit nachfolgender Lipidperoxidation diskutiert. Die Radikalbildung erfolgt durch Reduktion des chinoiden Ringsystems zum Semichinon-Radikal und wird durch Enzyme wie NADH-Dehydrogenase, Cytochrom P450-Reduktase und Xanthin-Oxidase vermittelt. Durch das Semichinon-Radikal können wiederum Superoxide, Wasserstoffperoxid und Hydroxyl-Radikale gebildet werden, die letztlich zur Peroxidation von Membranlipiden führen. Dieser Effekt scheint allerdings weniger an der antineoplastischen Wirkung beteiligt zu sein, sondern die unerwünschte Kardiotoxizität von DOX zu verursachen. Dafür sprechen zwei Beobachtungen: Erstens ist das myokardiale Gewebe besonders arm an Enzymen, die vor dem schädlichen Einfluss von Radikalen schützen, und zweitens lässt sich durch Gabe von Radikalfängern zwar die Kardiotoxizität verringern, nicht jedoch die Zytotoxizität<sup>[32, 38]</sup>.

Während die Hemmung der Topo II $\alpha$  bei den Anthracyclinen sekundär nach Interkalation in die DNA erfolgt, sind Epipodophyllotoxine wie ETO in der Lage, das Enzym selbst zu hemmen. Sie fixieren den Cleavage Complex und stabilisieren somit das Stadium, in dem der Doppelstrangbruch gesetzt ist und die entstandenen DNA-Enden kovalent an Topo II $\alpha$  gebunden sind. Die Passage des zweiten Stranges und die anschließende Ligation des Strangbruchs können so nicht stattfinden<sup>[31, 39]</sup>. Wie bei den Anthracyclinen wird Topo II $\alpha$  schließlich durch die Einwirkung der Replikations- oder Transkriptionsmaschinerie von der DNA abgelöst, und es resultieren ebenfalls freie Doppelstrangbrüche<sup>[27, 31, 37]</sup>. Zudem erfolgt die Topo II $\alpha$ -Inhibition auch hier sequenzabhängig<sup>[34]</sup>.

### 1.4.3 Bioverfügbarkeit und Metabolisierung

Die Applikation von DOX erfolgt parenteral, da es nach oraler Gabe im Gastrointestinaltrakt zur Spaltung der glykosidischen Bindung und somit zur Inaktivierung des Moleküls kommt<sup>[40]</sup>. Die orale Bioverfügbarkeit beträgt daher nur 5 %<sup>[41]</sup>. DOX diffundiert schnell vom Plasma ins Gewebe und akkumuliert dort aufgrund seiner hohen DNA-Bindungsaffinität<sup>[40]</sup>. Das Verteilungsvolumen beträgt 20 bis 30 l/kg<sup>[42, 43]</sup>, wobei man dieser Betrachtung ein Drei-Kompartiment-Modell zu Grunde legt<sup>[44]</sup>. DOX und seine Metabolite lassen sich auch in Ascites und pleuralen Ergüssen nachweisen<sup>[45]</sup>.

Der Hauptmetabolit von DOX ist Doxorubicinol<sup>[40]</sup>. Es entsteht durch enzymatische Reduktion der Ketofunktion in der C8-Seitenkette zum Alkohol, vermittelt durch die im Zytosol lokalisierte NADPH-abhängige Aldo-Keto-Reduktase<sup>[46]</sup>. Des Weiteren entstehen vorwiegend DOX-Aglyka wie Doxorubicinon, 10-Desoxydoxorubicin-Aglykon und 10-Desoxydoxorubicinol-Aglykon, sowie in geringen Mengen verschiedene Glucuronide und Sulfate<sup>[40]</sup>. Im Gegensatz zu den Aglyka, die durch den Verlust des L-Daunosamins ihre Fähigkeit zur Interkalation<sup>[44]</sup> und damit ihre Zytotoxizität eingebüßt haben, ist Doxorubicinol zytotoxisch wirksam<sup>[47]</sup>. Die Ausscheidung von DOX und seinen Metaboliten erfolgt vorwiegend biliär, weniger als 10 % werden über den Urin ausgeschieden<sup>[40]</sup>. Die Elimination unterliegt keinem enterohepatischen Kreislauf<sup>[48]</sup>.

ETO besitzt eine orale Bioverfügbarkeit von ca. 50 %<sup>[40]</sup>, das Prodrug ETO-Phosphat eine Bioverfügbarkeit von 68 %. ETO-Phosphat wird nach Resorption ins Plasma rasch durch alkalische Phosphatasen in ETO umgewandelt<sup>[31, 49]</sup>.

Die Elimination erfolgt vorwiegend renal, vor allem in den ersten 12 Stunden nach Applikation. Ein Drittel der Substanz wird dabei unverändert ausgeschieden<sup>[50, 51]</sup>. Der Hauptmetabolit von ETO ist das Glucuronid. Daneben entstehen das 100-fach schwächer wirksame *cis*-Lacton-Isomer, ein unwirksames Hydroxysäure-Derivat und 4'-Desmethyl-9-epipodophyllotoxin. Letzteres ist das Aglykon von ETO. Es wirkt vermutlich wie Podophyllotoxin über Hemmung des Tubulusaufbaus<sup>[40]</sup>.

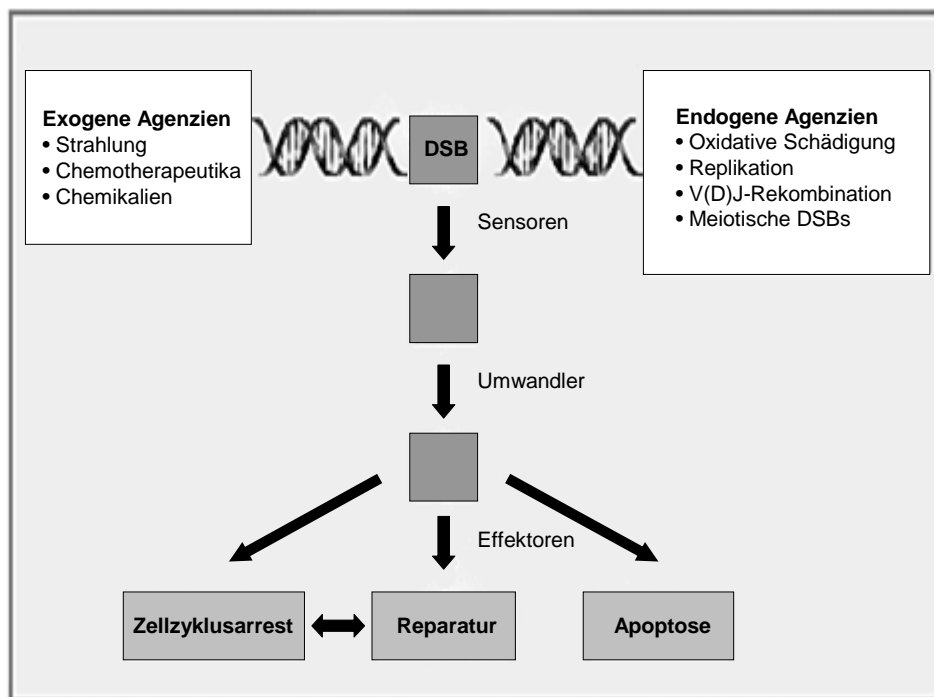
### 1.4.4 Topo II $\alpha$ -Inhibitoren in der Therapie

DOX ist unter anderem bei Magen-, Mamma- und Bronchialkarzinomen, Osteo- und Weichteilsarkomen sowie beim Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphom induziert. Die Gabe erfolgt in der Regel alle drei bis vier Wochen als Bolus oder als Infusion über 24 bis 96 Stunden. Die Dosis liegt zwischen 50 und 75 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche. Alternativ dazu können auch wöchentlich 10-20 mg/m<sup>2</sup> verabreicht werden<sup>[52]</sup>. Die Blutplasmakonzentration erreicht Werte zwischen 0,097  $\mu$ g DOX/ml (entsprechend 0,2  $\mu$ M) nach 96-stündiger Infusion und 6,35  $\mu$ g/ml (13,1  $\mu$ M) nach Bolusgabe. Intrazellulär werden sogar 9,900  $\mu$ g/ml (18,2  $\mu$ M) erreicht. Eine Stunde nach Infusionsende sind diese Werte jedoch bereits auf ca. 10 % der maximalen Plasmakonzentration zurückgegangen. Die Elimination verläuft in drei Phasen: Die erste Phase hat eine durchschnittliche Halbwertszeit von  $t_{1/2\alpha} = 5$  min, die zweite von  $t_{1/2\beta} = 1,2$  h und die dritte  $t_{1/2\gamma} = 26,2$  h<sup>[42, 53-56]</sup>. Intrazellulär beträgt die Eliminationshalbwertszeit 110 h<sup>[56]</sup>.

ETO ist induziert bei Bronchial-, Hoden- und Chorionkarzinomen, sowie beim Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphom. Es kann sowohl als Infusion als auch oral verabreicht werden. Die Infusionen erfolgen an fünf aufeinander folgenden Tagen mit Dosierungen von 50-100 mg ETO/m<sup>2</sup> Körperoberfläche täglich oder mit 120-150 mg/m<sup>2</sup> an den Tagen 1, 3 und 5. Das Therapieintervall beträgt in Abhängigkeit von der Erholung der hämatologischen Parameter (Leukozyten, Thrombozyten) drei bis vier Wochen<sup>[57]</sup>. Darüber hinaus kommen auch Hochdosis-Regime zum Einsatz, bei denen bis zu 1800 mg/m<sup>2</sup> über 72 Stunden infundiert<sup>[58]</sup> oder als einmalige Kurzinfusion 300 bis zweimal 3500 mg/m<sup>2</sup> gegeben werden<sup>[59]</sup>. Bei oraler Gabe liegt die Dosis zwischen 100 und 200 mg/m<sup>2</sup> an den Tagen 1 bis 5; das Intervall beträgt ebenfalls drei bis vier Wochen<sup>[60]</sup>. Auch hier gibt es abweichende Schemata, in denen ETO meist niedriger dosiert wird<sup>[61-63]</sup>. Der Plasmaspiegel nach Infusion beträgt 4,26  $\mu$ g ETO/ml (entspricht 7,2  $\mu$ M) bis 17,7  $\mu$ g/ml (30,1  $\mu$ M)<sup>[49, 64, 65]</sup>. Bei den Hochdosis-Regimen liegt er zwischen 30  $\mu$ g/ml (51  $\mu$ M) und 75  $\mu$ g/ml (127,4  $\mu$ M)<sup>[58, 59]</sup>. Nach oraler Gabe werden maximale Plasmakonzentrationen zwischen 1,3  $\mu$ g/ml (2,2  $\mu$ M) und 42  $\mu$ g/ml (71,4  $\mu$ M) gemessen<sup>[49, 61-63, 66-68]</sup>. Die Elimination von ETO läuft zweiphasig ab, mit einer Plasmahalbwertszeit von  $t_{1/2\alpha} = 0,9$ -4,6 h für die erste Phase und  $t_{1/2\beta} = 6,4$ -12,4 h für die zweite<sup>[49, 61-65, 69]</sup>.

## 1.5 DNA-Reparatur

Das Genom einer Zelle ist diversen schädigenden Einflüssen ausgesetzt, die zur Entstehung von Doppelstrangbrüchen in der DNA führen können. Hierzu zählen sowohl exogene Faktoren wie ionisierende Strahlen und Chemikalien als auch endogene Schädigungen durch reaktive Sauerstoffspezies und Replikation sowie Doppelstrangbrüche, die im Rahmen der Meiose gebildet werden (Abbildung 1.4). Da bereits ein einziger Doppelstrangbruch für eine Zelle letal sein kann<sup>[70]</sup>, verfügen Eukaryonten über zwei Systeme zur schnellen und effektiven Reparatur: Das Non-homologous end-joining (NHEJ) und die homologe Rekombination (HR)<sup>[71]</sup>. Werden die entstandenen Doppelstrangbrüche nicht repariert, kommt es zum Zelltod.



**Abbildung 1.4:** Mögliche Reaktionen auf DNA-Doppelstrangbrüche, nach Khanna und Jackson<sup>[72]</sup>. Eukaryontische Zellen können entweder die Strangbrüche reparieren und unterstützend den Verlauf des Zellzyklus blockieren, oder aber den programmierten Zelltod initiieren.

### 1.5.1 Non-homologous end-joining (NHEJ)

NHEJ galt lange Zeit als der in höheren Eukaryonten vorwiegend genutzte Mechanismus zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen. Dennoch gibt es zunehmend Beweise, dass die HR eine größere Rolle spielt als bisher angenommen <sup>[71, 72]</sup>.

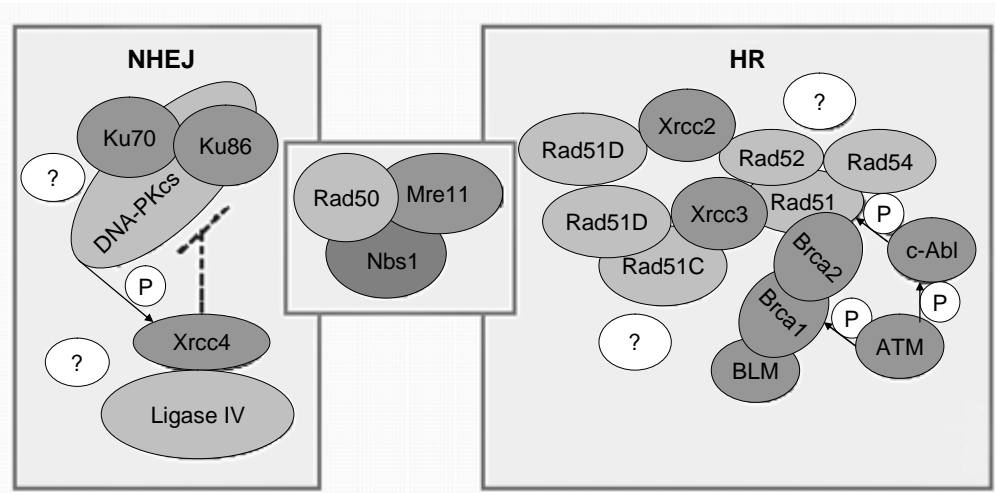
Die Vorteile des NHEJ liegen auf der Hand: Zum Einen erfolgt die Reparatur der Strangbrüche sehr schnell nach deren Entstehung (Halbwertszeit 10-30 min) <sup>[73]</sup>, zum Anderen benötigt NHEJ im Gegensatz zur HR weder Homologie zwischen den zu kombinierenden DNA-Enden, noch einen ungeschädigten Partner <sup>[72]</sup>. Damit kann NHEJ in jeder Phase des Zellzyklus erfolgen. NHEJ lässt sich also als eine Art „Erste Hilfe-Reparatur“ bezeichnen bei der zwei nebeneinander liegende DNA-Enden, oft nach kurzer Degradierung, verbunden werden, ohne jedoch auf Zusammengehörigkeit zu achten. Aus diesem Grund ist NHEJ relativ fehlerträchtig und häufig durch kleine Sequenzverluste gekennzeichnet <sup>[72]</sup>. Da für die Reparatur kein Schwesterchromatid als Vorlage benötigt wird, ist NHEJ in der G<sub>0</sub>-, G<sub>1</sub>- und frühen S-Phase des Zellzyklus der dominierende Reparaturmechanismus <sup>[72, 74]</sup>.

Abbildung 1.5 gibt eine Übersicht über die am NHEJ beteiligten Proteine. Von zentraler Bedeutung ist der DNA-PK-Komplex, dessen Proteine Ku70, Ku86 und DNA-PK<sub>cs</sub> konstitutiv hoch exprimiert werden und für die Schadenserkenkung zuständig sind <sup>[71]</sup>. Die beiden Ku-Proteine, deren Molekulargewicht 70 bzw. 86 kDa beträgt, bilden dazu ein ringförmiges Heterodimer, welches ein freies DNA-Ende des Doppelstrangbruchs durch seine innere Öffnung fädelt und anschließend DNA-PK<sub>cs</sub> binden kann. Die Protein-DNA-Interaktion wird dabei durch ionische Wechselwirkungen zwischen dem positiv geladenen Ringinneren und der nach außen negativen DNA stabilisiert <sup>[75, 76]</sup>.

DNA-PK<sub>cs</sub> ist die katalytische Untereinheit von DNA-PK, einer DNA-abhängigen Serin-Threonin-Proteinkinase. Sie weist Ähnlichkeit mit den Phosphatidylinositol-Kinasen auf und aktiviert durch Phosphorylierung diverse Substrate, darunter die für NHEJ relevanten Reparaturproteine sowie p53 <sup>[71, 77]</sup>.



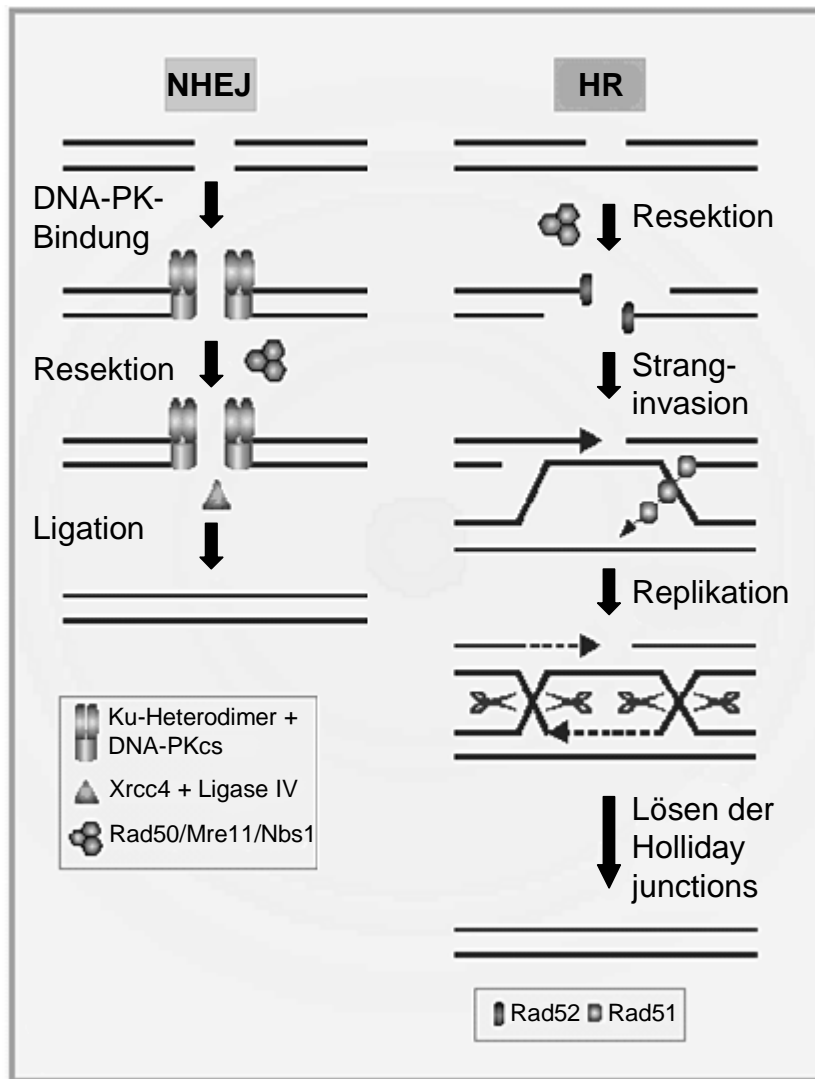
## Einleitung



**Abbildung 1.5:** Komponenten von NHEJ und HR, nach Khanna und Jackson <sup>[72]</sup>.

Der Mechanismus des NHEJ wird in Abbildung 1.6 links dargestellt <sup>[72]</sup>: Im ersten Schritt bindet jeweils ein Heterodimer der Proteine Ku70 und Ku86 an ein freies DNA-Ende. Dadurch aktiviert und bindet es je ein Molekül DNA-PK<sub>cs</sub>. Der entstandene Komplex, DNA-PK genannt, aktiviert durch Phosphorylierung nachfolgend den Mre11/Rad50/Nbs1-Komplex <sup>[77]</sup>, der als Endo- und Exonuklease fungiert. Durch ihn können die zu verbindenden DNA-Enden zugeschnitten werden <sup>[74]</sup>. Abschließend kommt es zur Assoziation zweier Ku-Heterodimere, wodurch die beiden DNA-Enden wie eine Brücke verbunden werden <sup>[78]</sup>, und zur Ligation des Doppelstrangbruchs mittels der durch DNA-PK phosphorylierten Proteine Xrcc4 und DNA-Ligase IV <sup>[77]</sup>.

Die besondere Rolle des NHEJ für die Viabilität von Zellen wird durch die Untersuchung NHEJ-defekter Zellen oder Mäuse verdeutlicht. Sie sind gekennzeichnet durch verminderte DNA-Reparatur, Hypersensitivität gegenüber Strahlung und eine erhöhte Anzahl neoplastischer Transformationen <sup>[77]</sup>. NHEJ liefert also einen wichtigen Beitrag zum Erhalt der genetischen Stabilität. Zudem werden die bei der V(D)J-Rekombination der Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Gene entstehenden DNA-Doppelstrangbrüche mittels NHEJ repariert <sup>[77]</sup>.



**Abbildung 1.6:** Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, nach Khanna und Jackson <sup>[72]</sup>.

In den letzten Jahren haben sich Indizien gehäuft, die auf zwei unterschiedliche NHEJ-Reparaturwege hindeuten. So beobachtete die Arbeitsgruppe um Iliakis und Wang <sup>[73, 79]</sup> in bestrahlten M059K- und DT40-Zellen das Auftreten einer schnell ablaufenden (Halbwertszeit 10-30 min) und einer langsamen Reparaturphase (2-10 h). Da letztere auch in Rad51-, Rad52- und Rad54-defekten Zellen auftraten, gehen Iliakis et al. davon aus, dass es sich bei dieser Phase nicht um HR-vermittelte Reparatur handelt. Interessanterweise ist die schnelle Reparaturphase in DNA-PK<sub>cs</sub>-, Ku70- und DNA-Ligase IV-defekten Zellen ebenso wie nach Behandlung mit dem DNA-PK-Inhibitor Wortmannin nicht zu beobachten. Die induzierten

## Einleitung

---

Doppelstrangbrüche werden jedoch über 24 Stunden betrachtet nahezu ebenso effektiv durch die langsame Variante entfernt<sup>[73, 79, 80]</sup>. Die Arbeitsgruppe postuliert daher die Existenz eines schnellen, DNA-PK-abhängigen NHEJ-Weges (D-NHEJ) und eines langsamen, DNA-PK-unabhängigen Weges als „backup“ (B-NHEJ). Dabei sei D-NHEJ, wenn DNA-PK vorhanden ist, dominant<sup>[73]</sup>. Die Unterdrückung von B-NHEJ beruht dabei vermutlich auf der Bindung von DNA-PK an die DNA-Enden, die so nicht für B-NHEJ zugänglich sind<sup>[81]</sup>. Allerdings konnten bislang keine Komponenten des B-NHEJ identifiziert werden. Ein wahrscheinlicher Kandidat ist DNA-Ligase III, die bisher durch die Reparatur von Einzelstrangbrüchen und die Entfernung methylierter und alkylierter Basen bekannt ist<sup>[82]</sup>.

### 1.5.2 Homologe Rekombination (HR)

Der Ablauf der homologen Rekombination ist wesentlich komplexer als der des Non-homologous end-joining. Die Interaktion zwischen den beteiligten Proteinen konnte zudem bislang nicht vollständig aufgeklärt werden.

Als sicher gilt der folgende Ablauf (Abbildung 1.6 rechte Seite): Zunächst werden bei der HR die freien DNA-Enden des Doppelstrangbruchs durch den auch beim NHEJ beteiligten Mre11/Rad50/Nbs1-Komplex in 5'→3'-Richtung zugeschnitten und durch Bindung von Rad52 vor weiterem Abbau durch Exonukleasen geschützt. Die entstandenen 3'-Einzelstrang-Enden dringen nachfolgend mit Hilfe von Rad51 in die DNA-Doppelhelix eines homologen, ungeschädigten Partnermoleküls ein. Dort werden sie durch DNA-Polymerase verlängert, wobei der komplementäre DNA-Strang des homologen Partners als Vorlage dient. Die dabei erzeugten Überkreuzungen der DNA-Stränge („Holliday junctions“) werden abschließend gelöst, so dass zwei intakte DNA-Doppelstränge erhalten werden<sup>[72]</sup>.

Eine Variante der HR ist das Single strand annealing (SSA). Hierbei binden die 3'-Einzelstrang-Enden nicht an komplementäre DNA-Sequenzen, die auf einem homologen Chromosom lokalisiert sind, sondern an Sequenzen, die auf beiden Seiten des Doppelstrangbruchs wiederholt werden. Nach Zuschneiden und anschließender Ligation des Strangbruchs kommt es dabei zum Verlust einer Wiederholung<sup>[72]</sup>. SSA ist nicht Rad51-abhängig<sup>[83]</sup>.

## Einleitung

---

Verglichen mit NHEJ besitzt HR sowohl Vor- als auch Nachteile. Nachteilig ist, dass für die HR ein ungeschädigter, homologer DNA-Abschnitt benötigt wird, also eine Sequenzwiederholung oder ein Schwesterchromatid<sup>[83]</sup>. Letzteres tritt jedoch erst in der späten S- sowie in der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus auf, weshalb die HR nur in diesem Zeitraum den bevorzugten Weg zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen darstellt<sup>[71]</sup>. Allerdings ist die HR dank dieses Schritts durch eine deutlich höhere Präzision gekennzeichnet, da die zu komplettierende Sequenz von einer intakten Matrize abgelesen wird. Die Reparatur erfolgt jedoch langsamer als bei NHEJ<sup>[73]</sup>.

Das zentrale Protein der HR ist Rad51. Es gehört wie die meisten HR-Proteine zur Rad52-Familie<sup>[71]</sup> und ist essentiell für die Katalyse der Stranginvasion in das homologe Molekül<sup>[72]</sup>. Rad51 wird vor allem in der S- und G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus gebildet<sup>[84]</sup> und wandert nach Schädigung der DNA vom Zytosol in den Nukleus<sup>[85]</sup>, wo es mit Rad52 sowie Brca1 und Brca2 in Form von Foki co-lokalisiert wird<sup>[71, 72, 86]</sup>. Zudem wird Rad51 auch ohne Einwirkung genotoxischer Agenzien im Rahmen der meiotischen und mitotischen Rekombination zum Erhalt der Chromosomenstabilität benötigt<sup>[71]</sup>. Ein homozygoter Verlust bewirkt daher eine frühe embryonale Sterblichkeit<sup>[87]</sup>.

Rad52 und Rad54-defekte Mäuse erweisen sich hingegen als vital, mit leicht verringerter HR<sup>[88, 89]</sup>. Rad54 ist eine DNA-abhängige Helikase, deren Aufgabe hauptsächlich in der Unterstützung der Rad51-Fokusbildung liegt<sup>[72]</sup>. Zudem wird eine Rolle im Chromatin-Umbau während der HR vermutet<sup>[90]</sup>. Rad52 bindet an die freien DNA-Enden des Doppelstrangbruchs und schützt sie so vor Exonukleasen. Das Protein konkurriert also mit den Ku-Proteinen des NHEJ<sup>[91]</sup>.

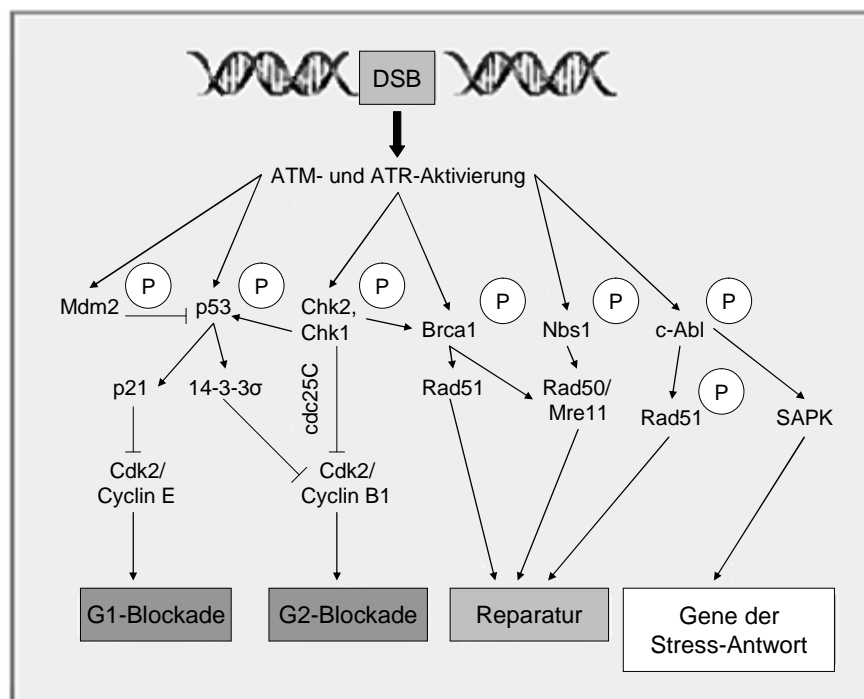
Darüber hinaus sind bei der HR eine Reihe weiterer Proteine beteiligt, die die Reparatur regulieren, darunter Brca1 und Brca2, sowie c-Abl und ATM (Abbildung 1.5). Auf sie wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

## Einleitung

### 1.5.3 Regulation der DNA-Reparatur

Die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen aktiviert in der Zelle nicht nur die beiden erwähnten Reparaturwege, sondern ein komplexes Netzwerk mittels dessen die Reparatur mit Prozessen wie Zellzyklusfortschritt, DNA-Replikation, Transkription und post-transkriptionaler Aktivierung diverser Gene, sowie Apoptose koordiniert wird.

Im Zentrum dieses Netzwerkes steht das Protein ATM (Abbildung 1.7). Es gehört zur gleichen Familie wie DNA-PK<sub>cs</sub> und besteht somit aus einer DNA-bindenden Domäne und einer mit Phosphatidylinositol-Kinase-verbundenen katalytischen Domäne<sup>[77]</sup>. Ein weiterer Verwandter ist ATR. ATM wird nach Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen auf noch ungeklärte Weise aktiviert. Zur Diskussion stehen sowohl eine Strangbruchbasierte Aktivierung durch Nbs1/Mre11/Rad50 oder das Protein 53BP1<sup>[92]</sup>, als auch eine indirekte Mobilisierung durch Änderungen in der Chromatinstruktur<sup>[93]</sup>. Das aktivierte ATM sowie zum Teil auch ATR und DNA-PK<sub>cs</sub> phosphorylieren nachfolgend Proteine des Zellzyklus, der DNA-Reparatur, des JNK-Wegs und der Apoptose.



**Abbildung 1.7:** Zelluläre Antwort auf die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen, nach Khanna und Jackson<sup>[72]</sup>. P steht für eine Phosphorylierung des gekennzeichneten Proteins. Pfeile bedeuten Aktivierung, Querbalken Inhibition des nachfolgenden Schrittes.

## Einleitung

---

Für die Regulierung der DNA-Reparatur, insbesondere HR, stehen drei Proteine im Vordergrund: Nbs1, Brca1 und c-Abl. Nbs1 aktiviert nach Phosphorylierung Rad50 und Mre11 und co-lokalisiert mit diesen in nukleären Foki, die vermutlich an Doppelstrangbrüchen lokalisiert sind<sup>[71]</sup>. Brca1 und c-Abl sind für die Regulation von Rad51 zuständig. Brca1 bewirkt dies durch subzelluläre Relokalisation von Rad51 vom Zytoplasma in den Nukleus via Brca2<sup>[83]</sup>. Zudem co-lokalisiert es mit dem Nbs1/Rad50/Mre11-Komplex<sup>[72]</sup>. c-Abl reguliert Rad51 hingegen durch Phosphorylierung<sup>[83]</sup>. Gleichzeitig induziert es die zelluläre Stressantwort durch Aktivierung von SAPK<sup>[72]</sup> und kann so Apoptose auslösen.

Rad51 wird vorwiegend post-translational reguliert. Neben der bereits erwähnten Phosphorylierung und subzellulären Relokalisation, sind dies die Konjugation an SUMO-1 und der Abbau durch Caspasen<sup>[83]</sup>. Die Sumoylierung hat einen negativ-regulatorischen Einfluss auf die HR. Allerdings ist die exakte Bedeutung noch unklar<sup>[83, 94]</sup>. Der Abbau durch Caspasen erfolgt im Verlauf der Apoptose parallel mit der nukleosomalen Degradierung der DNA<sup>[95]</sup>. Diese Korrelation ist zu erwarten, da eine Reparatur dem erwünschten Abbau der DNA entgegenwirken würde.

Ein weiteres Protein, das zur Induktion der Apoptose führen kann, ist der Tumorsuppressor p53. Ihm fällt eine Art Kontrollfunktion zu, mit Hilfe derer die Zelle zwischen Zellzyklusblockade einerseits und Zelltod andererseits entscheiden kann. Die Entscheidung hängt davon ab, ob der DNA-Schaden reparierbar ist oder nicht<sup>[96]</sup>. p53 hat unter normalen physiologischen Umständen eine relativ kurze Halbwertszeit von 20 min. Es wird jedoch nach DNA-Schädigung unter anderem durch ATM, c-Abl, Chk1, Chk2, DNA-PK und SAPK phosphoryliert, was eine Stabilisierung und Akkumulation des Proteins zur Folge hat. Das aktivierte p53 induziert die Transkription von p21 und 14-3-3 $\sigma$ , welche nachfolgend die für die Zellzyklusprogression essentiellen Cdk/Cyclin-Komplexe inhibieren<sup>[97, 98]</sup>. Die Folge ist eine Blockade des Zellzyklus am G<sub>1</sub>/S- bzw. G<sub>2</sub>/M-Checkpoint. Durch diese Blockierung wird die Replikation geschädigter DNA (G<sub>1</sub>/S) bzw. die Separation schadhafter Chromosomen (G<sub>2</sub>/M) verhindert<sup>[77]</sup> und die Reparatur innerhalb eines vorbestimmten Zeitfensters ermöglicht<sup>[99]</sup>. Auch Chk1 und Chk2 verhindern durch Phosphorylierung der Cdc25C-Tyrosin-

## Einleitung

---

phosphatase eine Inhibition des Cdk2/CyclinB1-Komplexes und bewirken ebenfalls einen G<sub>2</sub>/M-Block <sup>[97]</sup>.

Die p53-vermittelte Induktion der Apoptose beruht auf der Verschiebung des Gleichgewichts zwischen pro- und anti-apoptotischen Proteinen wie Bax und Bcl-2. Auf weitere Details der Apoptose wird in Abschnitt 1.6 eingegangen. Weitere Funktionen von p53 sind die Rad51-assoziierte Hemmung der HR <sup>[94]</sup> und die Regulation der Expression zahlreicher Gene durch direkte Bindung an die DNA. Hierzu gehört auch die Expression von Mdm2, welches p53 durch Blockade seiner Transaktivierungsdomäne inaktivieren kann. Die Mdm2-Expression ist also eine autoregulatorische Rückkopplung <sup>[98]</sup>. Auch eine Beeinflussung der Topo II $\alpha$ -Aktivität über deren Ligase-Funktion wird diskutiert <sup>[100]</sup>.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eukaryontische Zellen eine Vielzahl an Möglichkeiten besitzen, auf die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen zu reagieren. Dabei scheint noch lange nicht geklärt zu sein, durch welche Faktoren letztlich die Entscheidung für einen bestimmten Weg getroffen wird, zumal jene untereinander vielfältig vernetzt sind.

Auch die Wahl zwischen HR und NHEJ wird von diversen Faktoren beeinflusst, wie z.B. der Zellzyklusphase, der Anzahl der Strangbrüche und dem Angebot an Rad52- und Ku-Proteinen am Strangbruch. Diese Proteine besitzen Schlüsselrollen in der Initiation von HR bzw. NHEJ und konkurrieren miteinander um die Bindung an die DNA-Enden <sup>[91]</sup>. Zudem gilt als wahrscheinlich, dass sich die beiden Reparaturwege nicht gegenseitig ausschließen, sondern ergänzen und vervollständigen können <sup>[83]</sup>. So vermuten Hansen et al. <sup>[101]</sup>, dass durch HR komplizierte Doppelstrangbrüche repariert werden, für die NHEJ zuvor nicht möglich gewesen ist. Als kompliziert gilt ein Doppelstrangbruch, wenn die überhängenden DNA-Enden nicht komplementär sind oder weitere Schäden in den Nukleotiden aufweisen. Ein einfacher Doppelstrangbruch weist dagegen zwei gerade Enden oder komplementäre Überhänge auf <sup>[102]</sup>. Iliakis und Wang <sup>[73, 79]</sup> spekulieren dagegen, dass alle Strangbrüche zunächst durch NHEJ geschlossen und durch bislang unidentifizierte Proteine als temporärer Zustand T\* gekennzeichnet werden. Dieser soll dann durch HR erkannt und wenn notwendig überarbeitet werden können. Weitere Erkenntnisse auf diesem Gebiet bleiben abzuwarten.

### 1.6 Apoptose und Nekrose

Der Zelltod lässt sich anhand des morphologischen und biochemischen Ablaufs in zwei Arten unterteilen, die von unterschiedlicher Bedeutung für das umliegende Gewebe sind: Apoptose und Nekrose. Während die Nekrose meist durch akute Noxen wie Hyperthermie, Hypoxie, Toxine oder Komplementfaktoren ausgelöst wird<sup>[96]</sup> und nicht von der Zelle beeinflusst werden kann, ist die Apoptose ein von der Zelle aktiv regulierter Vorgang. Sie wird daher auch als programmierter Zelltod bezeichnet<sup>[103]</sup>.

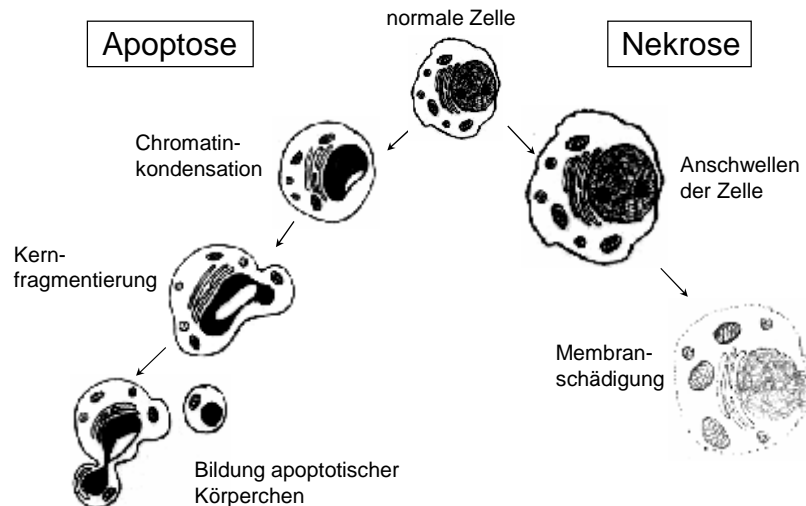
#### 1.6.1 Charakteristische Veränderungen

Morphologisch betrachtet gliedert sich die Apoptose in zwei Phasen: In der ersten Phase kommt es zu einem Lösen der apoptotischen Zelle von ihren Nachbarn sowie zur Kondensation von Chromatin und Zytoplasma. Zudem beobachtet man eine Fragmentierung des Nukleus und die Ausbildung kleiner Vesikel an der Zellmembran. Diese werden nach und nach von der Zelle abgeschnürt. Sie enthalten einen Teil der Zellorganellen und werden als apoptotische Körperchen bezeichnet. In der zweiten Phase werden diese Körperchen von umgebenden Zellen phagozytiert und intrazellulär wiederverwertet. Dadurch ist die Apoptose ein ökonomisch sinnvoller Prozess. Ihr größter Vorteil gegenüber der Nekrose ist jedoch, dass die Zellmembran in allen Stadien intakt bleibt, so dass der Zellinhalt nicht in den Extrazellulärraum gelangt und es nicht zur Entzündung kommt. Die Apoptose wird daher physiologisch zur Entfernung alter und geschädigter Zellen verwendet und erhält die zelluläre Homöostase. Zudem ist sie entscheidend an der embryonalen Entwicklung beteiligt, beispielsweise bei der Ausbildung der Finger- und Zehenzwischenräume<sup>[104]</sup>.

Die Nekrose ist dagegen durch Verlust der Membranintegrität und ein damit verbundenes Anschwellen der gesamten Zelle inklusive Nukleus, endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien gekennzeichnet. Letztendlich kommt es zur Ruptur der Zellmembran und zum Austritt des Zellinhalts in den Extrazellulärraum, wodurch eine Entzündung des betroffenen Gewebes hervorgerufen wird<sup>[105]</sup>.

Abbildung 1.8 zeigt die morphologischen Unterschiede apoptotischer und nekrotischer Zellen.





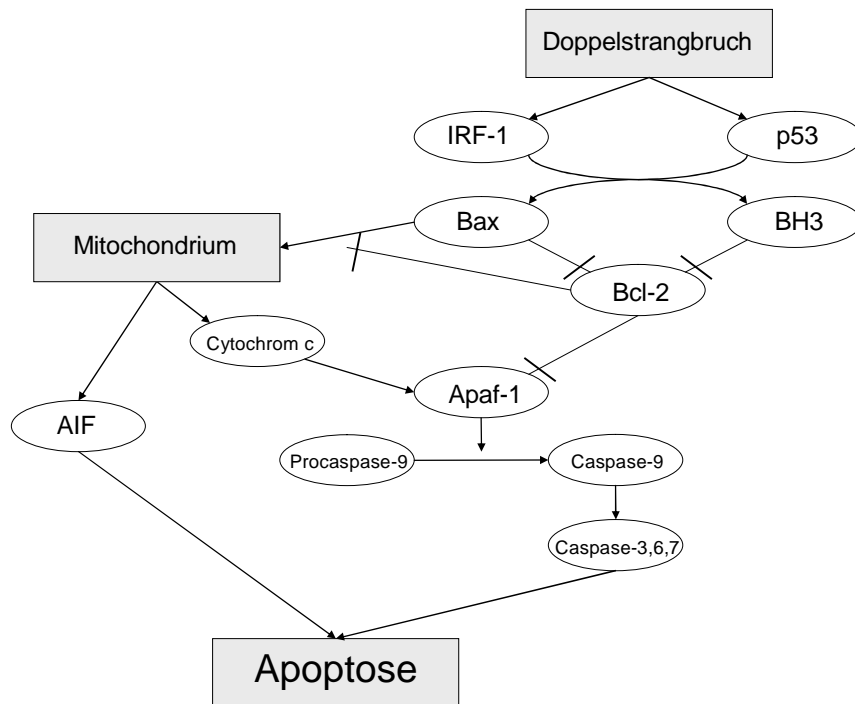
**Abbildung 1.8:** Morphologische Veränderungen apoptotischer und nekrotischer Zellen, Dartsch 1999 <sup>[103]</sup>.

## 1.6.2 Mechanismen der Apoptoseinduktion

Die Apoptose kann auf unterschiedliche Weise ausgelöst werden. Der nach Behandlung mit Zytostatika übliche Weg ist der bereits in Abschnitt 1.5.3 angesprochene Bcl-2-abhängige Pfad <sup>[97]</sup>, auch als intrinsischer Weg bezeichnet (Abbildung 1.9). Er wird wie in Abschnitt 1.5.3 beschrieben durch Stabilisierung von p53 initiiert, was eine verstärkte Expression der Bax- und BH3-ähnlichen Proteine zu Ungunsten der Bcl-2-ähnlichen Proteine zur Folge hat <sup>[70, 98]</sup>. Gleiches wird durch den Transkriptionsfaktor IRF-1 erreicht <sup>[97]</sup>. Auf den apoptotischen Stimulus hin wandert Bax vom Zytosol an die Mitochondrienmembran. Dort bindet es an Bcl-2, das in der Folge nicht mehr den Komplex aus Apaf-1 und Procaspase-9 binden kann. Zugleich wird die Permeabilität der Mitochondrienmembran offenbar durch Bax-Homodimere so verändert, dass Cytochrom C und AIF ins Zytoplasma freigesetzt werden. AIF wandert von dort zum Nukleus, in welchem es die Kondensation des Chromatins und die Fragmentierung des Nukleus induziert. Cytochrom C bindet an Apaf-1 und bewirkt so die Aktivierung von Procaspase-9 zur Initiator-Caspase-9. Diese aktiviert die Kaskade der Effektor-Caspasen. Caspasen sind Aspartat-spezifische Cystein-haltige Proteasen, die neben der Aktivierung anderer Caspasen für den Abbau der

## Einleitung

apoptotischen Zelle sorgen. So vermitteln die Caspasen 3, 6 und 7 den Abbau zytoskelettaler Proteine, das Lösen des Zell-Zell-Kontakts, Änderungen in der Zellmembran sowie die Freisetzung einer Desoxyribonuklease, welche die für Apoptose typische oligonukleosomale Fragmentierung der DNA bewirkt <sup>[96, 97, 103, 106]</sup>.



**Abbildung 1.9:** Intrinsischer Weg der Apoptose-Induktion. Pfeile bedeuten Freisetzung oder Aktivierung, Querbalken die Inhibition des nachfolgenden Schritts.

Außer auf dem intrinsischen Weg kann Apoptose auch extrinsisch induziert werden. Dies geschieht durch Bindung von Liganden wie FasL oder  $TNF\alpha$  an die Rezeptoren Fas oder  $TNF-R_1$ , die daraufhin trimerisieren und über ihre so genannte Death-Domain die Proteine FADD bzw. TRADD rekrutieren. Dies führt wiederum zur Aktivierung von Caspase-8 aus Procaspase-8 und nachfolgend der gesamten Caspase-Kaskade <sup>[96, 97, 103, 106]</sup>.

### 1.7 Zelluläre Resistenzmechanismen

Der Erfolg einer chemotherapeutischen Tumorbehandlung ist abhängig von der Sensitivität des Tumors gegenüber den eingesetzten Zytostatika. Allerdings reagieren die Zellen innerhalb eines Tumors nicht homogen. Vor allem Metastasen weisen eine erhöhte Resistenz auf, die nicht selten zum Scheitern der Behandlung führt. Die möglichen zellulären Resistenzmechanismen werden in dem nun folgenden Abschnitt besprochen. Dabei lässt sich unterteilen in allgemeine Resistenzmechanismen und solche, die mit dem Wirkmechanismus verknüpft und damit substanzspezifisch sind.

#### 1.7.1 Allgemeine Resistenzmechanismen

Ein großes Problem der Tumorthherapie ist die unspezifische Resistenz der Zellen gegenüber einer Reihe von Zytostatika, bekannt als „Multidrug resistance“ (MDR). MDR ist charakterisiert durch eine Kreuzresistenz chemisch nicht verwandter Arzneistoffe, eine Abnahme der intrazellulären Arzneistoff-Akkumulation und eine erhöhte Expression von P-Glykoprotein (P-gp). Sie wird unter anderem durch Anthracycline und Epipodophyllotoxine induziert. P-gp ist ein ATP-abhängiger Membrantransporter, der die durch passive Diffusion in die Zelle gelangten Arzneistoffe aktiv wieder hinaus befördern kann, so dass die intrazellulär benötigte zytotoxische Konzentration nicht erreicht wird. P-gp wird auf dem MDR1-Gen kodiert, welches in multiresistenten Zellen häufig amplifiziert vorliegt bzw. das nach Mutation oder Adaptation vermehrt transkribiert wird<sup>[107]</sup>.

Neben P-gp gibt es eine Reihe weiterer Proteine, die einen erhöhte Efflux von DOX und ETO verursachen und so zur Entstehung von Multiresistenzen führen, darunter das Multiresistenz-assoziierte Protein MRP1 sowie LRP, welches DOX vom Nukleus ins Zytoplasma transportiert<sup>[107, 108]</sup>.

#### 1.7.2 Resistenzen bei Topo II $\alpha$ -Inhibitoren

Die für Topo II $\alpha$ -Inhibitoren spezifischen Resistenzmechanismen greifen entweder auf der Ebene des Enzyms selber oder sie beeinflussen die Reaktion der Zelle auf die Induktion der Doppelstrangbrüche.

Die durch Topo II $\alpha$ -Veränderung bedingte Resistenz wird als at-MDR (für atypische MDR) bezeichnet. Wie die unspezifische MDR ist sie durch eine

## Einleitung

---

Kreuzresistenz zwischen DOX und ETO gekennzeichnet, jedoch ist die Akkumulation der Substanzen gegenüber sensitiven Zellen unverändert. Die Resistenz entsteht durch eine qualitative oder quantitative Änderung der Topo II $\alpha$ -Aktivität. Quantitative Änderungen ergeben sich durch Hemmung der Topo II $\alpha$ -Transkription, verstärkten Abbau des Enzyms oder Verlust eines Allels und resultieren in einem verringerten Topo II $\alpha$ -Spiegel. Qualitative Änderungen sind durch veränderte DNA-Protein-Inhibitor-Interaktion oder ATP-Bindung, posttranslationale Modifikation oder ein verschobenes Verhältnis der Isoenzyme bedingt<sup>[27, 107]</sup>.

Einen komplexen Bereich stellen die Mechanismen dar, die nach Entstehung der Doppelstrangbrüche Resistenzen auslösen können. Diese betreffen zum Einen die Reparatur der Strangbrüche und zum Anderen die Induktion der Apoptose. Letztere wird vor allem durch die Expressionshöhe von p53 beeinflusst. Allerdings gibt es kontroverse Daten bezüglich der Resistenz p53-defizienter Zellen, die jedoch offenbar auf unterschiedlicher Messung der Sensitivität beruhen<sup>[27, 100]</sup>. Die meisten Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Erniedrigung des p53-Spiegels eine Erhöhung der Resistenz mit sich bringt. So konnten Dunkern et al.<sup>[100]</sup> an p53-defizienten Mausfibroblasten eine Erhöhung der DOX- und ETO-Resistenz nachweisen, die mit einer verringerten Anzahl an Doppelstrangbrüchen und einer verminderten Apoptoseinduktion einherging. Die Aktivität der Topo II $\alpha$  war unverändert. Da sowohl die Zahl Wasserstoffperoxid-induzierter Doppelstrangbrüche als auch die Expression Apoptose-relevanter Gene unbeeinflusst blieb, vermutet die Arbeitsgruppe um Dunkern, dass p53 die Ligase-Funktion der Topo II $\alpha$  hemmt.

Ein interessanter Aspekt ist die Fähigkeit eukaryontischer Zellen, DNA-Doppelstrangbrüche zu reparieren. Tatsächlich gibt es eine Reihe von Veröffentlichungen, in denen das Verschwinden DOX- und ETO-induzierter Doppelstrangbrüche nach Ende der Behandlung beschrieben wird<sup>[36, 100, 109]</sup>. Da die Induktion der Strangbrüche das grundsätzliche Wirkprinzip der Topo II $\alpha$ -Inhibitoren ist (Abschnitt 1.4.2), lässt sich vermuten, dass die Reparatur jener Strangbrüche zur Resistenz der Zelle führt. Untersuchungen mit transgenen Mäusen oder Knockdown-Zelllinien zeigen, dass das Fehlen einzelner NHEJ- oder HR-Proteine eine Erhöhung der Sensitivität gegenüber Topo II $\alpha$ -Inhibitoren zur Folge hat. So erwiesen sich DT-40-Zellen mit

## Einleitung

---

NHEJ-Defekt (Ku70<sup>-/-</sup> bzw. Ligase IV<sup>-/-</sup>) ebenso als hypersensitiv gegenüber ETO, wie solche mit HR-Defekt (Rad54<sup>-/-</sup>)<sup>[110]</sup>. Hansen et al.<sup>[101]</sup> fanden in SCLC-Zelllinien zudem eine positive Korrelation zwischen Rad51-Level und ETO-Resistenz, sowie eine negative Korrelation zwischen DNA-PK<sub>cs</sub>-Level und Anzahl der Doppelstrangbrüche. Die Transfektion der Zellen mit Rad51-Antisense-DNA bewirkte folgerichtig eine Erhöhung der ETO-Sensitivität. Ebenso lassen sich ETO-resistente HeLa- und Kolonkarzinomzellen durch Transfektion mit Ku70-siRNA sensitivieren<sup>[111]</sup>.

Auch die Sensitivität gegenüber DOX kann durch DNA-Reparatur beeinflusst werden. So sind Ku70- und Ku86-nullmutante Zellen verglichen mit Wildtypzellen hochsensitiv gegenüber DOX und ETO<sup>[112]</sup> und von Shen et al.<sup>[113]</sup> untersuchte DOX-resistente HL-60-Zellen wiesen einen erhöhten DNA-PK<sub>cs</sub>-Gehalt sowie gesteigerte DNA-PK-Aktivität auf.

Diese Daten lassen auf eine Beteiligung von NHEJ und HR an der Entstehung von Resistenzen in der Therapie mit Topo II $\alpha$ -Inhibitoren schließen. Allerdings gibt es bislang keine Daten, ob reparaturvermittelte Resistenzen in der Antitumorthherapie tatsächlich eine relevante Rolle spielen. Diese Arbeit soll daher zur Klärung dieser Frage beitragen.

## 2 Fragestellung

Wie im ersten Abschnitt erläutert, sind Topo II $\alpha$ -Inhibitoren bereits seit Jahrzehnten ein wichtiger Bestandteil der Antitumorthherapie. Jedoch kommt es im Rahmen der Behandlung oftmals zur Ausbildung von Resistenzen des Tumors gegenüber den eingesetzten Substanzen. Neben unspezifischen Resistenzmechanismen, wie der Überexpression von P-gp, sind dabei auch spezifische, den Wirkmechanismus der Topo II $\alpha$ -Inhibitoren betreffende Mechanismen in Betracht zu ziehen.

Über den Wirkmechanismus der Topo II $\alpha$ -Inhibitoren ist bislang bekannt, dass eine Hemmung des Topo II $\alpha$ -Enzyms die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen zur Folge hat. Welche Prozesse jedoch anschließend ablaufen und das Schicksal der Zelle bestimmen, ist weitgehend unklar. In diesem Zusammenhang ist die Fähigkeit der Zellen, DNA-Doppelstrangbrüche reparieren zu können, zu berücksichtigen. Dies wirft die Frage auf, inwiefern die DNA-Reparaturfähigkeit von Tumorzellen eine klinisch bedeutsame Determinante für die Wirksamkeit der Topo II $\alpha$ -Inhibitoren darstellt. Grundsätzlich sind zwei Varianten denkbar: Einerseits könnte die korrekte Reparatur des induzierten Schadens zum Überleben der Zelle und somit zur Resistenz gegenüber dem Zytostatikum führen. Die Folge wäre somit das Scheitern der Therapie. Andererseits könnte es durch eine inkorrekte Reparatur zu einer Verstärkung der Toxizität oder zur Entstehung von Sekundärmalignomen kommen. Für diese Theorie spricht, dass Topo II $\alpha$ -Inhibitoren Deletionen hervorrufen<sup>[114]</sup>. Falls von solchen chromosomalen Veränderungen essentielle Gene betroffen sind, ist dies für die Zelle letal. Darüber hinaus ist bekannt, dass Topo II $\alpha$ -Inhibitoren zum Schwesterchromatidaustausch und zu Mutationen führen<sup>[115, 116]</sup>. Die Fähigkeit zur DNA-Reparatur hat mit anderen Worten möglicherweise einen großen Einfluss auf den Erfolg oder das Scheitern einer Therapie mit Topo II $\alpha$ -Inhibitoren. Sie soll daher in dieser Arbeit näher beleuchtet werden. Dabei spielen folgende Leitfragen eine zentrale Rolle:

## Fragestellung

---

1. Werden Topo II $\alpha$ -Inhibitor-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche bei Einsatz pharmakologisch relevanter Konzentrationen tatsächlich repariert? Wenn dies der Fall ist: Welche Reparaturwege sind daran beteiligt?
2. Welche zytotoxischen Effekte sind zu beobachten und wann kommt es zum Tod der Zelle? In welchem zeitlichen Zusammenhang zur Reparatur steht die Toxizität?
3. Beeinflusst die Ausschaltung von DNA-Reparaturproteinen die zelluläre Sensitivität gegenüber Topo II $\alpha$ -Inhibitoren? Und sind diese Erkenntnisse von klinischer Relevanz?

Die Untersuchung erfolgt an Kolonkarzinomzellen der Linie HT-29 und primären Zellen aus der Ascitesflüssigkeit zweier Tumorpatienten. Als Modellsubstanzen werden DOX und ETO verwendet. Insgesamt soll diese Arbeit anhand von *in vitro*-Versuchen einen Beitrag zum Verständnis der Resistenzentwicklung gegenüber Topo II $\alpha$ -Inhibitoren in soliden Tumoren leisten.

### 3 Ergebnisse

Im ersten Teil der Arbeit wurde an der Zelllinie HT-29 die Reaktion von Zellen auf die Behandlung mit den Topo II $\alpha$ -Inhibitoren DOX und ETO untersucht. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf den Zusammenhang zwischen DNA-Reparatur und Zytotoxizität gelegt. Im zweiten Teil erfolgte der Vergleich mit an Patientenzellen gewonnenen Ergebnissen.

#### 3.1 Untersuchungen am Zellmodell HT-29

##### 3.1.1 Auswahl geeigneter Inkubationsbedingungen

Da in dieser Arbeit die Bedeutung der DNA-Reparatur für die Sensitivität bzw. Resistenz von Tumorzellen gegenüber Topo II $\alpha$ -Inhibitoren untersucht werden soll, wurden zunächst Inkubationskonzentrationen und -zeiten für die Behandlung der Zellen mit DOX und ETO ermittelt, bei denen die Zahl der DNA-Doppelstrangbrüche signifikant erhöht wird. Die Detektion erfolgte mittels Comet-Assay (Abschnitt 7.4.1). Um klinisch relevante Bedingungen zu simulieren, kamen dabei nur Konzentrationen zum Einsatz, die während der Therapie im Plasma des Patienten erreicht werden (Abschnitt 1.4.4).

Für DOX wurden stellvertretend für die Bolusgabe Konzentrationen zwischen 100 nM und 20  $\mu$ M über eine Stunde getestet. Da die Blutplasmakonzentration bereits innerhalb einer Stunde nach Ende einer Infusion auf 10 % der maximalen Konzentration zurückgeht, wurde zudem stellvertretend für die anschließende langsame Eliminationsphase die Gabe von 50 nM bis 1  $\mu$ M DOX für 24 Stunden getestet. Dabei stellte sich heraus, dass nach einer Inkubationszeit von einer Stunde noch kein Anstieg an Doppelstrangbrüchen zu beobachten war. Erst nach 24-stündiger Inkubation mit mindestens 250 nM DOX kam es zu einer statistisch signifikanten Erhöhung ( $p \leq 0,05$ ). Für die Versuche wurden daher 250 und 750 nM DOX über 24 Stunden gewählt.

Für ETO wurden einstündige Inkubationen mit 2,5 bis 125  $\mu$ M als Simulation für die Bolusgabe und 24-stündige Inkubationen mit 50 nM bis 20  $\mu$ M als Simulation für die Langzeitinfusion getestet. Eine signifikante



## Ergebnisse

Erhöhung der Anzahl an Doppelstrangbrüchen zeigte sich nach einstündiger Behandlung ab 5  $\mu\text{M}$  ETO und nach 24 Stunden ab 500 nM. Für die Versuche wurden Konzentrationen von 10 bzw. 100  $\mu\text{M}$  ETO über eine Stunde und 10  $\mu\text{M}$  über 24 Stunden gewählt.

Die Inkubationsbedingungen für beide Topo II $\alpha$ -Inhibitoren sind in nachfolgender Tabelle zusammen gefasst:

DOX		ETO	
250 nM	24 h	10 $\mu\text{M}$	1 h
750 nM	24 h	10 $\mu\text{M}$	24 h
		100 $\mu\text{M}$	1 h

**Tabelle 3.1:** In dieser Arbeit verwendete Konzentrationen und Inkubationszeiten von DOX und ETO

Bei vielen der folgenden Untersuchungen wurde nach Ablauf der in Tabelle 3.1 erwähnten Inkubationszeiten ein Mediumwechsel durchgeführt, d.h. das zytostatikahaltige Medium wurde abgesaugt und gegen zytostatikafreies Medium ersetzt. Anschließend wurden die Zellen weiter inkubiert. Auf diese Weise wurde *in vitro* ein Absinken des Plasmaspiegels *in vivo* imitiert. Die Analyse der Zellen erfolgte versuchsabhängig zu unterschiedlichen Zeiten nach Mediumwechsel. Die Versuche werden im Folgenden durch Hinzufügen der Inkubationszeit des Zytostatikums und der Zeit nach Mediumwechsel benannt. DOX 250 nM 24/3 h steht zum Beispiel für die Behandlung mit 250 nM DOX über 24 Stunden und anschließender dreistündiger zytostatikafreier Inkubation.

### 3.1.2 DNA-Schädigung durch Topo II $\alpha$ -Inhibitoren

Zunächst sollte untersucht werden, ob die durch Topo II $\alpha$ -Inhibitoren induzierten DNA-Doppelstrangbrüche nach Austausch des Zellkulturmediums gegen zytostatikafreies Medium persistieren oder ob sie entfernt werden.  $2,5 \times 10^5$  HT-29-Zellen wurden dazu ausplattiert und nach frühestens 24 Stunden gemäß Tabelle 3.1 behandelt. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen zu zehn Zeitpunkten nach dem Mediumwechsel mittels Comet-Assay untersucht. Um den Verlauf der erhaltenen Kurven

## Ergebnisse

---

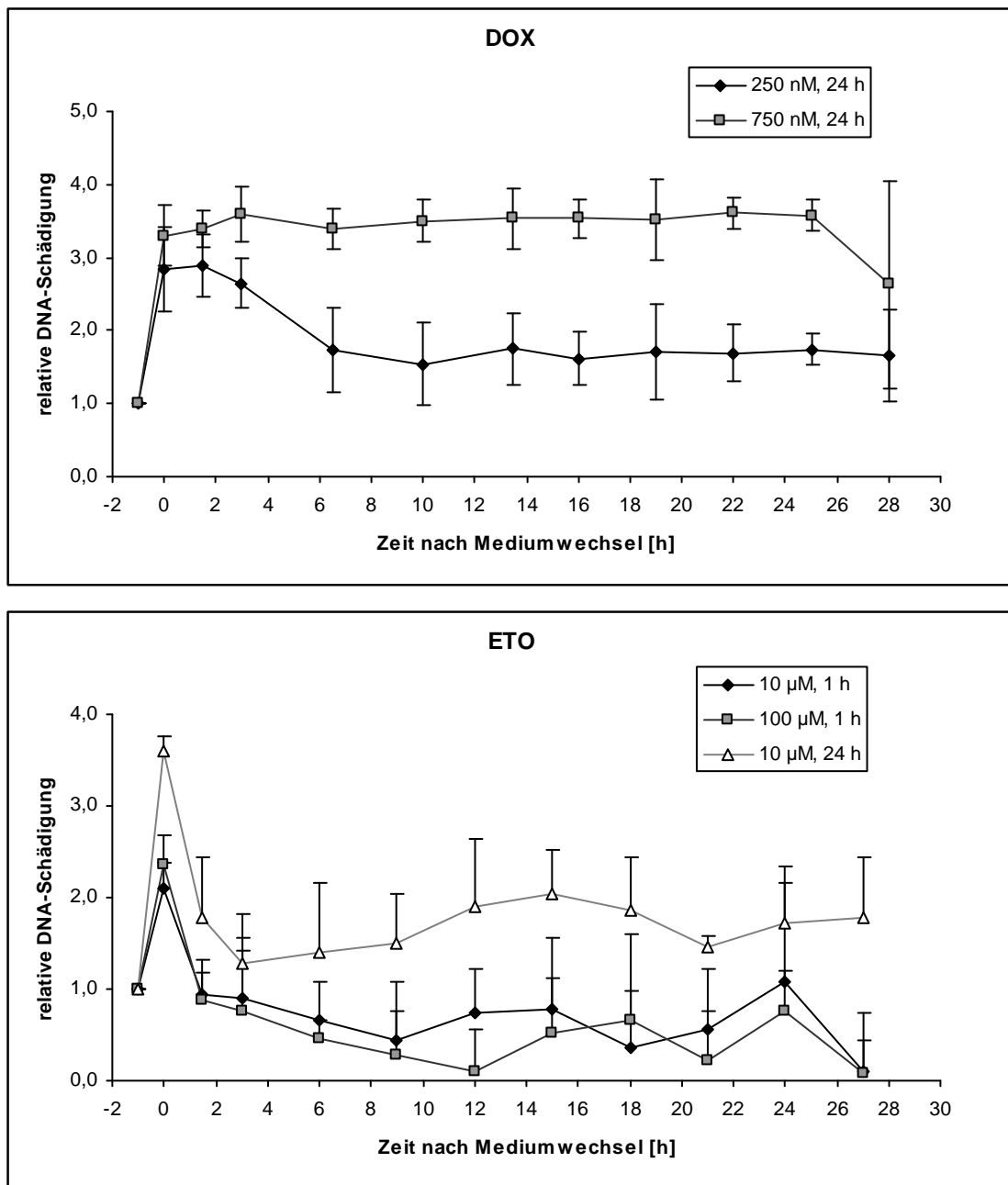
besser vergleichen zu können, wurden diese auf einen Kontrollwert von eins normiert.

Nach der Behandlung der Zellen mit 250 nM DOX für 24 h zeigte sich innerhalb der ersten 1,5 Stunden nach Mediumwechsel ein Anstieg an Strangbrüchen (Abbildung 3.1 oben). Danach reduzierte sich die Anzahl der Strangbrüche kontinuierlich. Die Geschwindigkeit dieses Rückgangs war allerdings variabel. Nach spätestens 6,5 Stunden war der DNA-Schaden in allen Versuchen nahezu auf Kontrollniveau zurückgegangen. Zellen, die für 24 h mit 750 nM DOX behandelt wurden, zeigten hingegen eine konstant hohe Anzahl an Doppelstrangbrüchen. Lediglich 28 Stunden nach Mediumwechsel war bei einem Ansatz ein Rückgang zu verzeichnen. Dieser beruht möglicherweise auf einem Ablösen toter Zellen, die bei der Aufarbeitung mit dem Medium abgesaugt und somit beim Comet-Assay nicht erfasst wurden. Um sicherzustellen, dass das beobachtete Absinken der Strangbruchzahl nicht grundsätzlich auf einem Ablösen stark geschädigter Zellen beruht, wurde die Zellzahl im abgesaugten Medium beim Mediumwechsel sowie sechs und 24 Stunden danach bestimmt. Durch diese Untersuchung konnte ausgeschlossen werden, dass es bereits in den ersten sechs Stunden zu verstärkter Ablösung toter Zellen kam (Abbildung 3.2). Erst 24 Stunden nach Mediumwechsel war ein starker Anstieg abgelöster Zellen zu verzeichnen. Der beobachtete Rückgang an Doppelstrangbrüchen muss somit intrazellulär ablaufen.

In ETO-behandelten Zellen wurden die induzierten Doppelstrangbrüche sehr schnell entfernt. Unabhängig von Inkubationsdauer und Konzentration wurde der DNA-Schaden innerhalb von 1,5 Stunden vollständig behoben (Abbildung 3.1 unten). Auffällig ist, dass der durch 10  $\mu$ M ETO initiierte Schaden nach 24-stündiger Behandlung signifikant über dem der einstündigen Behandlung lag und auch nach Wechsel des Mediums deutlich über dem dort erreichten Niveau blieb. Hingegen gibt es zwischen 10 und 100  $\mu$ M ETO für eine Stunde keinen Unterschied in der Stärke der DNA-Schädigung und im Verlauf der Kurve. Ab 12 Stunden nach Mediumwechsel kam es bei allen untersuchten Konzentrationen zu erneuten, unterschiedlich stark ausgeprägten Anstiegen von Strangbrüchen. Diese könnten auf der Induktion von Apoptose und Nekrose beruhen, in deren Verlauf die DNA fragmentiert wird. Ein Anstieg abgelöster Zellen ist bei ETO, wenn

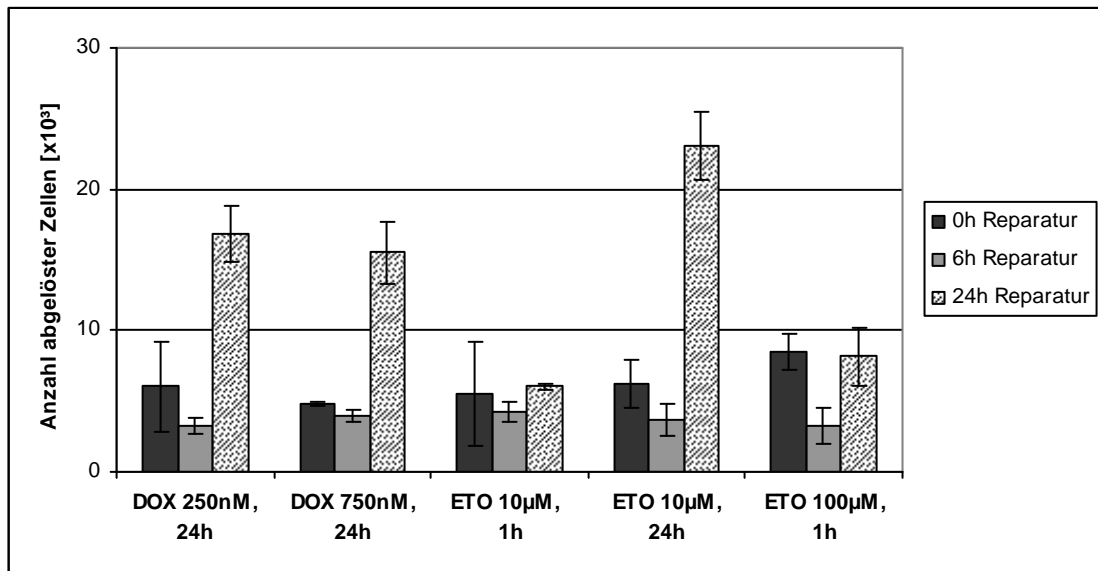
## Ergebnisse

überhaupt, ebenfalls erst 24 Stunden nach Mediumwechsel zu verzeichnen (Abbildung 3.2).



**Abbildung 3.1:** Verlauf der DNA-Schädigung nach Behandlung mit DOX (oben) und ETO (unten). Die unbehandelte Probe wurde, unabhängig von der tatsächlichen Inkubationsdauer in der Versuchsreihe, als Kontrolle zum Zeitpunkt -1 h aufgetragen. Gezeigt werden die Mittelwerte aus drei Versuchen. Aus Gründen der Übersicht wurde die Standardabweichung bei ETO in nur einer Richtung aufgetragen. Sie ist symmetrisch um den Mittelwert verteilt.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.2:** Zellzahl im abgesaugten Medium. Aufgetragen wurde die Zahl der von der Kulturplatte abgelösten Zellen 0, 6 und 24 Stunden nach Mediumwechsel. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung (n=3).

### 3.1.3 Bestimmung des intrazellulären Doxorubicingehalts

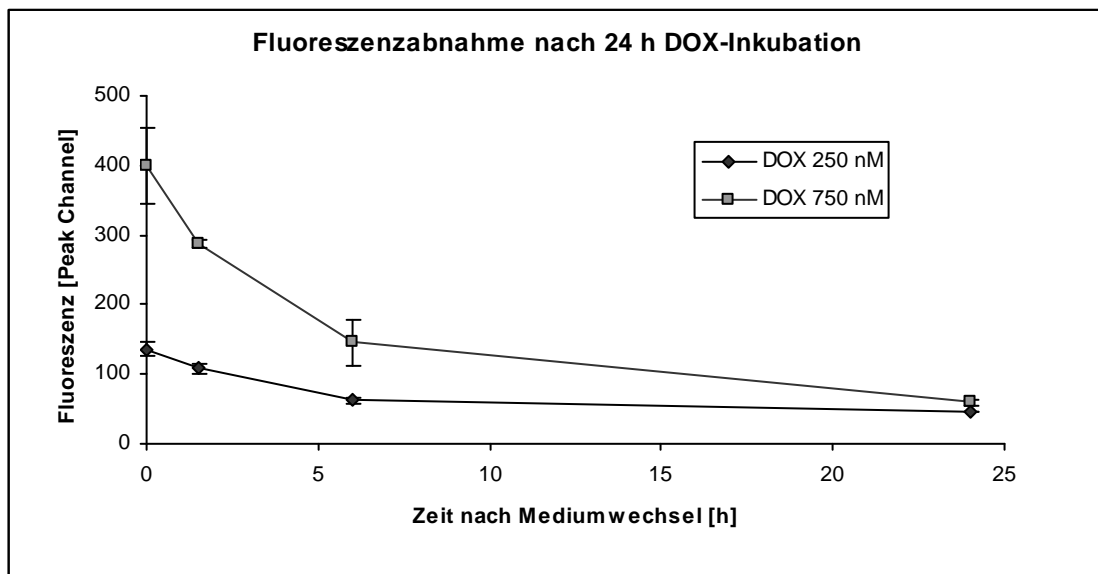
Wie in Abbildung 3.1 zu erkennen, gab es einen deutlichen Unterschied zwischen den Zellen, die mit 250 bzw. 750 nM DOX für 24 h behandelt wurden und zwar sowohl in Bezug auf die Zahl der induzierten Doppelstrangbrüche als auch bezüglich deren Entfernung. Diese Ungleichheiten könnten auf unterschiedlich hohen intrazellulären DOX-Konzentrationen nach Mediumwechsel beruhen. Um diese zu ermitteln wurde die Eigenfluoreszenz von DOX genutzt. Nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 470 nm zeigt DOX eine rote Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 585 nm, die sich durchflusszytometrisch am FACS bestimmen lässt. Das Signal der Zelle ist dabei linear zu ihrem intrazellulären DOX-Gehalt (Abschnitt 7.8.2).

Für die Messung wurden  $2,5 \times 10^5$  HT-29-Zellen ausplattiert und nach 24 Stunden mit 250 bzw. 750 nM DOX für weitere 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze wie in Abschnitt 7.8.2 beschrieben geerntet und je 30.000 Zellen am FACS vermessen. Mit 750 nM DOX behandelte Zellen zeigten dabei eine dreifach höhere Fluoreszenz gegenüber

## Ergebnisse

mit 250 nM inkubierten Zellen (Abbildung 3.3) und damit einen linearen Zusammenhang. Gemäß der Kalibrierung entsprach der nach 24-stündiger Behandlung mit 750 nM DOX gemessene Gehalt dem nach einstündiger Inkubation mit 8,4  $\mu$ M erzielten Gehalt. Durch 250 nM DOX für 24 h wurde der gleiche intrazelluläre Gehalt wie durch 2,7  $\mu$ M DOX für eine Stunde erreicht.

Wurde das Medium am Ende der Inkubation durch zytostatikafreies Medium ersetzt und die Fluoreszenz nach 1,5 sowie 6 und 24 Stunden erneut gemessen, zeigte sich eine exponentielle Abnahme der Intensität. Der intrazelluläre Gehalt der mit 750 nM DOX behandelten Zellen sank dabei erst nach über sechs Stunden auf den Wert, welchen die mit 250 nM behandelten Zellen zum Zeitpunkt des Mediumwechsels aufwiesen. Innerhalb dieser Zeit ist das maximale Ausmaß der DNA-Reparatur nach Inkubation mit 250 nM DOX bereits erreicht (Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.3:** Abnahme der intrazellulären DOX-Konzentration, gemessen anhand der Eigenfluoreszenz. Die Grafik zeigt den Mittelwert mit Standardabweichung (n=3).

### 3.1.4 Morphologische Untersuchung

Betrachtet man die in Abschnitt 3.1.2 untersuchten Zellen unter dem Lichtmikroskop, so weisen die behandelten Zellen gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen Änderungen in der Morphologie auf. Zur Charakterisierung dieser morphologischen Veränderungen wurden daher  $2,5 \times 10^5$  HT-29-Zellen ausplattiert und nach frühestens 24 Stunden gemäß Tabelle 3.1 behandelt. Am Ende der Inkubation wurden die Zellen nach Giemsa gefärbt und im Lichtmikroskop mit 20-facher Vergrößerung betrachtet. Abbildung 3.4 zeigt repräsentative Ausschnitte dieser Präparate.

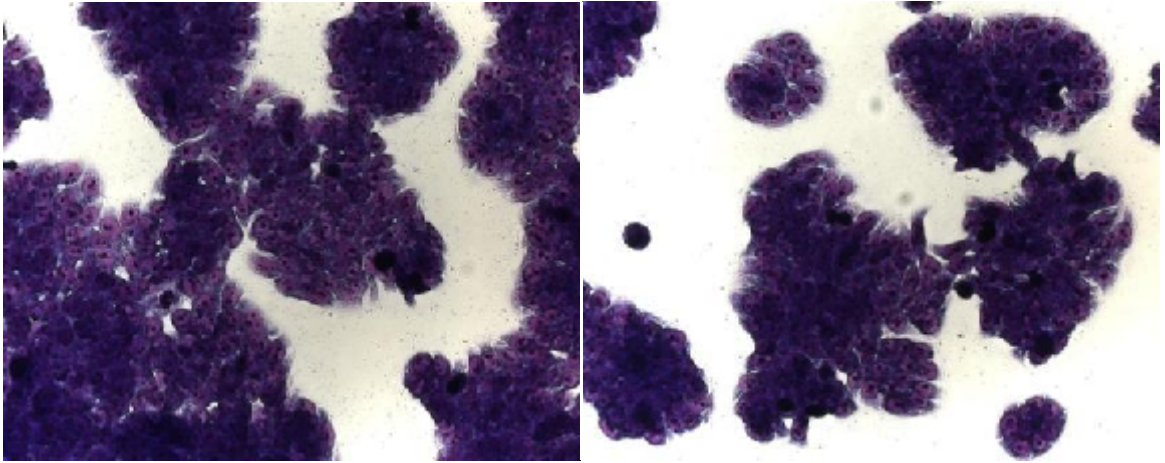
Unbehandelte HT-29-Zellen weisen eine polygonale Form auf und wachsen dicht gedrängt mit direktem Zell-Zell-Kontakt. Der Zusatz von 0,25 % DMSO (Lösungsmittel von ETO) zum Kulturmedium über 24 Stunden bewirkt keine Veränderung (A).

Anders verhält es sich nach Inkubation mit 250 und 750 nM DOX. Nach 24 Stunden sind die Zellen auf die zweifache Größe der unbehandelten Zellen angeschwollen und beginnen, sich voneinander zu lösen (B und C, links). Letzteres ist bei 750 nM DOX deutlich ausgeprägter. 19 Stunden nach Austausch des Mediums gegen frisches Medium beobachtet man eine weitere Verstärkung dieses Effekts. Zudem kommt es zur Ausbildung apoptotischer Körperchen (s. Pfeile) und zum Ablösen der Zellen von der Kulturplatte (B und C, rechts).

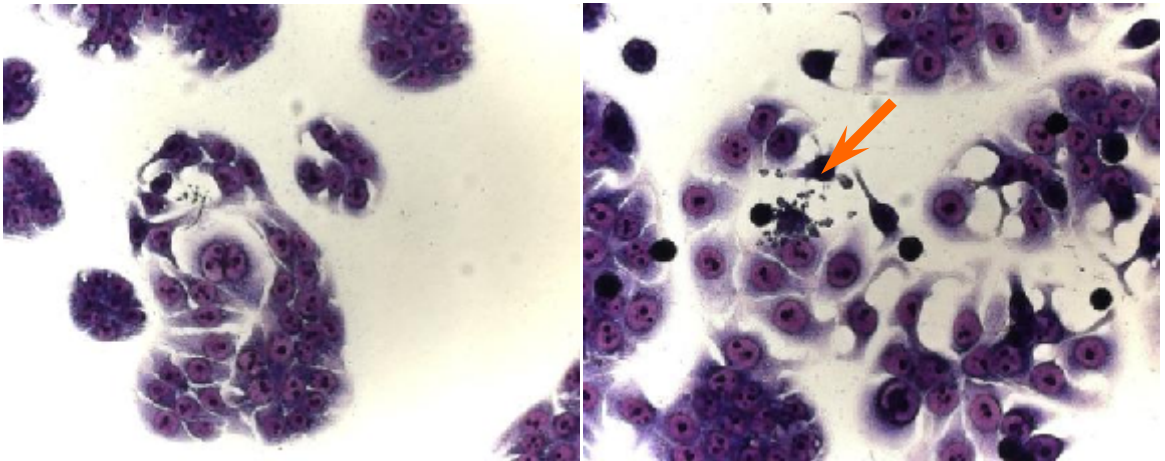
Ein ähnliches Verhalten beobachtet man nach Zugabe von 10  $\mu$ M ETO über 24 Stunden, sowie 18 Stunden nach Mediumwechsel (E).

Lediglich nach der Inkubation mit ETO über eine Stunde zeigt sich ein unverändertes Bild, da die Zellen noch keine morphologischen Veränderungen aufweisen. 18 Stunden nach Wechsel des Mediums sind jedoch auch diese Zellen geschwollen und beginnen, sich voneinander zu lösen (D und F).

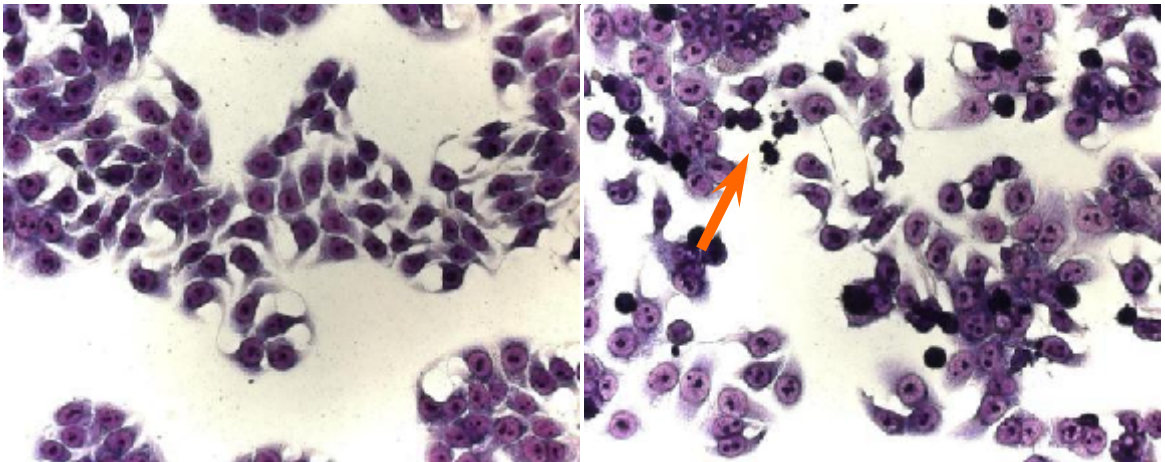
## Ergebnisse



**A** Kontrolle 24 h (links) und nach Zusatz von 0,25 % DMSO 24 h (rechts)



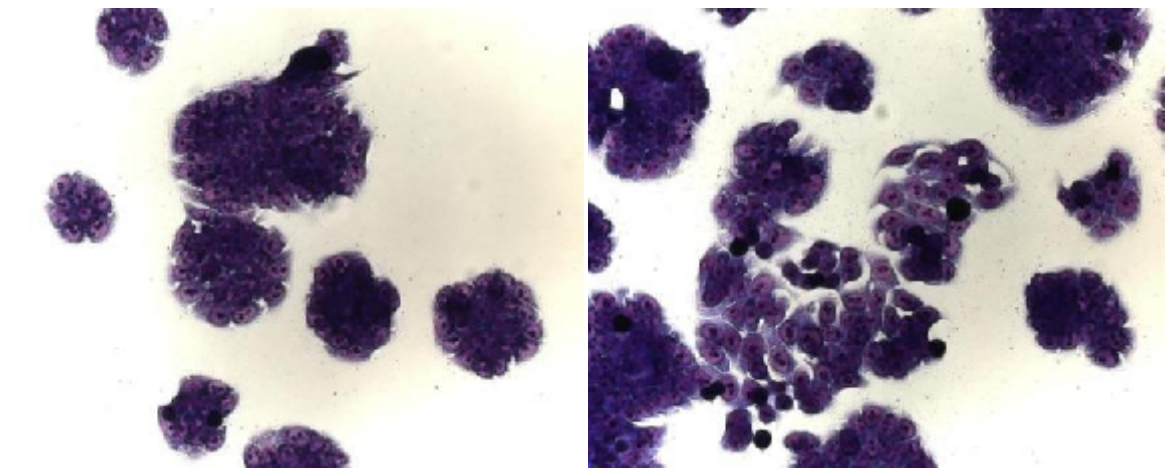
**B** DOX 250 nM, 24 h (links) und 19 h nach Mediumwechsel (rechts)



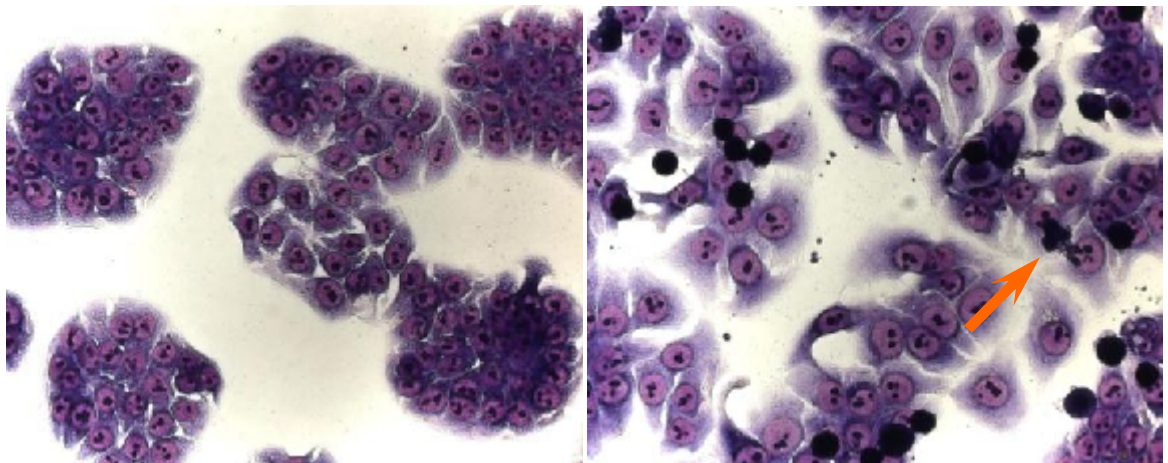
**C** DOX 750 nM, 24 h (links) und 19 h nach Mediumwechsel (rechts)



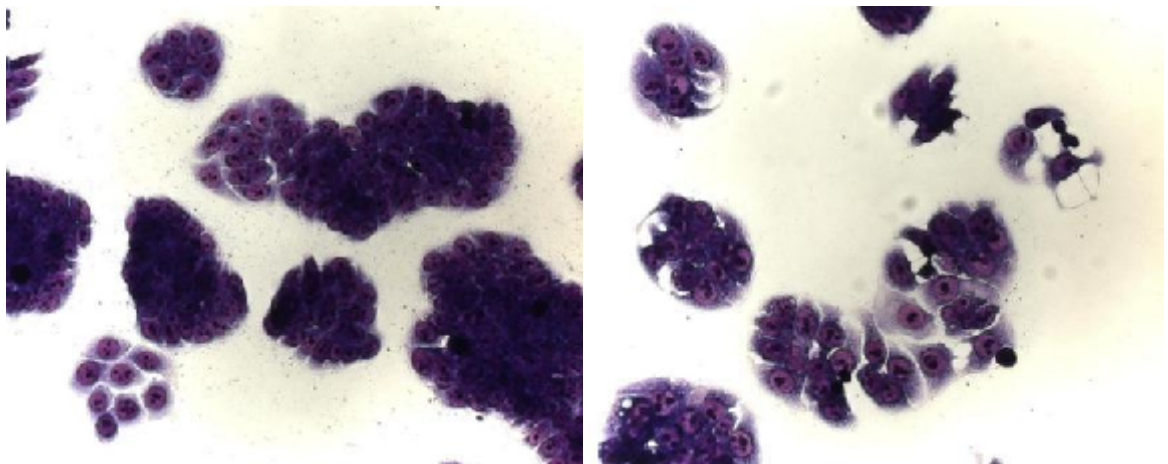
## Ergebnisse



**D** ETO 10 µM, 1 h (links) und 18 h nach Mediumwechsel (rechts)



**E** ETO 10 µM, 24 h (links) und 18 h nach Mediumwechsel (rechts)



**F** ETO 100 µM, 1 h (links) und 18 h nach Mediumwechsel (rechts)

**Abbildung 3.4:** Morphologische Veränderungen von HT-29-Zellen nach Behandlung mit DOX und ETO (20-fache Vergrößerung).



### 3.1.5 Charakterisierung des Zelltods und der Zytotoxizität

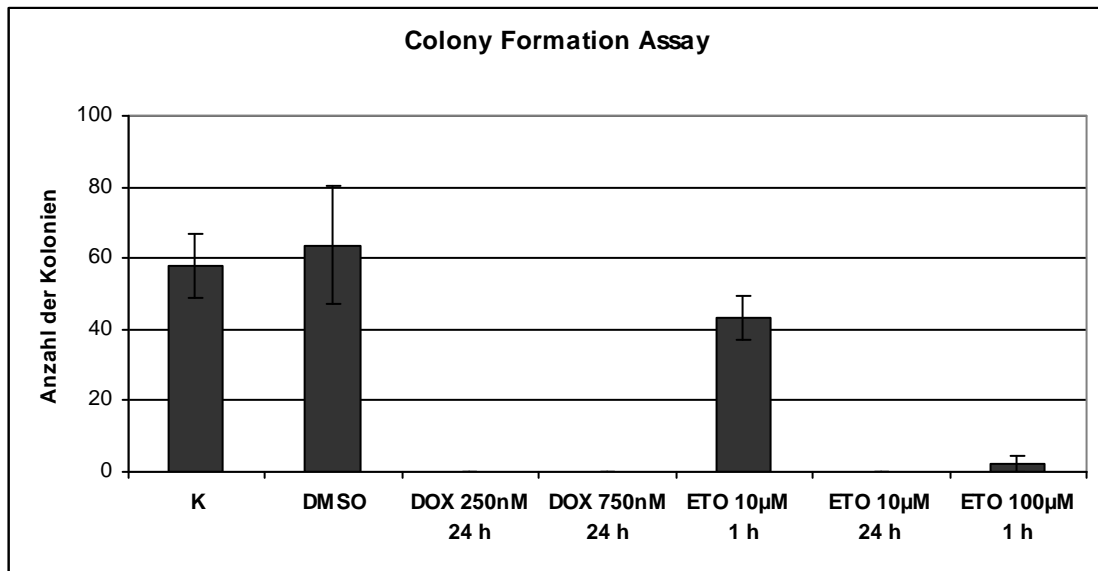
Wie in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt, weisen einige Zellen nach der Behandlung mit DOX und ETO Merkmale des Zelltods auf. Diese sollen im folgenden Abschnitt näher charakterisiert werden. Dabei wird unter anderem die Art des Zelltods – Apoptose oder Nekrose – analysiert, sowie dessen zeitlicher Ablauf. Außerdem wird untersucht, welche Auswirkungen Topo II $\alpha$ -Inhibitoren auf den Zellzyklus und die Bildung von Zellkolonien haben.

#### 3.1.5.1 Koloniebildung nach Behandlung mit Topo II $\alpha$ -Inhibitoren

Eine Möglichkeit, die Proliferationsfähigkeit zytostatikabehandelter Zellen zu untersuchen, bietet der Colony Formation Assay. Hierzu wurden  $2,5 \times 10^5$  HT-29-Zellen ausplattiert und nach 24 Stunden gemäß Tabelle 3.1 inkubiert. Je 100 der behandelten Zellen wurden wiederum ausplattiert und 14 Tage inkubiert. Anschließend erfolgten eine Zellfärbung nach Giemsa und die Auszählung der Koloniezahl pro Ansatz. Überall dort, wo sich nach der Aussaat eine proliferationsfähige Tumorzelle befand, befindet sich nun eine Zellkolonie. Je mehr Zellen also in ihrer Proliferation gehemmt sind bzw. je toxischer die zytostatische Behandlung ist, desto weniger Kolonien wachsen pro Ansatz.

Das Ergebnis des Assays wird in Abbildung 3.5 wieder gegeben: 100 ausplattierte Kontrollzellen bildeten im Durchschnitt 58 Kolonien. Der Zusatz von 0,25 % DMSO über 24 Stunden führte zu keiner signifikanten Veränderung dieser Zahl (64 Kolonien), ebenso wenig die Inkubation mit 10  $\mu$ M ETO für eine Stunde. Die Koloniezahl wurde hier allerdings bereits auf 43 reduziert. Sowohl die einstündige Behandlung mit 100  $\mu$ M ETO als auch eine 24-stündige Inkubation mit 10  $\mu$ M ETO bzw. 250 oder 750 nM DOX ergeben dagegen eine signifikante Abnahme ( $p \leq 0,05$ ). Nach einstündiger ETO-Behandlung wachsen noch zwei Kolonien, nach 24-stündiger Behandlung und bei DOX-inkubierten Zellen findet keine Koloniebildung mehr statt.

## Ergebnisse



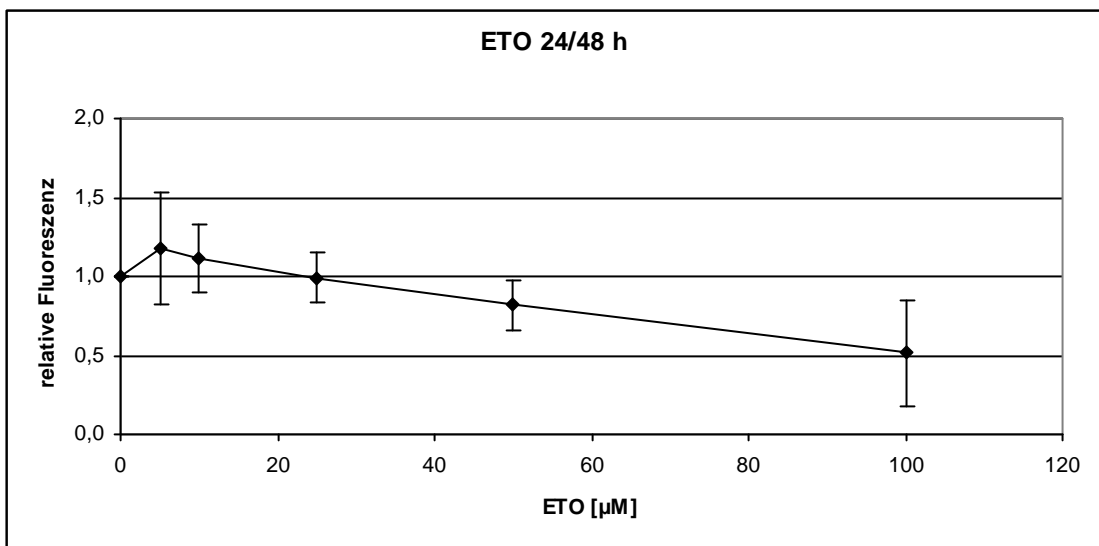
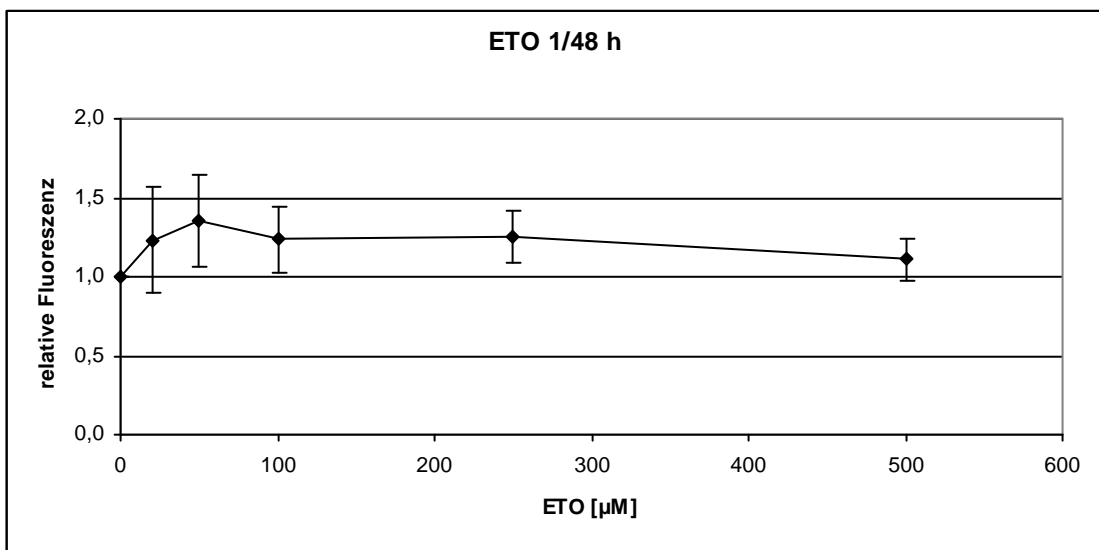
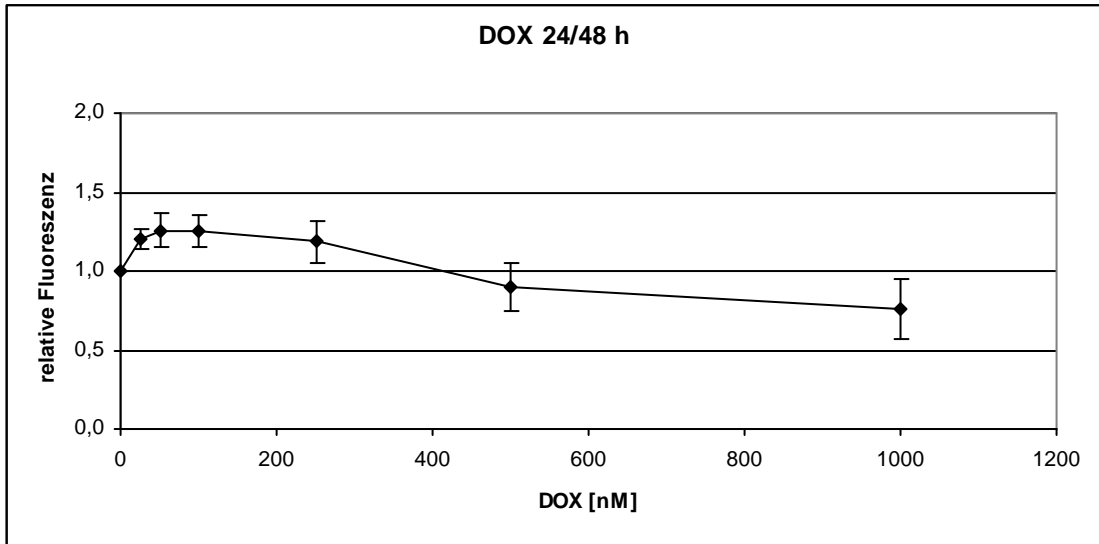
**Abbildung 3.5:** Koloniebildung nach Behandlung mit Topo II $\alpha$ -Inhibitoren. Die Grafik zeigt die Anzahl der aus 100 Zellen gebildeten Kolonien im Vergleich mit unbehandelten Kontrollzellen (K) und 0,25 % DMSO für 24 h. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen, die jeweils Doppelbestimmungen beinhalten.

### 3.1.5.2 alamar Blue<sup>TM</sup>-Zytotoxizitätsassay

Um den Einfluss der Topo II $\alpha$ -Inhibitoren auf die Viabilität und Proliferation der HT-29-Zellen zu untersuchen, wurde der alamar Blue<sup>TM</sup>-Assay durchgeführt. Er beruht auf der durch Zellumsatz bedingten Reduktion des Farbstoffs Resazurin und fluorimetrischer Messung der reduzierten Form (Abschnitt 7.7.2).

1,25x10<sup>3</sup> HT-29-Zellen wurden dazu 72 Stunden nach Aussaat gemäß Tabelle 3.1 behandelt. Am Ende der Inkubation wurde das Medium abgenommen und für 48 Stunden durch zytostatikafreies Medium ersetzt. Für die Messung wurde dieses erneut ausgetauscht und durch ein mit 10 % alamar Blue<sup>TM</sup> versetztes Medium ersetzt. Nach weiteren drei Stunden, in denen die Reduktion des Farbstoffs erfolgte, wurde der Überstand abgenommen und fluorimetrisch gemessen. Abbildung 3.6 gibt die relative Änderung der Fluoreszenz in Bezug auf die Kontrolle wieder.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.6:** Änderung der Fluoreszenz des alamar Blue™-Farbstoffs. Die Grafik zeigt die Mittelwerte aus drei (DOX) bzw. vier (ETO) Versuchen, die jeweils eine Dreifachbestimmung beinhalten.

## Ergebnisse

---

Erstaunlicherweise zeigten alle Ansätze bei niedrigen Zytostatikakonzentrationen einen Anstieg der Fluoreszenz verglichen mit der Kontrolle. Da eine Zunahme der Fluoreszenz ein Zeichen für gesteigerten Umsatz ist, scheint dies widersprüchlich. Vorversuche haben jedoch gezeigt, dass die Konzentration der reduzierten, fluoreszierenden Form von Resazurin bei hohen Zellzahlen ein Maximum erreicht, nach dessen Überschreitung es zu einer raschen Abnahme der Fluoreszenz kommt. Denkbar ist, dass diese Zellzahl bei den unbehandelten Kontrollzellen überschritten wurde und die Menge des reduzierten Farbstoffs so das Maximum überschritten hat. Die gemessene Fluoreszenz der Kontrolle wäre dann niedriger, als zu erwarten gewesen wäre (Abschnitt 4.1.2.2). Durch die geringe, im Vorversuch ermittelte Zahl ausplattierter Zellen sollte diese Möglichkeit jedoch ausgeschlossen sein.

Wurde die Konzentration der Zytostatika weiter erhöht, so zeigte sich ausgehend vom Maximum eine relativ lineare Abnahme der Fluoreszenz. Lediglich nach einstündiger ETO-Behandlung scheint der Rückgang ein Plateau zu durchlaufen. Die Konzentration, bei der die Fluoreszenz 48 Stunden nach Mediumwechsel auf die Hälfte des Maximums abnahm, lag im Falle von DOX 24 h über 1  $\mu\text{M}$ . Im Falle von ETO 24 h betrug sie 100  $\mu\text{M}$ .

### 3.1.5.3 Charakterisierung des Zelltods anhand von Membranveränderungen

Beim programmierten Zelltod, der Apoptose, kommt es bereits im frühen Stadium zur Translokation von Phosphatidylserin von der Innenseite der Plasmamembran auf die Außenseite<sup>[117]</sup>. Abgesehen von dieser Veränderung bleibt die Zellmembran intakt. Bei nekrotischen Zellen hingegen wird kein Phosphatidylserin externalisiert, es kommt jedoch zum Verlust der Membranintegrität. Die Art des Zelltods lässt sich auf Einzelzellebene durch Inkubation mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid charakterisieren. Bei Annexin V handelt es sich um ein Phosphatidylserin bindendes Protein<sup>[118]</sup>, das an den Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelt ist. Der zweite Fluoreszenzfarbstoff, Propidiumiodid, wird von Zellen mit intakter Membran ausgeschlossen. Nach Vermessen der Zellen am FACS kann man zwischen gesunden, apoptotischen und nekrotischen Zellen unterscheiden (Abschnitt 7.8.1).

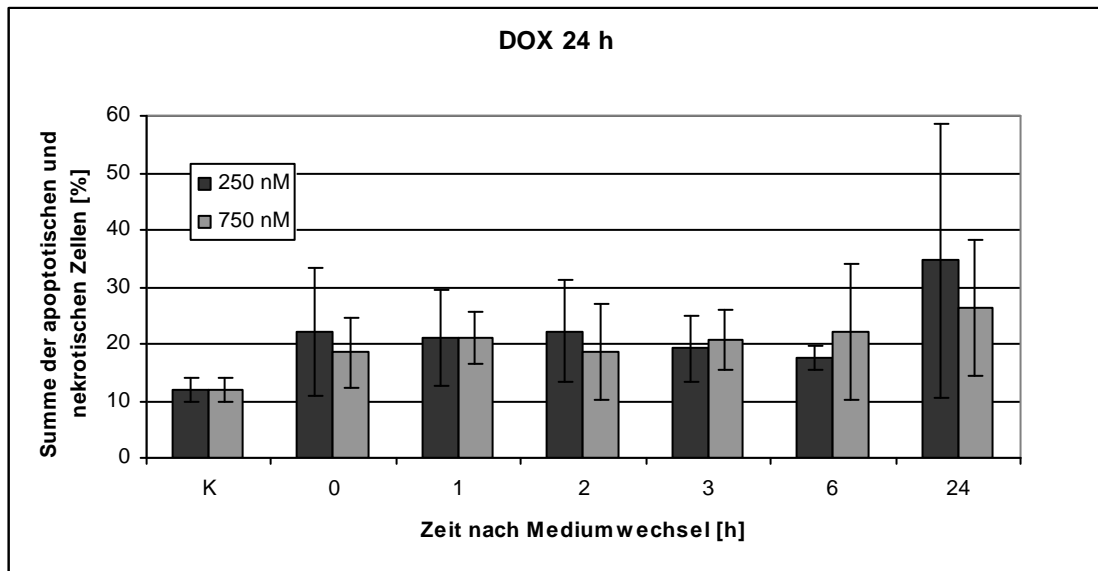
## Ergebnisse

---

$2,5 \times 10^5$  HT-29-Zellen wurden dazu ausplattiert, nach 24 Stunden gemäß Tabelle 3.1 behandelt und geerntet. Je Ansatz wurden 30.000 Zellen vermessen. Bei DOX-behandelten Zellen ist eine Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose nicht möglich, da die Eigenfluoreszenz von DOX eine ähnliche Wellenlänge wie die Fluoreszenz des Propidiumiodids aufweist.

HT-29-Zellen zeigten nach 24-stündiger Behandlung mit DOX einen 1,5-fach (750 nM DOX) bzw. 1,8-fach (250 nM) erhöhten Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen verglichen mit unbehandelten Zellen (Abbildung 3.7). Wurde das Kulturmedium gegen frisches ersetzt, so blieb dieser Anteil in den folgenden sechs Stunden nahezu gleich. Nach 24 Stunden hatte er sich jedoch um 14,3 % auf das 2,2-fache (750 nM) bzw. um 22,6 % auf das 2,9-fache (250 nM) erhöht. Dies steht im Einklang mit den unter dem Mikroskop beobachteten Veränderungen. Allerdings zeigte sich 24 Stunden nach Mediumwechsel eine Umkehr des zwischen 250 und 750 nM DOX beobachteten Unterschieds, da der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen nach Behandlung mit 250 nM DOX bei 34,6 % lag, nach 750 nM jedoch nur 26,2 % betrug. Der Anteil schwankte zudem sehr stark und bewegte sich zwischen 18,9 und 62,1 % (250 nM) bzw. zwischen 13,9 und 37,9 % (750 nM). Diese hohen Schwankungen lassen sich damit erklären, dass die Apoptose innerhalb einer kurzen Zeitspanne von ca. 30 Minuten abläuft. Erfolgt die Messung vor diesem Zeitraum, können noch keine apoptotischen Anzeichen festgestellt werden; erfolgt sie danach, haben sich die Zellen bereits abgelöst und werden durch die Aufarbeitung nicht erfasst.

## Ergebnisse

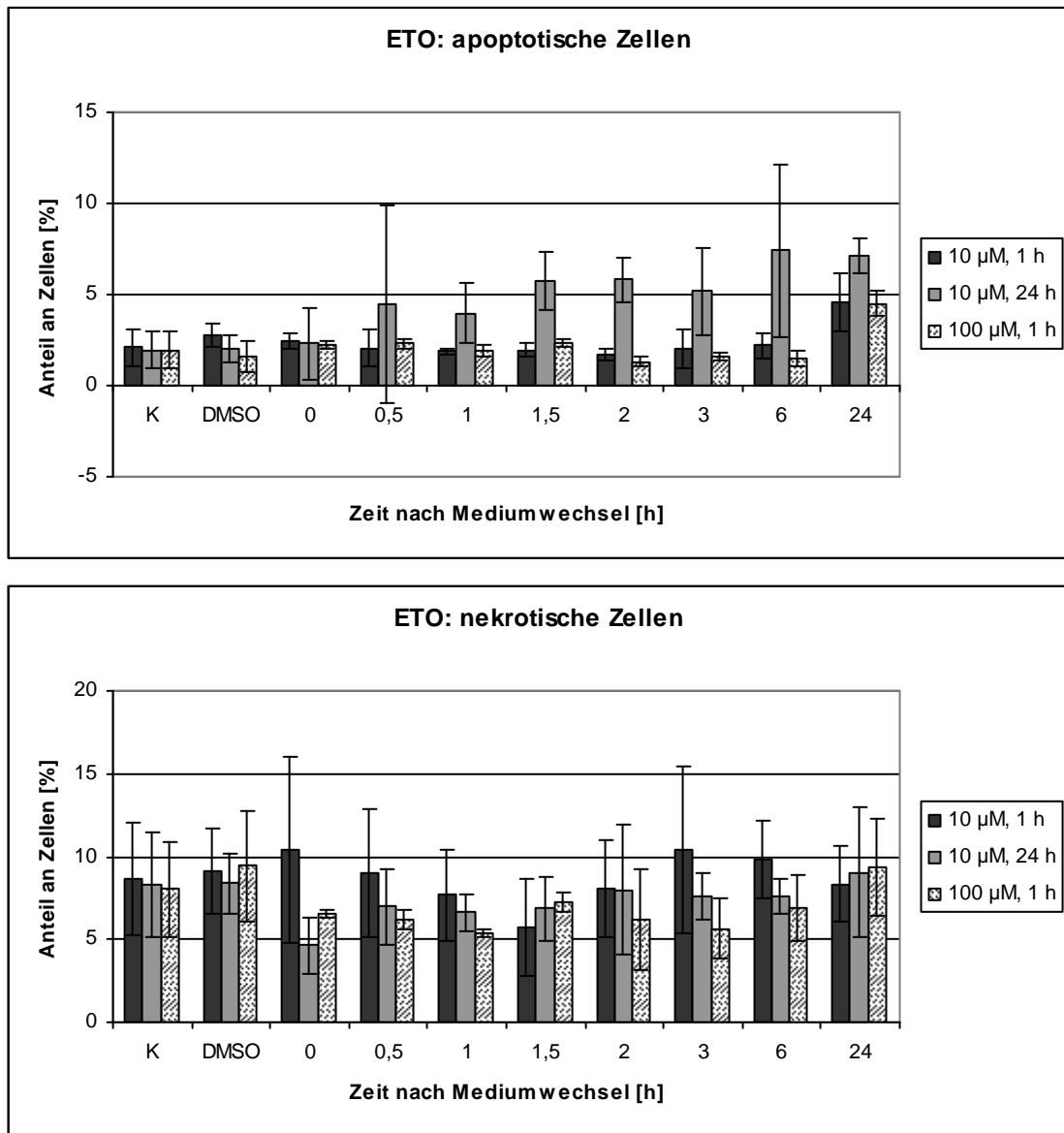


**Abbildung 3.7:** Anteil membrangeschädigter HT-29-Zellen nach Behandlung mit DOX, gemessen anhand der Annexin V-Propidiumiodid-Färbung. Aufgetragen wurde die Summe der apoptotischen und nekrotischen Zellen gegen die Zeit nach Entfernung des Zytostatikums. Die Kontrolle (K) zeigt den entsprechenden Anteil bei unbehandelten Zellen. Alle Werte wurden aus drei Versuchen gemittelt.

Ein ähnliches Bild zeigte sich nach der Gabe von ETO. Allerdings kann hier zwischen Apoptose und Nekrose unterschieden werden (Abbildung 3.8). Betrachtet man zunächst die nekrotischen Zellen (untere Grafik), so ist festzustellen, dass ihr Anteil bei allen Ansätzen im Bereich der Kontrolle lag und unregelmäßig schwankte. Diese Schwankungen beruhen vermutlich auf Membranschädigungen, die die Zelle durch das Ablösen von der Kulturplatte mit Trypsin erfahren hat, sowie auf Schäden durch Zentrifugation.

Anders verhielt es sich mit apoptotischen Zellen (obere Grafik). Nach Inkubation mit 10 und 100  $\mu\text{M}$  ETO über eine Stunde lag ihr Anteil ebenfalls auf Kontrollniveau, ebenso in den nächsten sechs Stunden nach Wechsel des Mediums. Erst nach 24 Stunden war ein deutlicher Anstieg apoptotischer Zellen auf das 2,2-fache (10  $\mu\text{M}$  ETO) bzw. 2,3-fache (100  $\mu\text{M}$ ) zu verzeichnen. Bei über 24 Stunden mit 10  $\mu\text{M}$  ETO behandelten Zellen zeigte sich bereits 0,5 Stunden nach anschließendem Mediumwechsel eine 2,3-fache Zunahme apoptotischer Zellen, die im weiteren Verlauf bis auf das 3,8-fache stieg.

## Ergebnisse

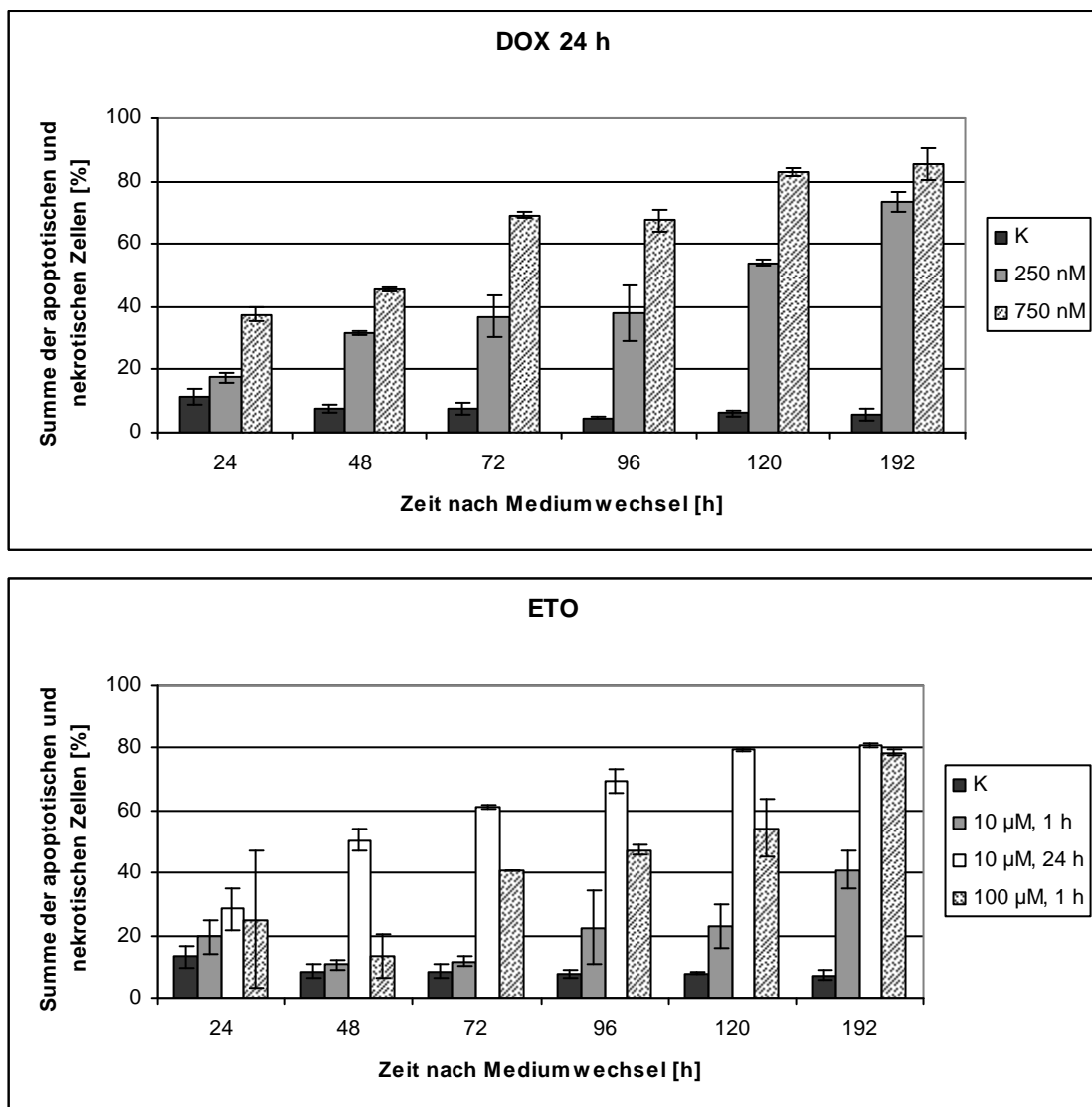


**Abbildung 3.8:** Anteil apoptotischer und nekrotischer HT-29-Zellen nach Behandlung mit ETO, gemessen anhand der Annexin V-Propidiumiodid-Färbung. Die Kontrolle (K) zeigt die Ergebnisse unbehandelter Zellen, DMSO die nach Zusatz von 0,25 % DMSO über 24 h. Aufgetragen wurde der Mittelwert mit Standardabweichung (n=3).

In einer zweiten Versuchsreihe wurde der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen über einen Zeitraum von acht Tagen verfolgt. Hierzu wurden  $1 \times 10^5$  HT-29-Zellen ausplattiert, nach 24 Stunden gemäß Tabelle 3.1 behandelt und nach 24, 48, 72, 96, 120 und 192 Stunden geerntet, wobei alle Ansätze nach 72 Stunden 1,5 ml frisches Medium zusätzlich erhielten. Bei der Aufarbeitung wurden die Ansätze geteilt und je zur Hälfte zur Untersuchung mittels Annexin V-Färbung und zur Zellzyklusanalyse verwendet.

## Ergebnisse

Betrachtet man die Summe der apoptotischen und nekrotischen Zellen, so zeigt sich nach allen getesteten Konzentrationen von DOX und ETO eine kontinuierliche Zunahme über den gesamten Zeitraum (Abbildung 3.9). Der Anteil toter Zellen bewegte sich 192 Stunden nach Entfernung des Zytostatikums um 80 %. Eine Ausnahme bildeten die Zellen, die eine einstündige Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  ETO erhalten hatten: Hier betrug der Anteil nur 41,2 %. Bei den DOX-behandelten Zellen fiel zudem auf, dass der Anteil membrangeschädigter Zellen nach 750 nM DOX zu allen Zeitpunkten 12 bis 32 % über dem Anteil nach 250 nM lag. Dies steht im Einklang mit den mikroskopischen Beobachtungen.



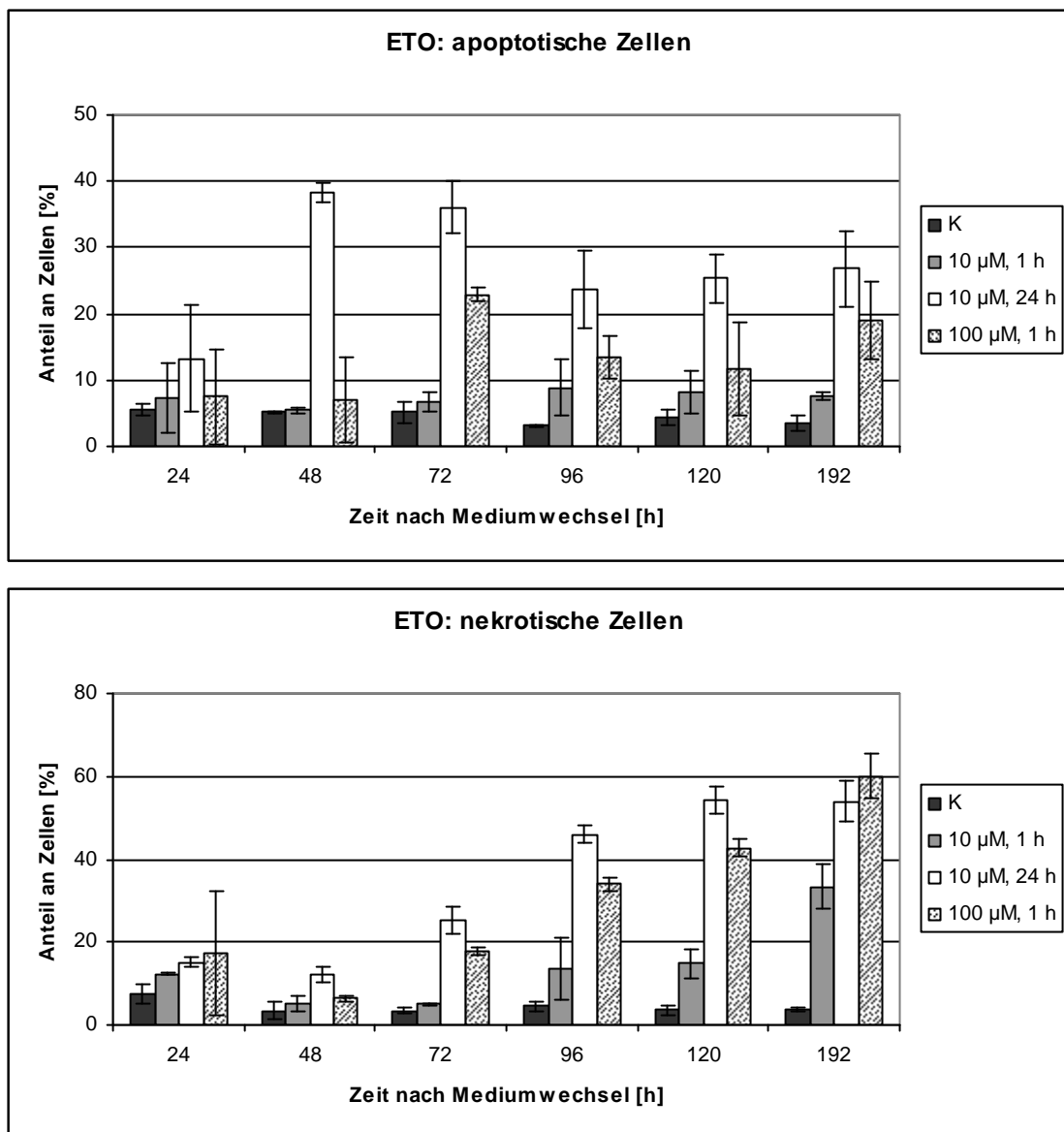
**Abbildung 3.9:** Anteil membrangeschädigter HT-29-Zellen nach Behandlung mit DOX und ETO, gemessen am FACS. Die Untersuchung erfolgte über einen Zeitraum von acht Tagen. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung (n=2).



## Ergebnisse

Wenn man den Anteil der apoptotischen und nekrotischen Zellen nach ETO-Behandlung getrennt betrachtet, ergibt sich ein interessanter Unterschied (Abbildung 3.10): Während die Zahl der nekrotischen Zellen hier ebenfalls kontinuierlich stieg, verlief der apoptotische Anteil entgegengesetzt. So stieg er zunächst je nach Inkubation über 48 bis 96 Stunden nach Mediumwechsel an, bevor er anschließend kontinuierlich sank.

Die unbehandelte Kontrolle zeigte einen konstanten prozentualen Anteil toter Zellen.



**Abbildung 3.10:** Anteil apoptotischer und nekrotischer HT-29-Zellen nach Behandlung mit ETO. Die Untersuchung erfolgte über einen Zeitraum von acht Tagen (n=2).

### 3.1.5.4 Analyse der Zellverteilung auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus

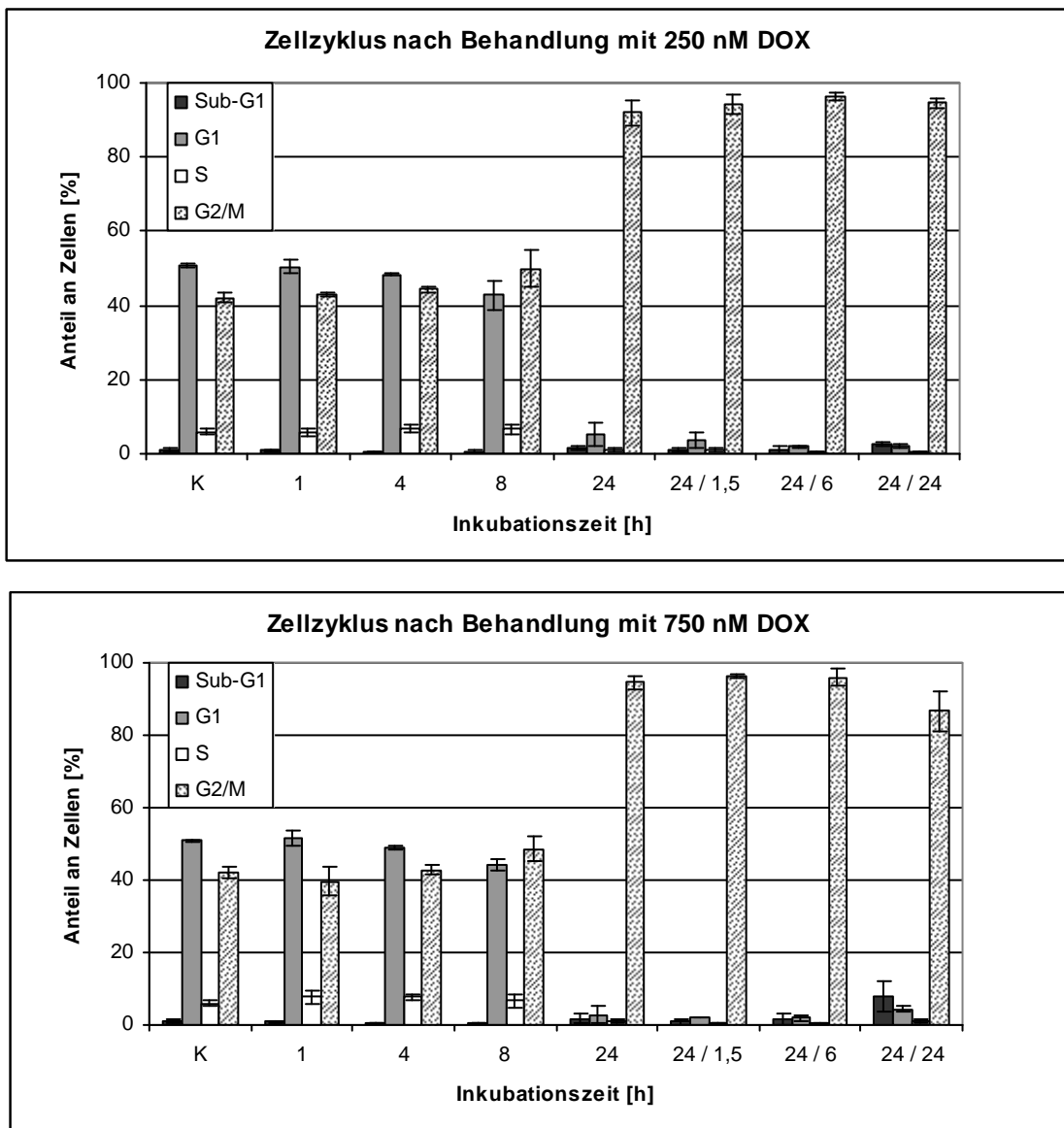
Durch Messung des DNA-Gehalts von Zellen lässt sich deren momentane Zellzyklusphase bestimmen. Er kann durch Einbringen eines Fluoreszenzfarbstoffs in die Zelle ermittelt werden, welcher quantitativ in die DNA interkaliert. Hier wurde Propidiumiodid eingesetzt, das nach Fixierung der Membran mit Ethanol in die Zelle eindringen und interkalieren kann. 30.000 der markierten Zellen wurden anschließend durchflusszytometrisch im FACS vermessen und anhand des Propidiumiodidsignals, welches proportional zum DNA-Gehalt ist, in Zellen der G<sub>1</sub>-Phase (einfache DNA-Menge), S-Phase (zwischen ein- und zweifacher Menge) und G<sub>2</sub>/M-Phase (zweifache DNA-Menge) eingeteilt. Zellen, die weniger als die einfache Menge DNA aufweisen, sind apoptotische Körperchen, hier als Sub-G<sub>1</sub>-Zellen bezeichnet.

Die Behandlung von HT-29-Zellen mit DOX zeigte, dass es in den ersten vier Stunden der Inkubation keine Veränderung der Zellverteilung auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus gab (Abbildung 3.11). Erst nach acht Stunden kam es zu einer leichten Abnahme von G<sub>1</sub>-Zellen zu Gunsten des G<sub>2</sub>/M-Anteils. Nach 24 Stunden befanden sich 91,9 % (250 nM DOX) bis 94,5 % (750 nM) aller Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase. Wurde zu diesem Zeitpunkt das Medium gegen frisches gewechselt, blieb die Blockade des Zellzyklus in den folgenden Stunden bestehen. Lediglich nach weiteren 24 Stunden war ein leichter Rückgang des G<sub>2</sub>/M-Anteils zu verzeichnen. Er entstand durch eine Zunahme von G<sub>1</sub>- und vor allem Sub-G<sub>1</sub>-Zellen. Letzteres war nach 750 nM DOX stärker ausgeprägt als nach 250 nM. Abgesehen von diesem Unterschied waren die beobachteten Effekte bei beiden Konzentrationen gleich.

Die Behandlung mit 10 µM ETO führte zu vergleichbaren Ergebnissen (Abbildung 3.12 oben). Auch hier gab es in den ersten vier Stunden der Inkubation keine Verschiebung innerhalb des Zellzyklus. Erst nach acht Stunden hatte sich der Anteil an G<sub>2</sub>/M-Zellen von 42,1 auf 66,5 % deutlich erhöht und der Anteil an G<sub>1</sub>-Zellen von 50,9 auf 27,4 % erniedrigt, wobei dieser Effekt im Vergleich mit den Ergebnissen der DOX-Untersuchung stärker ausgeprägt war. Nach 24 Stunden zeigten die Zellen jedoch die gleiche Verteilung wie DOX-behandelte Zellen, also eine Blockade des

## Ergebnisse

Zellzyklus in der G<sub>2</sub>/M-Phase, die nach Mediumwechsel ebenfalls bestehen blieb.



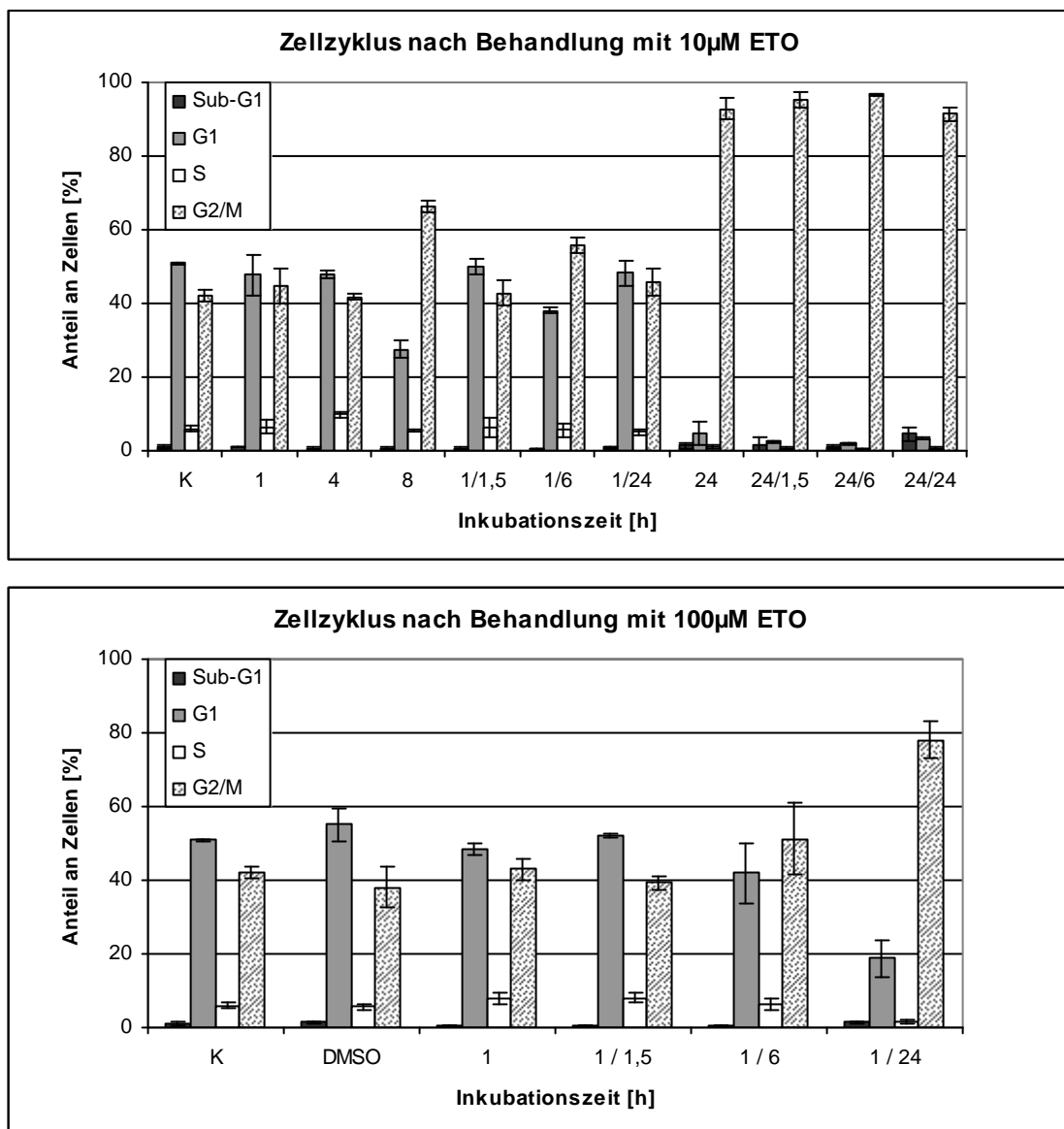
**Abbildung 3.11:** Veränderung der Zellzyklusverteilung nach Behandlung mit DOX. In der Grafik wurde für die vier Zellzyklusphasen der Anteil der Zellen in Prozent gegen die Dauer der DOX-Inkubation aufgetragen. K zeigt die Verteilung unbehandelter Kontrollzellen. Alle Werte wurden aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt.

Wurde das Kulturmedium bereits nach einstündiger Inkubation mit 10  $\mu$ M ETO gewechselt, so zeigte sich sechs Stunden später eine Umverteilung von G<sub>1</sub>- zu G<sub>2</sub>/M-Zellen, die nach 24 Stunden nicht mehr zu beobachten war (Abbildung 3.12 oben). Behandelte man die Zellen eine

## Ergebnisse

Stunde mit 100  $\mu\text{M}$  ETO, gab es sechs Stunden nach Mediumwechsel die gleiche Umverteilung zu verzeichnen (Abbildung 3.12 unten). Nach 24 Stunden war diese jedoch immer noch präsent und hatte sich zu Gunsten des G<sub>2</sub>/M-Anteils gesteigert, welcher 78,1 % betrug. Der Anteil an Sub-G<sub>1</sub>-Zellen war ebenfalls leicht gestiegen (1,4%).

Die G<sub>2</sub>/M-Akkumulation tritt bei ETO also nur nach Inkubation mit hoher Konzentration oder über lange Zeit auf. In diesen Fällen bleibt sie auch über den Zeitpunkt der maximalen Reparatur hinaus bestehen (Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.12:** Veränderung der Zellzyklusverteilung nach Behandlung mit ETO. K zeigt die Verteilung unbehandelter Kontrollzellen, DMSO die nach Behandlung mit 0,25 % DMSO über 24 Stunden. Die Werte wurden aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt.

## Ergebnisse

---

In einer zweiten Versuchsreihe wurde untersucht, wie sich die beschriebene Blockade des Zellzyklus über einen Zeitraum von acht Tagen verändert. Hierzu wurde die zweite Hälfte der in Abschnitt 3.1.5.3 geteilten Ansätze verwendet.

Abbildung 3.13 zeigt in der oberen Grafik die Veränderung der Zellzyklusverteilung von unbehandelten Kontrollzellen. Man sieht, dass sich der zunächst gleich hohe Anteil von G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>/M-Phase im Laufe der untersuchten Zeit um 22,6 % zu Gunsten von G<sub>1</sub> verschoben hat. Zudem kam es zu einer Abnahme an S-Phase-Zellen und einer minimalen Zunahme des Sub-G<sub>1</sub>-Anteils. Die Veränderungen bei der Kontrolle lassen sich durch den geringer werdenden Platz auf der Zellkulturplatte und den Verbrauch des Nährmediums erklären (Abschnitt 4.1.2.3).

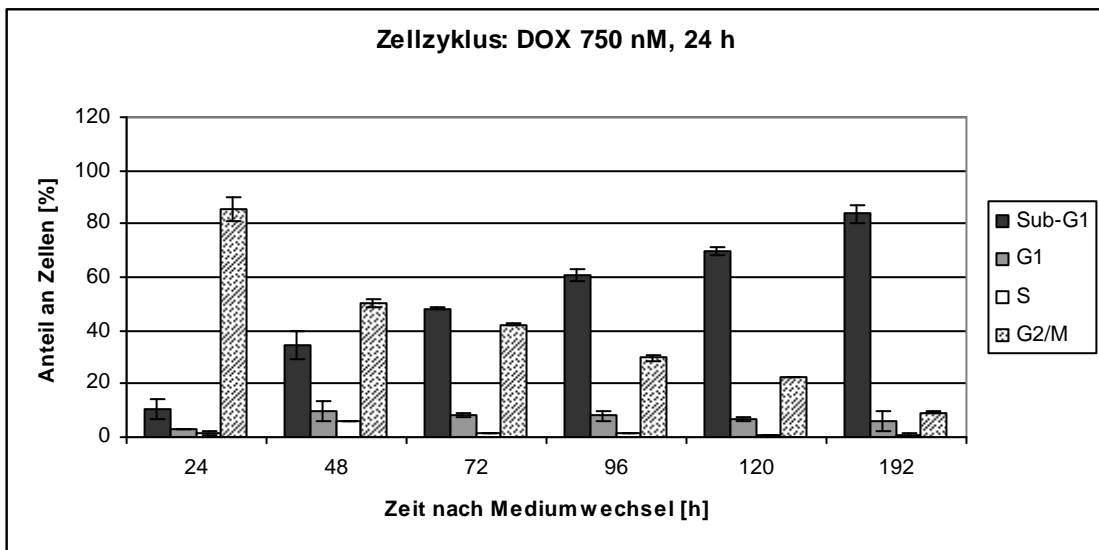
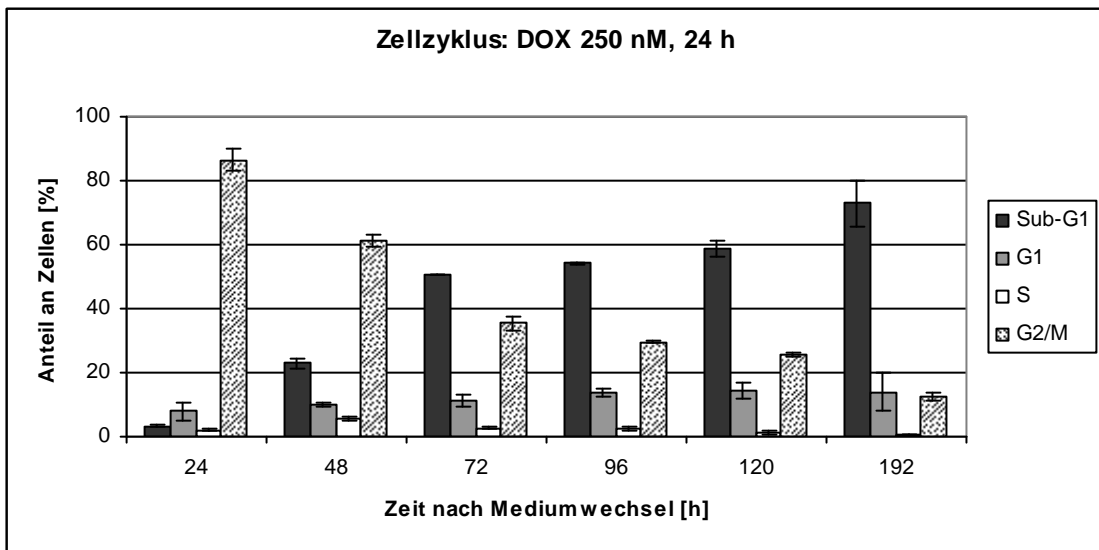
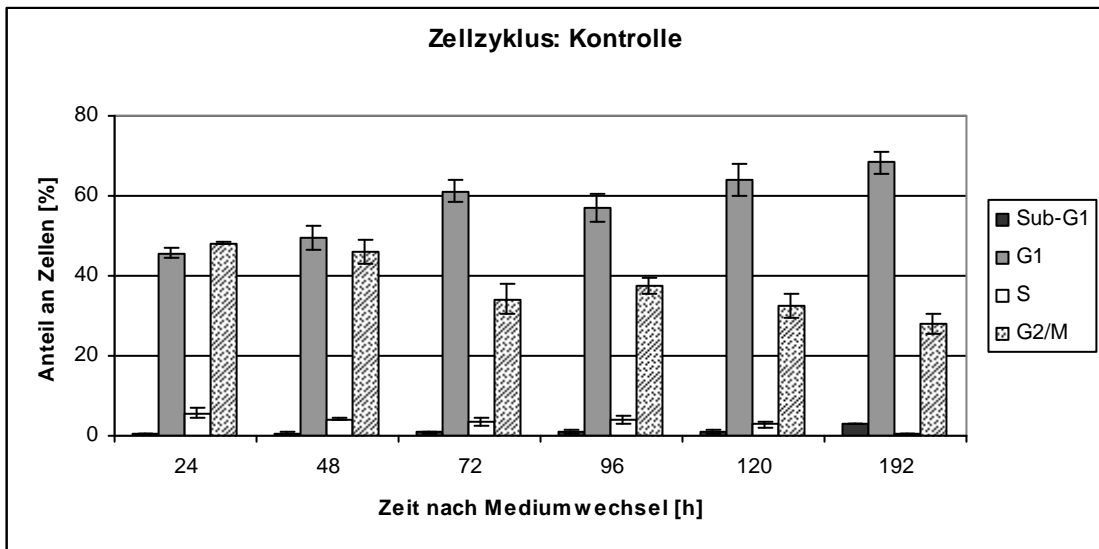
Anders sieht es bei den mit DOX inkubierten Zellen aus (Abbildung 3.13 Mitte und unten): Hier war eine deutliche Reduktion des G<sub>2</sub>/M-Anteils von 86,5 auf 12,6 % (250 nM) bzw. von 85,6 auf 9,2 % (750 nM) festzustellen. Im Gegenzug erhöhte sich der Anteil an Sub-G<sub>1</sub>-Zellen von 3,4 auf 73,0 % (250 nM) bzw. von 10,1 auf 83,8 % (750 nM). Die Zahl der G<sub>1</sub>-Phase-Zellen stieg dagegen nur um 5,8 (250 nM) bzw. 3,4 % (750 nM). Der Anteil der S-Phase verhielt sich ähnlich wie bei der Kontrolle.

Ein vergleichbares Bild zeigte sich nach der Inkubation mit 10 µM ETO für 24 h und 100 µM ETO für 1 h (Abbildung 3.14 Mitte und unten). Auch hier verringerte sich der G<sub>2</sub>/M-Anteil zu Gunsten der Sub-G<sub>1</sub>-Zellen und einer leichten Erhöhung von G<sub>1</sub>. Letztere ließ sich im Falle von 100 µM ETO nur bis 48 h beobachten. Danach sank der Anteil von 12,3 auf 6,3 %.

Eine andere Verteilung erhielt man lediglich nach einstündiger Behandlung mit 10 µM ETO (Abbildung 3.14 oben). Abbildung 3.12 zeigte bereits, dass dabei kein nennenswerter G<sub>2</sub>/M-Block eintritt. Auch hier war 24 und 48 Stunden nach Mediumwechsel nur eine geringe Erhöhung des G<sub>2</sub>/M-Anteils gegenüber der Kontrolle zu verzeichnen. Nach 72 Stunden ließ sich eine Zunahme des Sub-G<sub>1</sub>-Anteils um 2,5 % notieren. Diese hatte sich nach 192 h auf 26,6 % erhöht und ging zu Lasten der G<sub>1</sub>-Zellen. Im G<sub>2</sub>/M-Anteil gab es hingegen keine Veränderung gegenüber der Kontrolle.

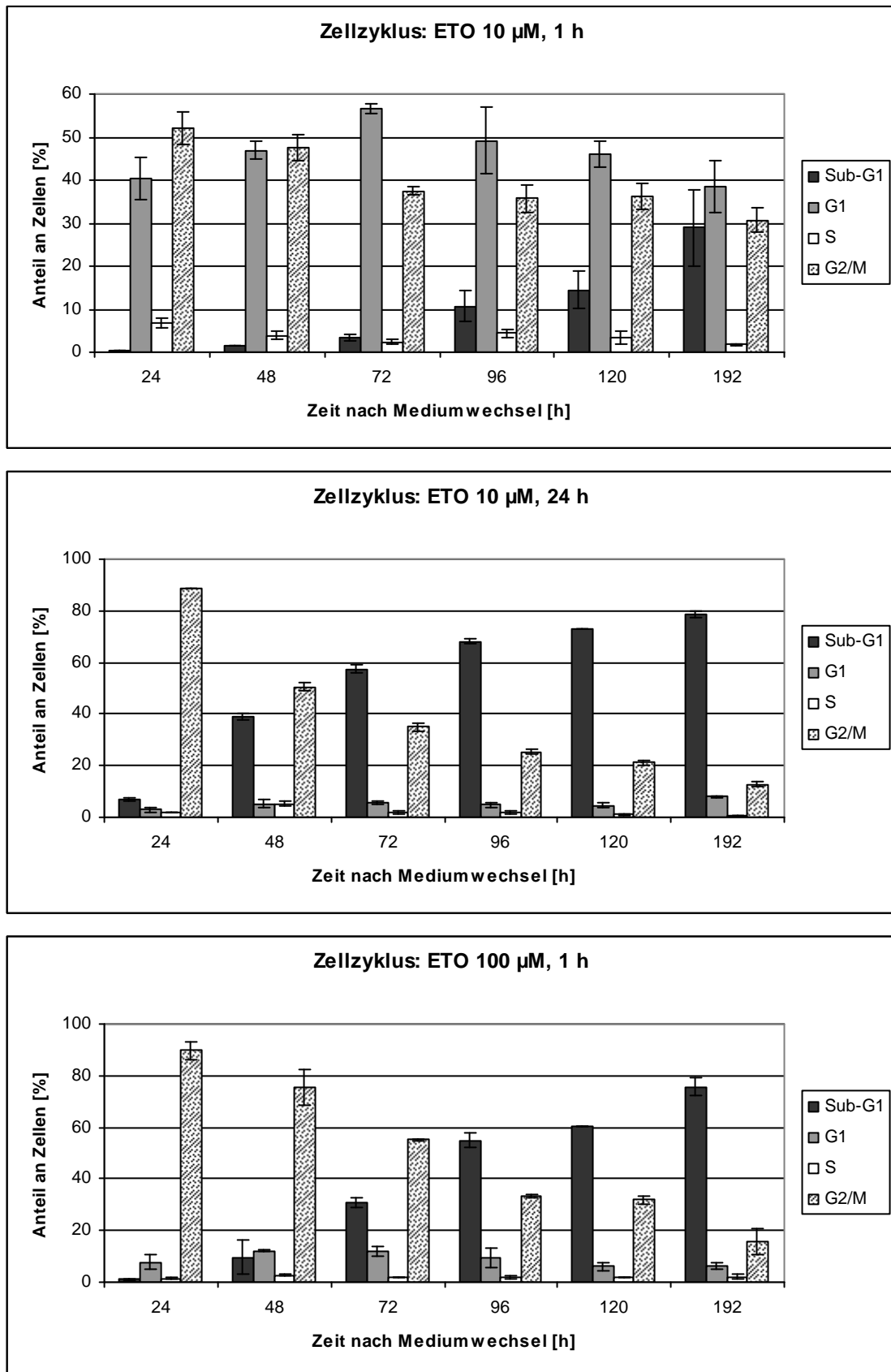
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Zellen aus dem G<sub>2</sub>/M-Block direkt in die Sub-G<sub>1</sub>-Fraktion toter Zellen übergehen.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.13:** Veränderung der Zellzyklusverteilung unbehandelter Kontrollzellen (oben) und nach Inkubation mit DOX (Mitte und unten) (n=2).

## Ergebnisse



**Abbildung 3.14:** Veränderung der Zellzyklusverteilung nach Behandlung mit ETO. Die Untersuchung erfolgte über einen Zeitraum von acht Tagen (n=2).

### 3.1.6 Untersuchung der an der DNA-Reparatur beteiligten Proteine

Der Einfluss der Topo II $\alpha$ -Inhibitoren auf den intrazellulären Gehalt der DNA-Reparaturproteine DNA-PK<sub>cs</sub>, Ku70, Ku86, Rad51, Rad52 und Rad54 wurde anhand von Western Blots und Slot Blots untersucht. 5x10<sup>5</sup> HT-29-Zellen je Ansatz wurden dazu vier bis fünf Tage nach Aussaat gemäß Tabelle 3.1 behandelt. Nach Ablauf der Inkubation wurde je ein Ansatz geerntet; die anderen Ansätze erhielten zytostatikafreies Medium und wurden vor der Proteinisolation weitere eins, sechs oder 24 Stunden inkubiert.

#### 3.1.6.1 Analyse der Wirkung von DOX und ETO auf Proteine des NHEJ und der HR

Zur Untersuchung der an NHEJ und HR beteiligten Proteine wurden die zellulären Proteine wie in der Standardmethode 7.5.1.1 beschrieben isoliert. Die DNA samt den daran gebundenen Proteinen wurde dabei verworfen. Das Isolat wurde gelelektrophoretisch getrennt und auf eine PVDF-Membran gebロットet. Dort folgten anschließend der immunologische Nachweis sowie die Quantifizierung der Proteine (Abschnitt 7.5.2.4). Letzteres erfolgte densitrometrisch im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle. Da ETO in DMSO gelöst vorliegt, erfolgte der Proteinvergleich in diesem Falle nicht mit unbehandelten Kontrollzellen, sondern unter Zusatz von 0,25 % DMSO über 24 Stunden. Vorversuche hatten gezeigt, dass es hierdurch zu keiner signifikanten Änderung gegenüber unbehandelten Zellen kommt.

Als interne Kontrolle diente die Bandenstärke des Coomassie-gefärbten Proteingels. Sie wurde zur Korrektur der bei der Proteinquantifizierung ermittelten Bandenstärke heran gezogen.

Die NHEJ-Proteine DNA-PK<sub>cs</sub>, Ku70 und Ku86 wurden auf derselben Membran detektiert und konnten so direkt mit einander verglichen werden. Das Gleiche gilt für Rad51, Rad52 und Rad54, die Proteine der HR.

Zunächst wurden die Proteine des NHEJ untersucht: Zum Zeitpunkt des Mediumwechsels waren hierbei bei allen drei untersuchten Proteinen und allen getesteten Zytostatika-Konzentrationen kaum Änderungen gegenüber der Kontrolle zu verzeichnen (Abbildungen 3.15 - 3.17). Lediglich nach 24-stündiger Inkubation mit 10  $\mu$ M ETO zeigten sich sowohl DNA-PK<sub>cs</sub> als auch Ku70 und Ku86 signifikant verringert; nach 100  $\mu$ M ETO für eine Stunde war DNA-PK<sub>cs</sub> hingegen leicht, aber signifikant erhöht.



## Ergebnisse

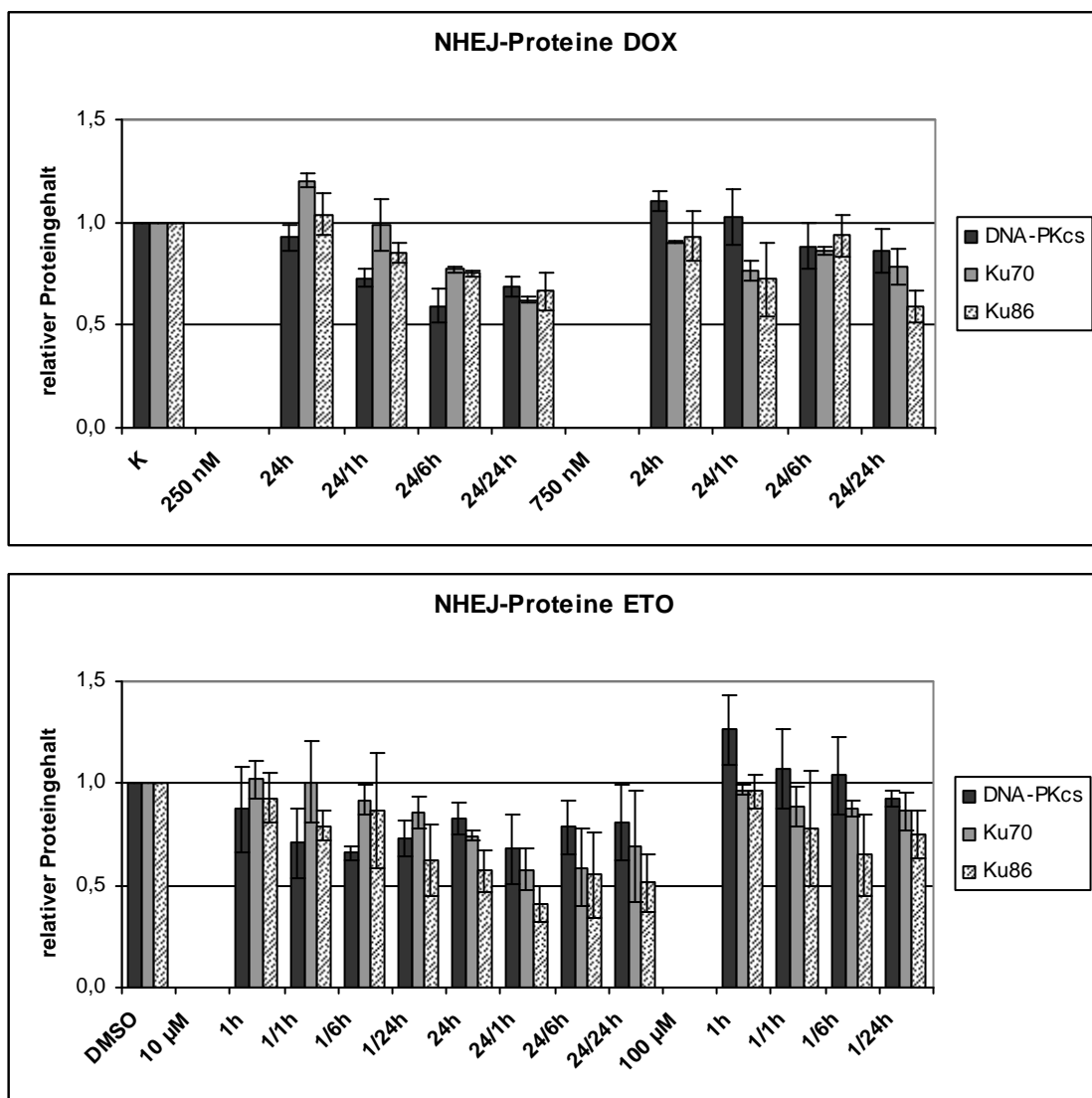
Bereits eine Stunde später ließ sich bei allen Ansätzen eine leichte Abnahme der drei Proteine beobachten, die sich in den meisten Fällen stetig fortsetzte. Dieser Effekt erwies sich 24 Stunden nach Mediumwechsel in den folgenden Ansätzen als statistisch signifikant:

DNA-PK<sub>cs</sub>: 250 nM DOX für 24 h und 100  $\mu$ M ETO für 1 h

Ku70: 250 nM DOX für 24 h und 10  $\mu$ M ETO für 1 h

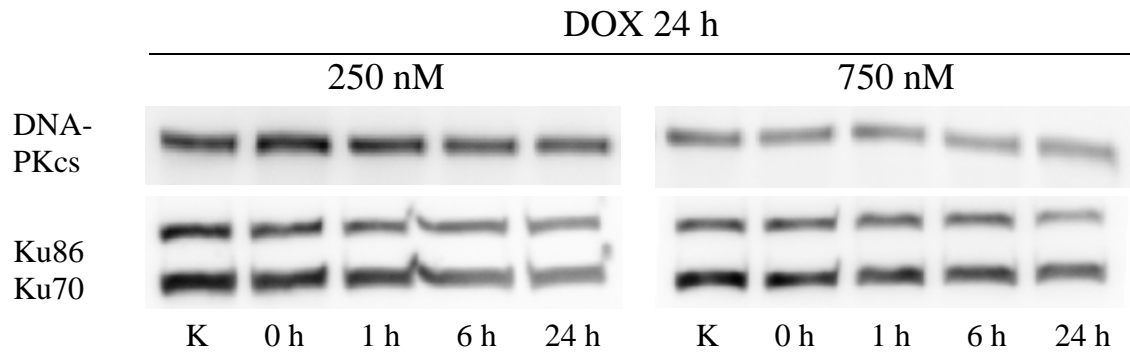
Ku86: alle getesteten Inkubationen von DOX und ETO

Bei den übrigen Ansätzen trat zwar eine entsprechende Tendenz auf, jedoch mit unterschiedlichem interexperimentellen Ausmaß.

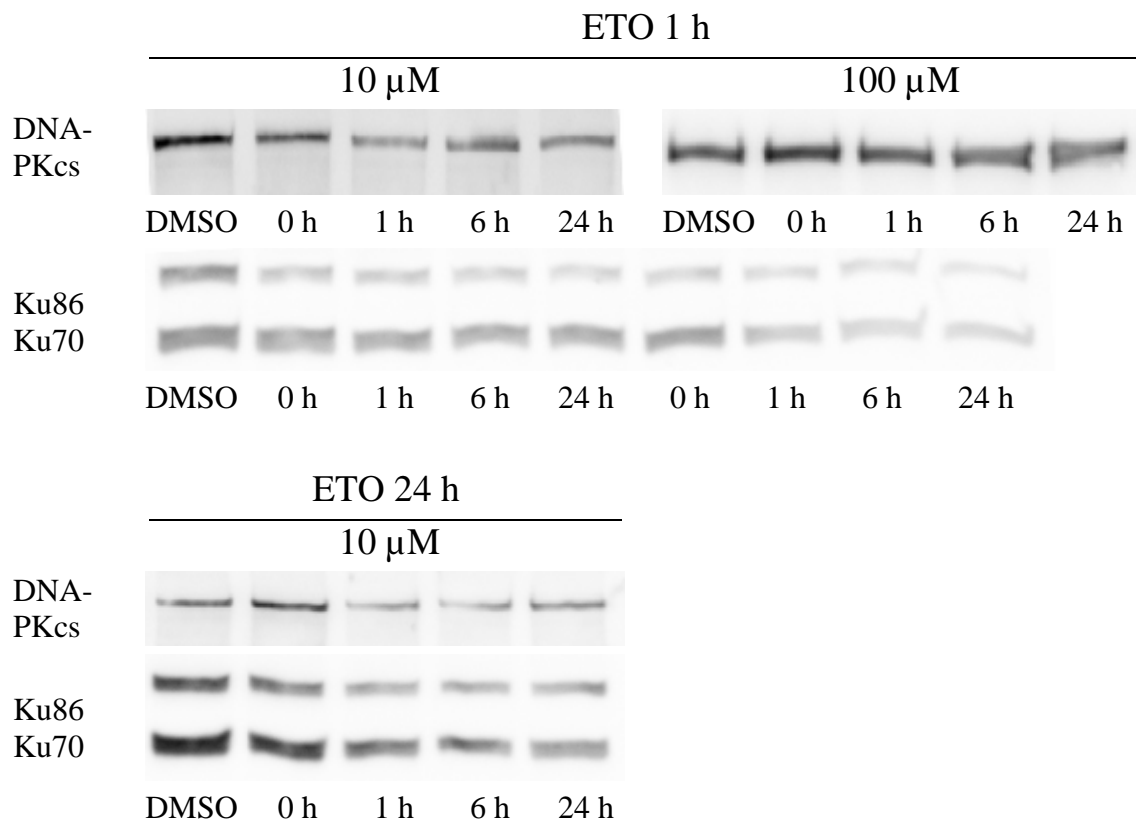


**Abbildung 3.15:** Wirkung von DOX und ETO auf NHEJ-Proteine in HT-29-Zellen. Der Mediumwechsel erfolgte nach 24 h (DOX) bzw. 1 oder 24 h (ETO).

## Ergebnisse



**Abbildung 3.16:** Western Blot-Analyse der Wirkung von DOX auf NHEJ-Proteine. Die Proteingrößen betragen 420 (DNA-PK<sub>cs</sub>), 86 (Ku86) und 70 kDa (Ku70).



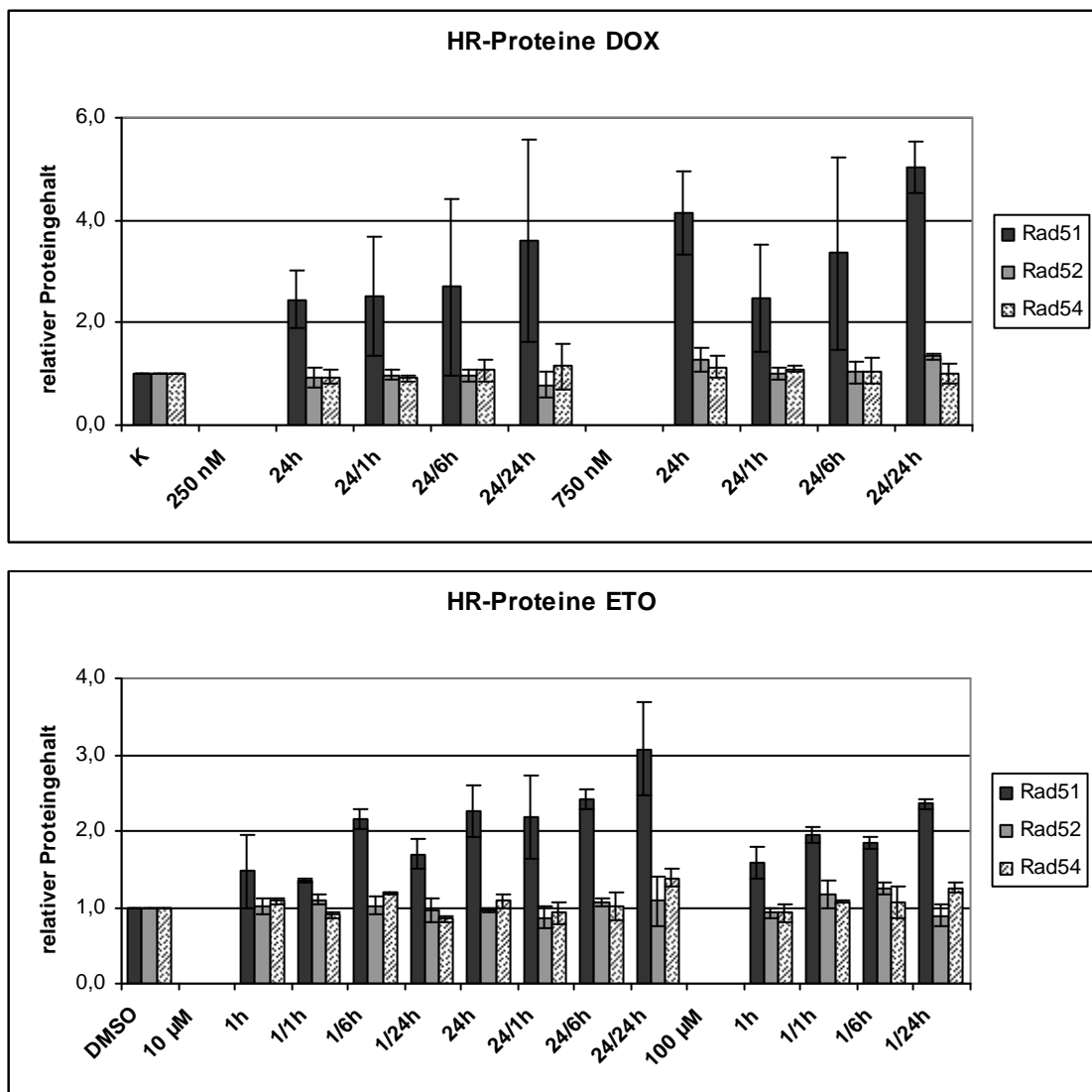
**Abbildung 3.17:** Western Blot-Analyse der Wirkung von ETO auf NHEJ-Proteine.

Die Analyse der HR-Proteine ergab ein anderes Bild (Abbildungen 3.18 - 3.20): Hier kam es zu einem drastischen Anstieg des Proteins Rad51. Nach 24-stündiger DOX-Behandlung ließ sich bereits eine signifikante Zunahme um den Faktor 2,5 (250 nM) bzw. 4,1 (750 nM) verzeichnen, die bei 250 nM DOX im weiteren Verlauf stetig anstieg und 24 Stunden nach Mediumwechsel die 3,6-fache Konzentration der Kontrolle erreichte. Mit

## Ergebnisse

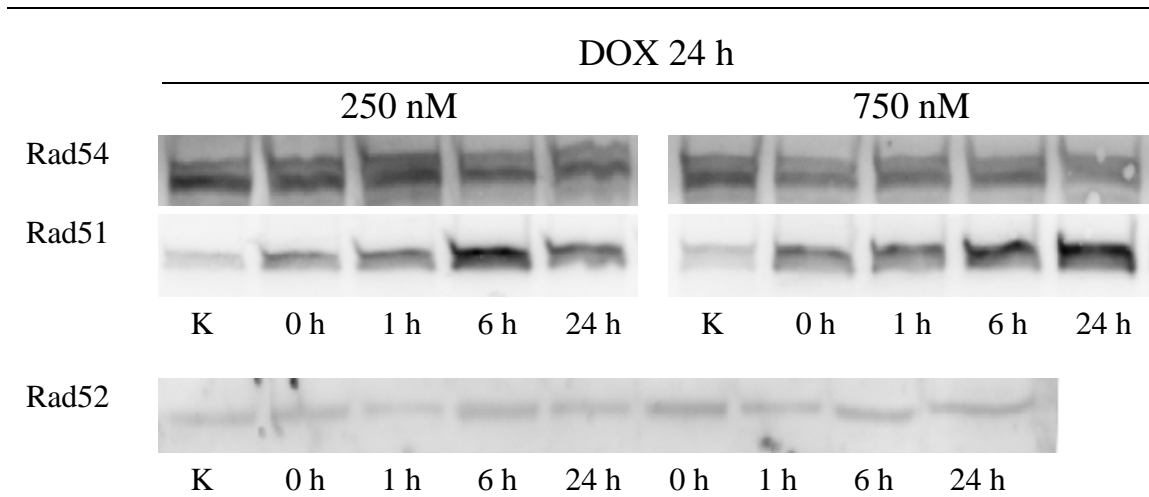
750 nM behandelte Zellen zeigten eine Erhöhung des Rad51-Gehalts auf das Fünffache. ETO-behandelte Zellen wiesen ein ähnliches Bild auf, allerdings lag die Erhöhung von Rad51 nach einstündiger Behandlung noch im Bereich von 1,5 bis 1,6. Über die nächsten 24 h stieg der Gehalt jedoch auch hier auf das 1,7-fache (10  $\mu$ M) bzw. 2,4-fache (100  $\mu$ M) an. Nach 24-stündiger ETO-Behandlung wiesen die Zellen eine ähnlich starke Rad51-Zunahme auf wie DOX-behandelte Zellen.

Bei Rad52 war im Gegensatz dazu keine Veränderung zu erkennen und Rad54 zeigte lediglich nach 10  $\mu$ M ETO 24/24 h und 100  $\mu$ M ETO 1/24 h eine leichte, allerdings signifikante Erhöhung seiner Konzentration.

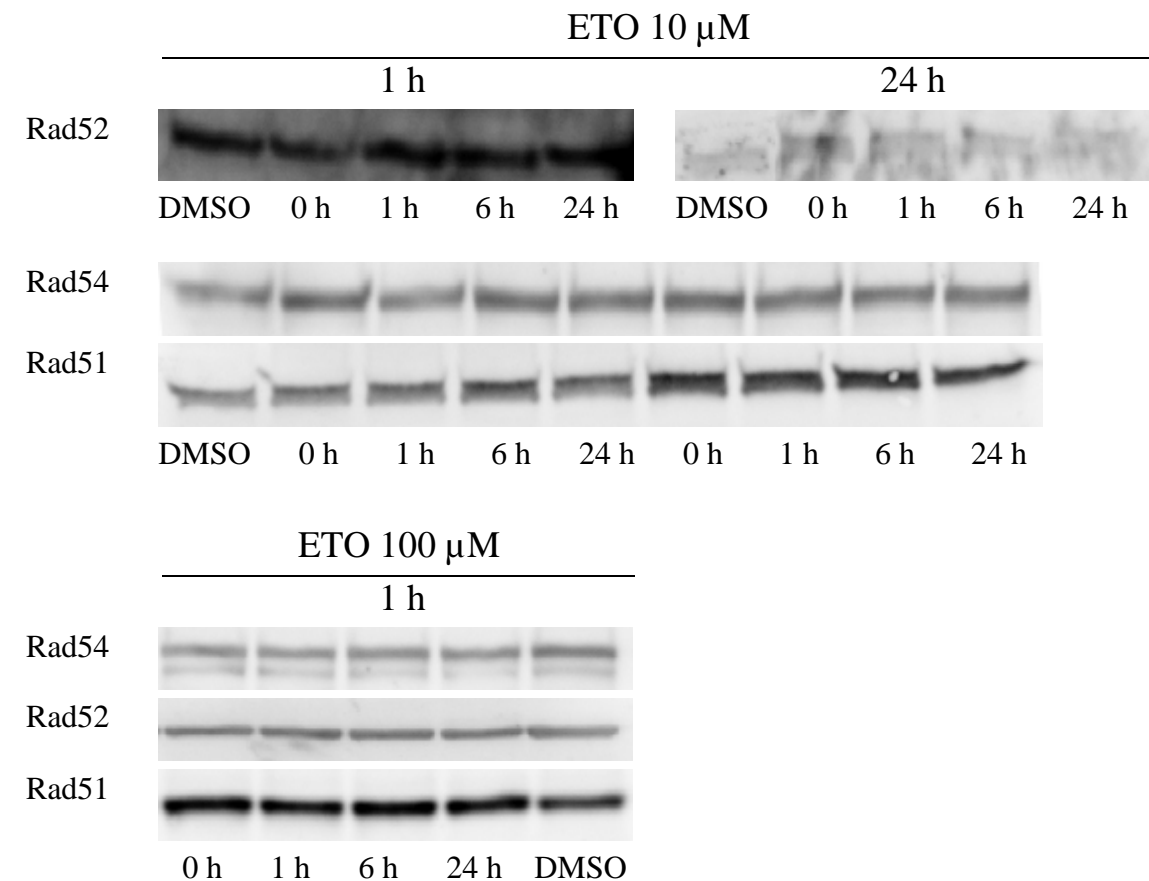


**Abbildung 3.18:** Wirkung von DOX und ETO auf Proteine der homologen Rekombination in HT-29-Zellen.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.19:** Western Blot-Analyse der Wirkung von DOX auf HR-Proteine. Die Proteingröße betrug 84 bzw. 37 kDa für Rad54 und Rad51, die von Rad52 betrug 46 kDa.



**Abbildung 3.20:** Western Blot-Analyse der Wirkung von ETO auf HR-Proteine.

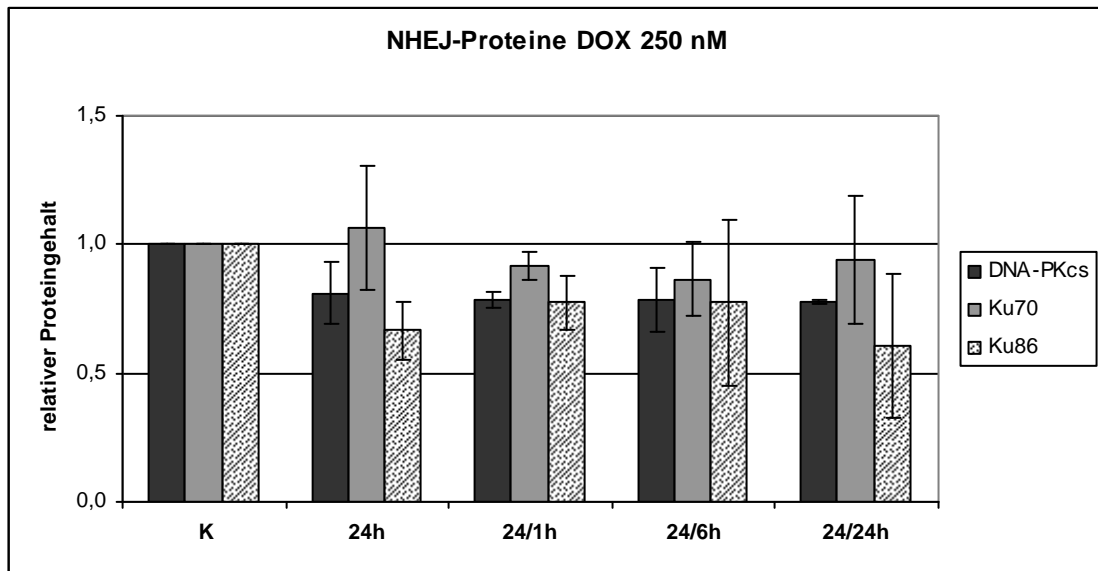
### 3.1.6.2 Untersuchung des Gesamtproteins

Da Proteine, die zum Zeitpunkt der Isolierung an die DNA gebunden vorliegen, bei der Standardmethode nicht von jener gelöst und somit mit dem DNA-Pellet verworfen werden, sollten die DNA-gebundenen Proteine in einer zweiten Versuchsreihe mit erfasst werden. Dazu wurde die Proteinisolierung um eine 7,5-minütige Behandlung im Ultraschallbad ergänzt (Abschnitt 7.5.1.1). Hierdurch werden die Proteine mechanisch von der DNA gelöst.

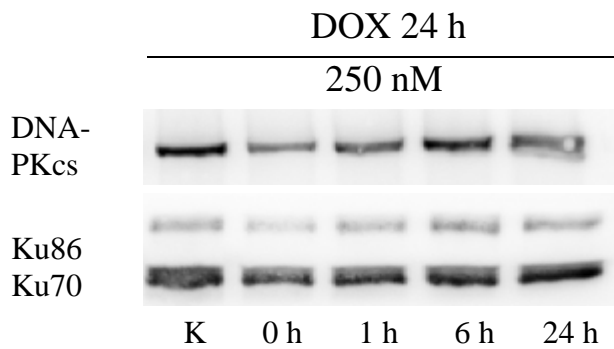
Durch die Untersuchung sollte überprüft werden, ob die im vorherigen Abschnitt beobachtete Abnahme der NHEJ-Proteine durch Bindung an die DNA bedingt ist, wie sie im Rahmen der DNA-Reparatur auftritt. Der Anteil von DNA-PK<sub>cs</sub>, Ku70 und Ku86 sollte in diesem Fall im Gesamtprotein konstant bleiben. Da die Abnahme der NHEJ-Proteine nach Behandlung mit DOX ausgeprägter war als nach ETO-Behandlung, erfolgte die Untersuchung des Gesamtproteins an DOX-behandelten HT-29-Zellen.

Die Abbildungen 3.21 und 3.22 zeigen am Beispiel von DOX 250 nM, dass die zuvor in Abbildung 3.15 beobachtete Abnahme von DNA-PK<sub>cs</sub>, Ku70 und Ku86 bei Untersuchung des Gesamtproteins deutlich geringer ausfällt. So wird 24 Stunden nach Mediumwechsel lediglich bei DNA-PK<sub>cs</sub> statistische Signifikanz erreicht, während nach Isolation ohne den DNA-gebundenen Anteil alle drei Proteine statistisch signifikant reduziert waren. Die in Abbildung 3.15 beobachtete Abnahme der NHEJ-Proteine ist also, zumindest teilweise, auf Bindung an die DNA zurückzuführen.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.21:** Veränderung von DNA-PKcs, Ku70 und Ku86 im Gesamtprotein nach Inkubation mit 250 nM DOX (n=2).



**Abbildung 3.22:** Untersuchung des Gesamtproteins nach Inkubation mit 250 nM DOX mittels Western Blot. Die Bande von DNA-PK<sub>cs</sub> lag auf einer Höhe von 420 kDa. Ku70 und Ku86 wurden bei 70 bzw. 86 kDa detektiert.

### 3.1.7 Expressionshemmung und Inhibition von DNA-Reparaturproteinen

In den vorangegangenen Abschnitten dieser Arbeit wurde untersucht, wie HT-29-Zellen auf Topo II $\alpha$ -Inhibitor-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche reagieren und inwiefern sich der intrazelluläre Gehalt von NHEJ- und HR-Reparaturproteinen verändert. Im folgenden Abschnitt soll untersucht werden, welcher dieser beiden Reparaturwege wann von Bedeutung ist und wie das Zellsystem auf die Ausschaltung von Schlüsselproteinen reagiert. Dies kann entweder durch spezifische Inhibition des Proteins geschehen oder durch siRNA-vermittelte Degradierung der entsprechenden mRNA. Während das Enzym durch die Inhibition lediglich in seiner Funktion gehemmt wird, wird es durch Einsatz einer entsprechend targetierenden siRNA gar nicht erst gebildet. Durch siRNA kommt es also zum Knockout.

Zur Inhibition des NHEJ – genauer des zentralen Proteins DNA-PK<sub>cs</sub> – wurde 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzaldehyd (DMNB) eingesetzt. DMNB ist ein zellpermeables Vanillin-Derivat, das die Aktivität von DNA-PK<sub>cs</sub> selektiv inhibiert (IC<sub>50</sub> = 15  $\mu$ M am isolierten Enzym). Die Aktivität der mit DNA-PK<sub>cs</sub> verwandten Kinasen Chk2 und Proteinkinase C wird nicht beeinflusst<sup>[119]</sup>.

Auf mRNA-Ebene wurden die Proteine Ku70 (NHEJ) und Rad51 (HR) ausgeschaltet. Der Erfolg wurde mittels Proteinisolierung und Slot Blot überprüft (Abschnitte 7.5.3 und 7.6). Der Slot Blot ist dem Western Blot an dieser Stelle vorzuziehen, da die Transfektion im nanomolaren Bereich erfolgt und die erhaltenen Proteinmengen für einen Western Blot zu gering sind.

Ziel der Transfektion ist eine hohe Ausschaltungsrate des Proteins, bei gleichzeitig möglichst geringer Toxizität durch das Transfektionsreagenz. Zudem soll die Ausschaltung selektiv erfolgen. Im Slot Blot zeigte sich, dass die optimale Transfektionsdauer für Ku70 in den verwendeten Zellen 48 h beträgt. Bei Rad51 beträgt das Optimum 72 h. Der Proteingehalt von Ku70 ließ sich dadurch um  $67 \pm 13$  % senken; Rad51 wurde um  $84 \pm 5$  % reduziert. Um unspezifische Effekte durch siRNA und Transfektionsreagenz auszuschließen, wurde zudem eine nicht-targetierende Sequenz als Negativkontrolle eingesetzt (Kontroll-siRNA). Hierdurch kam es zu einer

## Ergebnisse

leichten Reduktion des Ku70-Levels. Der Rad51-Gehalt wurde nicht beeinflusst. Tabelle 3.2 zeigt eine Übersicht über den Erfolg der Ausschaltung und die Spezifität der siRNA.

<i>siRNA</i>	<i>Restprotein[%]</i>	
	<i>Ku70-Antikörper</i>	<i>Rad51-Antikörper</i>
Kontrolle	100 ± 0 %	100 ± 0 %
Kontroll-siRNA 48 h	69 ± 3 %	96 ± 1 %
Ku70 48 h	33 ± 13 %	82 % (n=1)
Rad51 72 h	72 ± 1 %	16 ± 5 %

**Tabelle 3.2:** Anteil an verbliebenem Ku70- und Rad51-Protein nach erfolgter Transfektion, verglichen mit untransfizierten Kontrollzellen (n=2)

In einer Zeitreihe wurde zudem die Dauer der Proteinreduktion untersucht. Dazu wurde das Medium am Ende der Transfektion gegen frisches Medium getauscht und der Gehalt von Ku70 und Rad51 nach 0, 3, 6 und 23 h im Slot Blot bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3 zusammen gefasst. Aus der Literatur ist eine Halbwertszeit von 40 Stunden für Rad51 bekannt <sup>[120]</sup>. Der Umsatz von Ku70 ist ebenfalls gering <sup>[121]</sup>.

<i>Zeit nach Transfektionsende</i>	<i>Restprotein [%]</i>	
	<i>Ku70 48 h</i>	<i>Rad51 72 h</i>
0 h	28 ± 2 %	19 ± 1 %
3 h	58 ± 4 %	12 ± 1 %
6 h	56 ± 4 %	31 ± 2 %
23 h	56 ± 4 %	43 ± 2 %

**Tabelle 3.3:** Entwicklung des Ku70- bzw. Rad51-Proteingehalts nach Ende der siRNA-Transfektion (n=2)



### 3.1.7.1 Einfluss auf den Verlauf der DNA-Schädigung

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Ausschaltung der Schlüsselproteine den in Abschnitt 3.1.2 beobachteten Verlauf der DNA-Schädigung verändert. Sind diese Proteine an der Reparatur der Doppelstrangbrüche beteiligt, so ist bei ihrer Ausschaltung eine Verzögerung oder Blockade der Reparatur zu erwarten. Repräsentativ für DOX und ETO wurden Behandlungen mit 250 nM DOX für 24 Stunden und 100 µM ETO für eine Stunde gewählt.

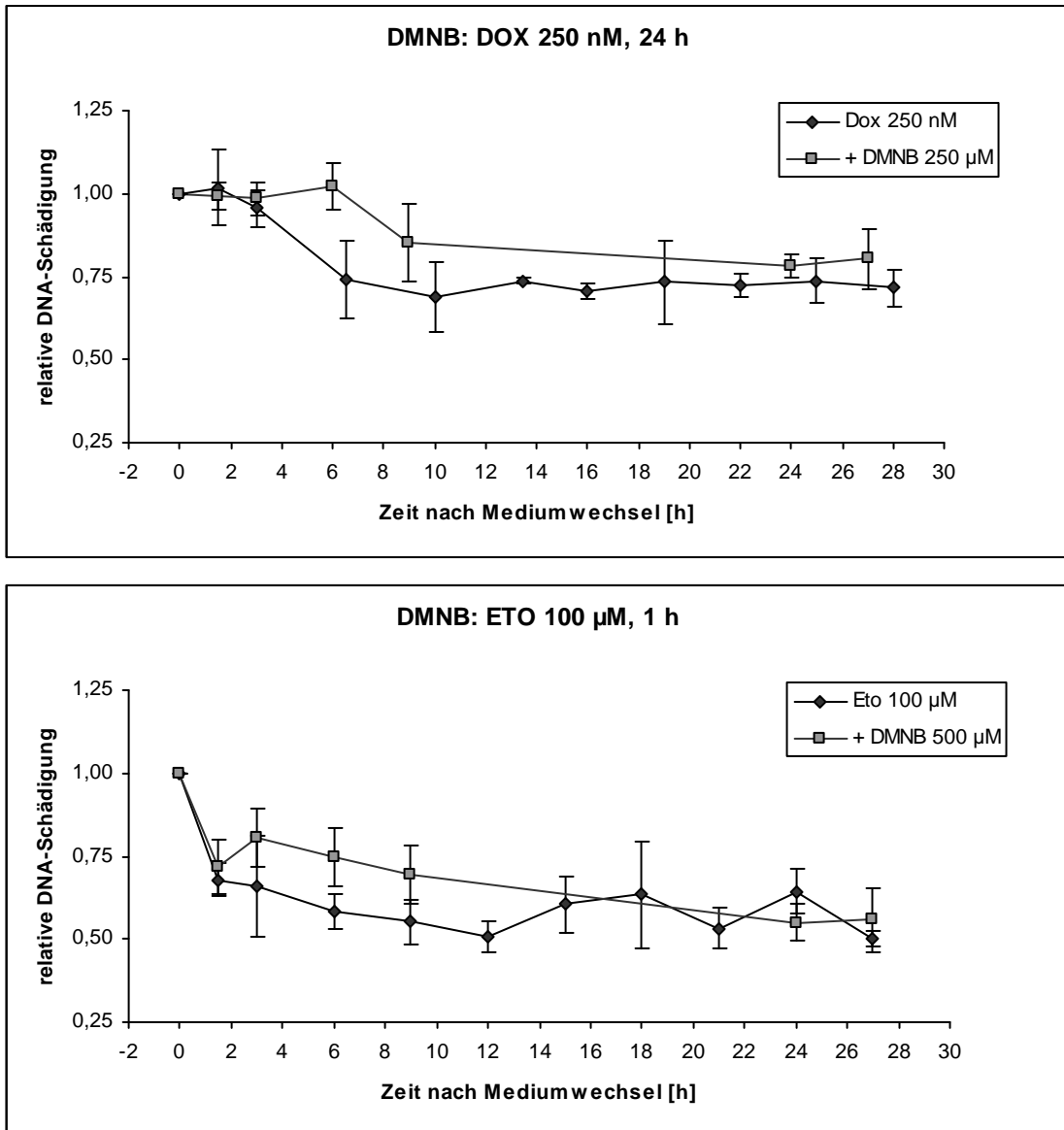
Für die Versuche mit dem DNA-PK-Inhibitor wurden  $2,5 \times 10^5$  HT-29-Zellen analog Abschnitt 3.1.2 behandelt, nach Austausch des Mediums mit DMNB versetzt und zu insgesamt sieben Zeitpunkten mittels Comet-Assay analysiert. Da insbesondere die frühe Phase des Verlaufs interessant erschien, wurde das Hauptaugenmerk auf die ersten neun Stunden gelegt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Kurven wurde die Schädigung im Moment der DMNB-Zugabe (Zeitpunkt 0 h) auf eins normiert. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da die zu vergleichenden Ansätze bis dorthin identisch behandelt wurden und Unterschiede daher erst im Anschluss an die DMNB-Zugabe auftreten können.

Der Zusatz von 15 bis 125 µM DMNB eine Stunde vor Mediumwechsel und/oder zum Zeitpunkt 0 h bewirkte im Vorversuch keine Änderungen im Reparaturverlauf. Diese traten bei DOX erst nach Gabe von 250 µM DMNB und bei ETO nach 500 µM auf. Die Ergebnisse werden in Abbildung 3.23 wiedergegeben, im Vergleich mit der in Abschnitt 3.1.2 ermittelten Kurve. Wie in der oberen Grafik zu erkennen, verzögerte der DNA-PK-Inhibitor die Reparatur der DOX-induzierten Strangbrüche um etwa drei Stunden. 24 Stunden nach Mediumwechsel ließen sich in der Höhe der vorliegenden Schädigungen keine Unterschiede mehr feststellen.

Die Reparatur der durch ETO induzierten Strangbrüche verlief in den ersten 1,5 Stunden mit DMNB hingegen genauso schnell wie ohne DMNB (Abbildung 3.23 untere Grafik). Drei Stunden nach Mediumwechsel war im Unterschied dazu jedoch eine Zunahme an Strangbrüchen zu verzeichnen. Diese war in allen drei Versuchen reproduzierbar und ist, wie ein entsprechender Test zeigen konnte, nicht auf das Lösungsmittel DMSO zurückzuführen. Danach verliefen die Kurven zunächst parallel und endeten

## Ergebnisse

schließlich auf gleichem Niveau. Die ohne DMNB zwischen 12 und 27 h aufgetretenen Anstiege der Doppelstrangbruchzahl konnten mit DMNB aufgrund der geringeren Probenzahl nicht erfasst werden.



**Abbildung 3.23:** Verlauf der DNA-Schädigung unter Zusatz von DMNB (n=3). Die Kurven wurden auf eine Initialschädigung von eins normiert.

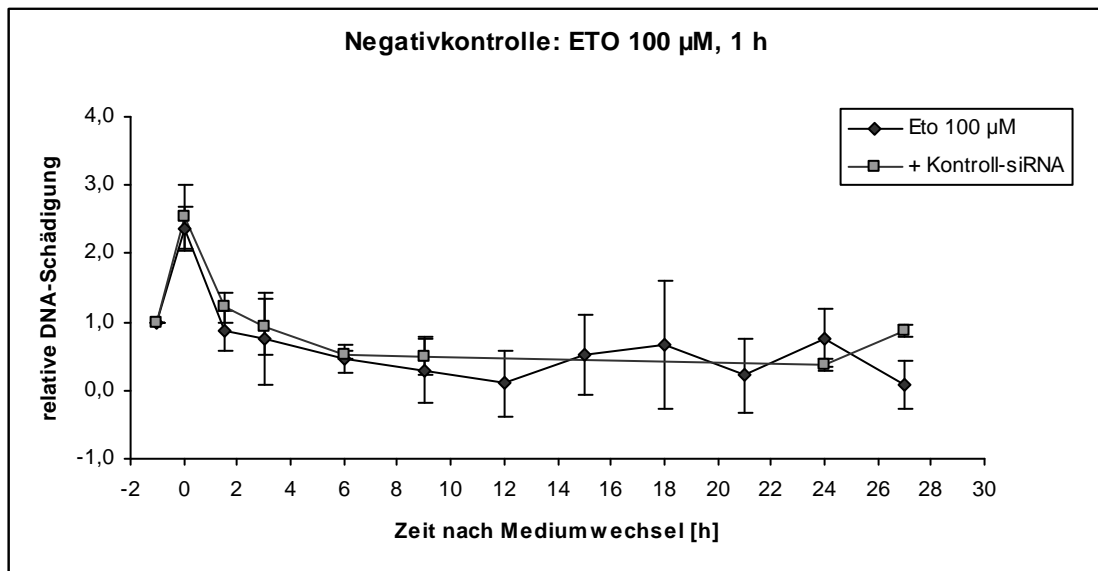
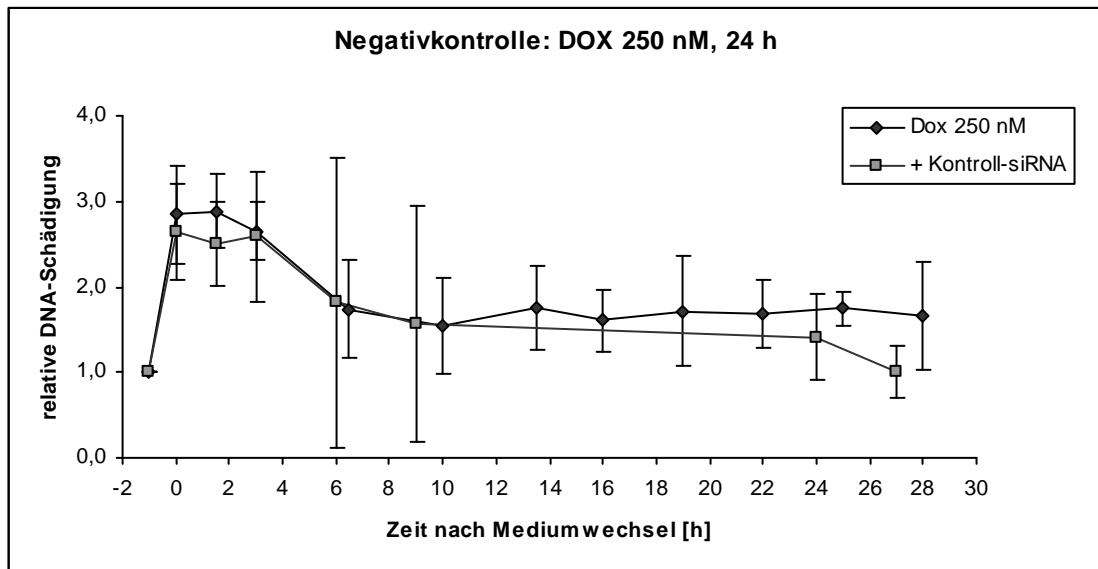
## Ergebnisse

---

Die siRNA-transfizierten Zellen wurden wie im DMNB-Versuch mit DOX und ETO behandelt und zu den gleichen Zeitpunkten nach Mediumwechsel per Comet-Assay untersucht. Da die Zahl der Strangbrüche in unbehandelten Zellen abhängig von der eingesetzten Passage variiert, wurden die Kontrollen für den graphischen Vergleich mit dem in Abschnitt 3.1.2 ermittelten Verlauf auf eins normiert. Der Bezugspunkt wurde hier bewusst anders gewählt als bei den DMNB-Versuchen (-1 h statt 0 h), da der siRNA-vermittelte Knockdown der Proteine vor der Zugabe der Zytostatika erfolgte. Somit kann sich die Zahl der induzierten Strangbrüche im Gegensatz zu den DMNB-Ansätzen von der untransfizierter Zellen unterscheiden.

In der Negativkontrolle mit der nicht-targetierenden Kontroll-siRNA (Abbildung 3.24) ließ sich sowohl nach Inkubation mit 250 nM DOX über 24 Stunden als auch nach 100  $\mu$ M ETO über eine Stunde ein ähnlicher Verlauf der Kurve wie bei untransfizierten Zellen beobachten. Lediglich in den DOX-behandelten Zellen ließ sich in einem Versuch ein verzögertes Entfernen der Strangbrüche beobachten, im anderen eine beschleunigte Reparatur (siehe Standardabweichung nach sechs und neun Stunden). Da das Ausmaß der Expressionshemmung durch siRNA schwankt, ist denkbar, dass die Kontroll-siRNA in diesen beiden Versuchen einen stärkeren bzw. schwächeren Rückgang der Proteine Ku70 oder Rad51 ausgelöst hat wie im vorherigen Abschnitt analysiert (Abschnitt 4.1.3).

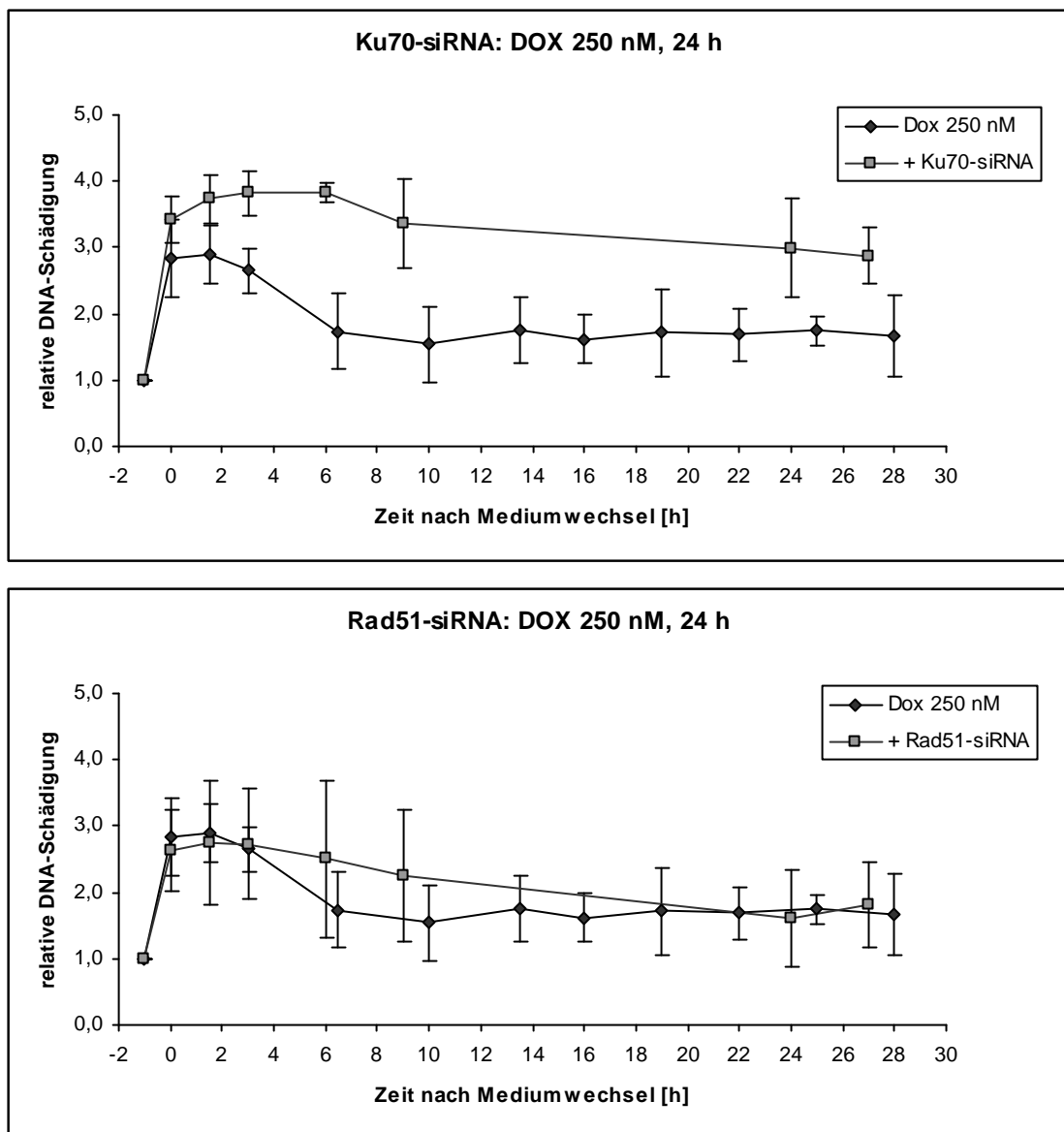
## Ergebnisse



**Abbildung 3.24:** Verlauf der DNA-Schädigung nach Transfektion mit Kontroll-siRNA (Negativkontrolle). Die Schädigung unbehandelter Zellen wurde auf eins normiert und unabhängig von der tatsächlichen Inkubationsdauer zum Zeitpunkt -1 h aufgetragen (n=2).

## Ergebnisse

Änderungen im Reparaturverlauf waren hingegen bei DOX-behandelten Ku70- und Rad51-Knockdown-Zellen zu beobachten. So lag in Ku70-siRNA-transfizierten Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 250 nM DOX bereits eine erhöhte Anzahl an Doppelstrangbrüchen vor, die nach Austausch des Mediums weiter anstieg und nach drei Stunden statistische Signifikanz erreichte (Abbildung 3.25 obere Grafik). Die Zunahme hielt bis sechs Stunden nach Mediumwechsel an. Die Zellen konnten den induzierten Schaden zudem kaum noch entfernen.

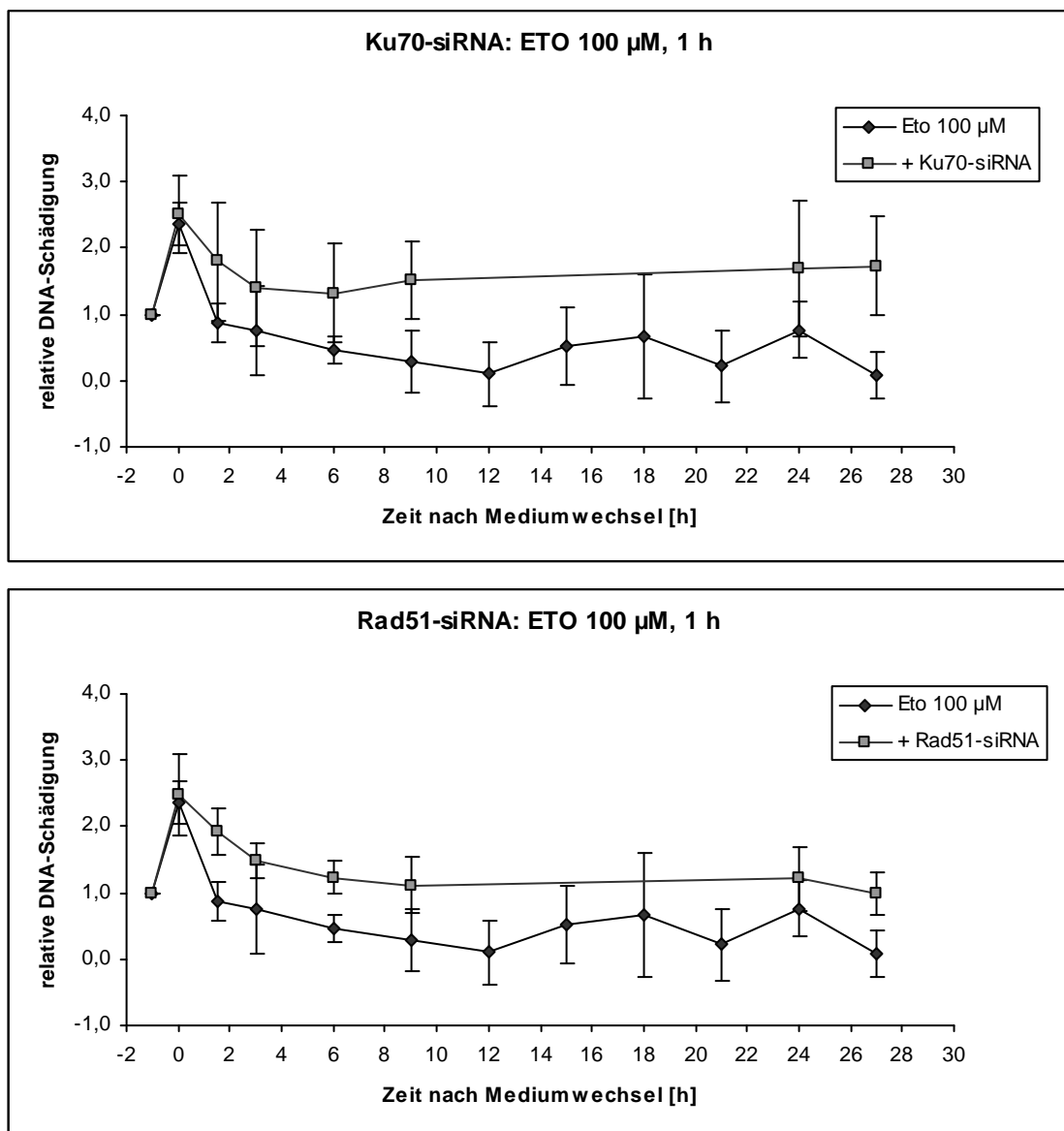


**Abbildung 3.25:** Verlauf der DNA-Schädigung DOX-behandelter HT-29-Zellen nach Transfektion mit Ku70-siRNA (n=2) und Rad51-siRNA (n=3). Die Kontrollwerte wurden auf eins normiert.

## Ergebnisse

Weniger ausgeprägt war die Veränderung nach Ausschalten von Rad51 (Abbildung 3.25 untere Grafik): Zwar kam es zu einer leicht verzögerten Entfernung der DNA-Schädigung, allerdings war diese in den drei Versuchsansätzen unterschiedlich stark ausgeprägt und statistisch nicht signifikant. Zudem befand sich das Ausmaß des Schadens 24 Stunden nach Mediumwechsel auf dem Niveau untransfizierter Zellen.

Ku70- und Rad51-Knockdown-Zellen, die eine Stunde mit 100  $\mu\text{M}$  ETO behandelt wurden, unterschieden sich im Kurvenverlauf dagegen deutlich von untransfizierten Zellen (Abbildung 3.26):



**Abbildung 3.26:** Verlauf der DNA-Schädigung ETO-behandelter HT-29-Zellen nach Transfektion mit Ku70-siRNA (n=3) und Rad51-siRNA (n=4). Die Kontrollwerte wurden auf eins normiert.

Zwar war die Zahl der induzierten Doppelstrangbrüche in beiden Fällen ebenso hoch wie in untransfizierten Zellen, doch wurde der Schaden langsamer entfernt. So lagen in Rad51-siRNA-transfizierten Zellen 1,5, 6 und 27 Stunden nach Austausch des Mediums signifikant mehr Doppelstrangbrüche vor, ebenso wie in Ku70-siRNA-transfizierten Zellen nach 9 und 27 Stunden. Das Ausmaß des DNA-Schadens ging in keinem Fall auf das der untransfizierten Zellen zurück.

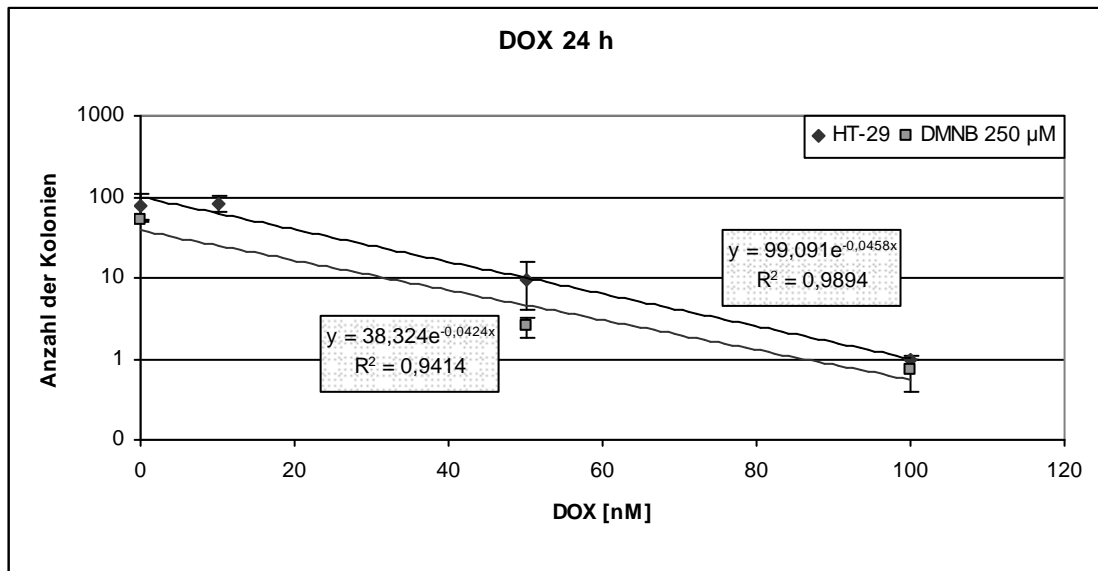
### 3.1.7.2 Beeinflussung des Koloniebildungsvermögens

Im folgenden Abschnitt soll untersucht werden, ob die eben aufgezeigte Hemmung der Reparatur durch Ausschaltung der Proteine DNA-PK<sub>cs</sub>, Ku70 und Rad51 Auswirkungen auf das Koloniebildungsvermögen der HT-29-Zellen hat. Hierzu diente wiederum der Colony Formation Assay.

Für die Versuche mit dem DNA-PK-Inhibitor wurden  $2,5 \times 10^5$  HT-29-Zellen ausplattiert und nach 24 Stunden in einer Konzentrationsreihe über 1 oder 24 h mit DOX und ETO inkubiert. Je 100 der behandelten Zellen wurden wiederum ausplattiert, wobei die DOX-behandelten Zellen für 24 Stunden mit 250  $\mu\text{M}$  DMNB und die ETO-behandelten Zellen mit 500  $\mu\text{M}$  DMNB versetzt wurden. Gleiches geschah mit unbehandelten Kontrollzellen. Nach 14 Tagen wurden die gebildeten Kolonien angefärbt und ausgezählt. Die Koloniezahl wurde graphisch gegen die Konzentration aufgetragen und die Regressionsgerade bestimmt. Aus ihr wurde die  $\text{EC}_{50}$ , also die Konzentration, bei der die Koloniezahl auf die Hälfte zurückgeht, berechnet. Der Vergleich erfolgte zwischen HT-29-Zellen mit und ohne Zusatz von DMNB.

Die Abbildungen 3.27 und 3.28 zeigen, dass der Zusatz von 250  $\mu\text{M}$  (DOX) oder 500  $\mu\text{M}$  (ETO) DMNB in den ersten 24 Stunden des zytostatikafreien Intervalls keine Veränderung der  $\text{EC}_{50}$  bewirkte. Zwar kam es insgesamt zu einer Reduktion der Koloniezahl, doch war diese bei der Kontrolle ebenso ausgeprägt wie bei behandelten Zellen. Sie ist auf die allgemeine Toxizität der Substanz zurückzuführen <sup>[119]</sup>.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.27:** Koloniezahl in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Zellen wurden zuvor 24 h mit DOX behandelt und anschließend 24 h mit 250 µM DMNB versetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei (HT-29) bzw. zwei (DMNB) Versuchen, die jeweils Doppelbestimmungen beinhalten.

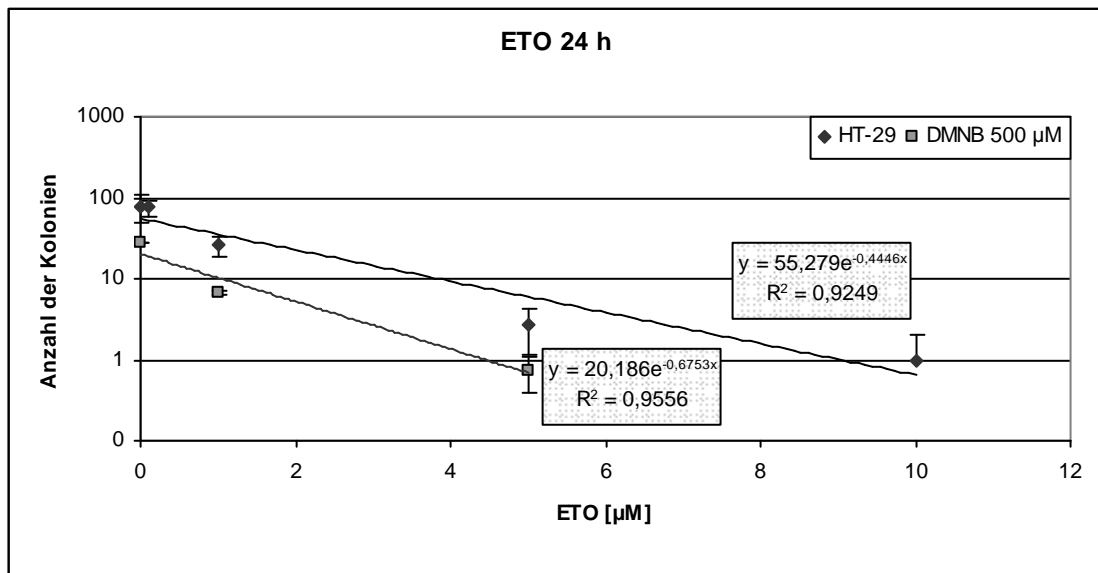
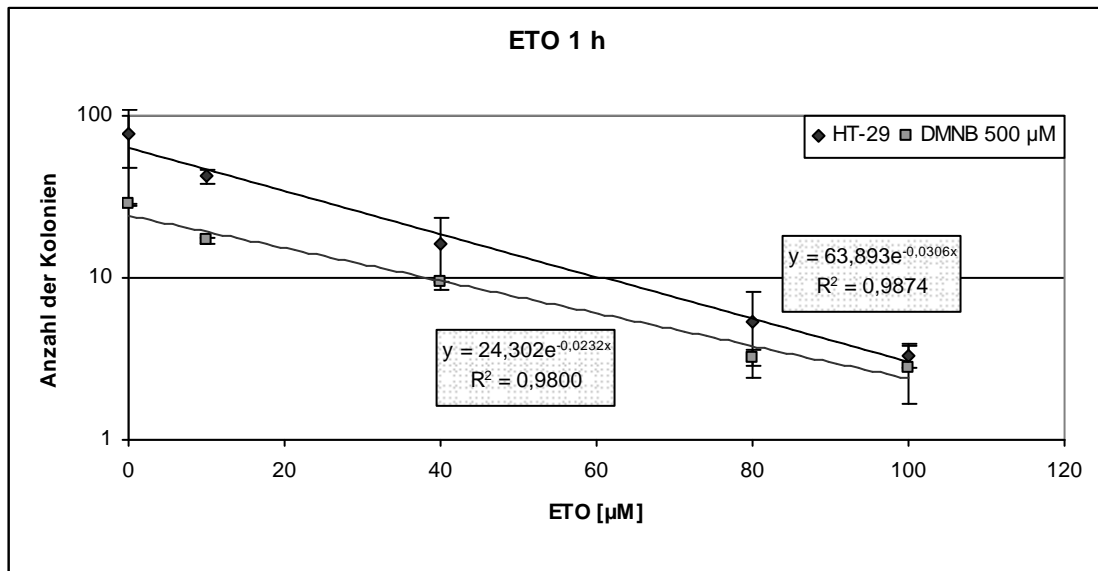
Die  $EC_{50}$ -Werte der Bestimmungen sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst. Man sieht, dass es lediglich nach 24-stündiger Inkubation mit ETO zu einer Erniedrigung des  $EC_{50}$ -Wertes um 37,5 % kam. Nach einstündiger ETO-Behandlung sowie bei DOX-behandelten Zellen ist der Wert dagegen um 22,3 bzw. 7,9 % erhöht.

	<i>DOX 24 h [nM]</i>	<i>ETO 1 h [µM]</i>	<i>ETO 24 h [µM]</i>
HT-29	15,1	22,7	1,6
HT-29 + DMNB	16,3	29,2	1,0

**Tabelle 3.4:**  $EC_{50}$ -Werte im Colony Formation Assay, mit und ohne Zusatz von DMNB



## Ergebnisse

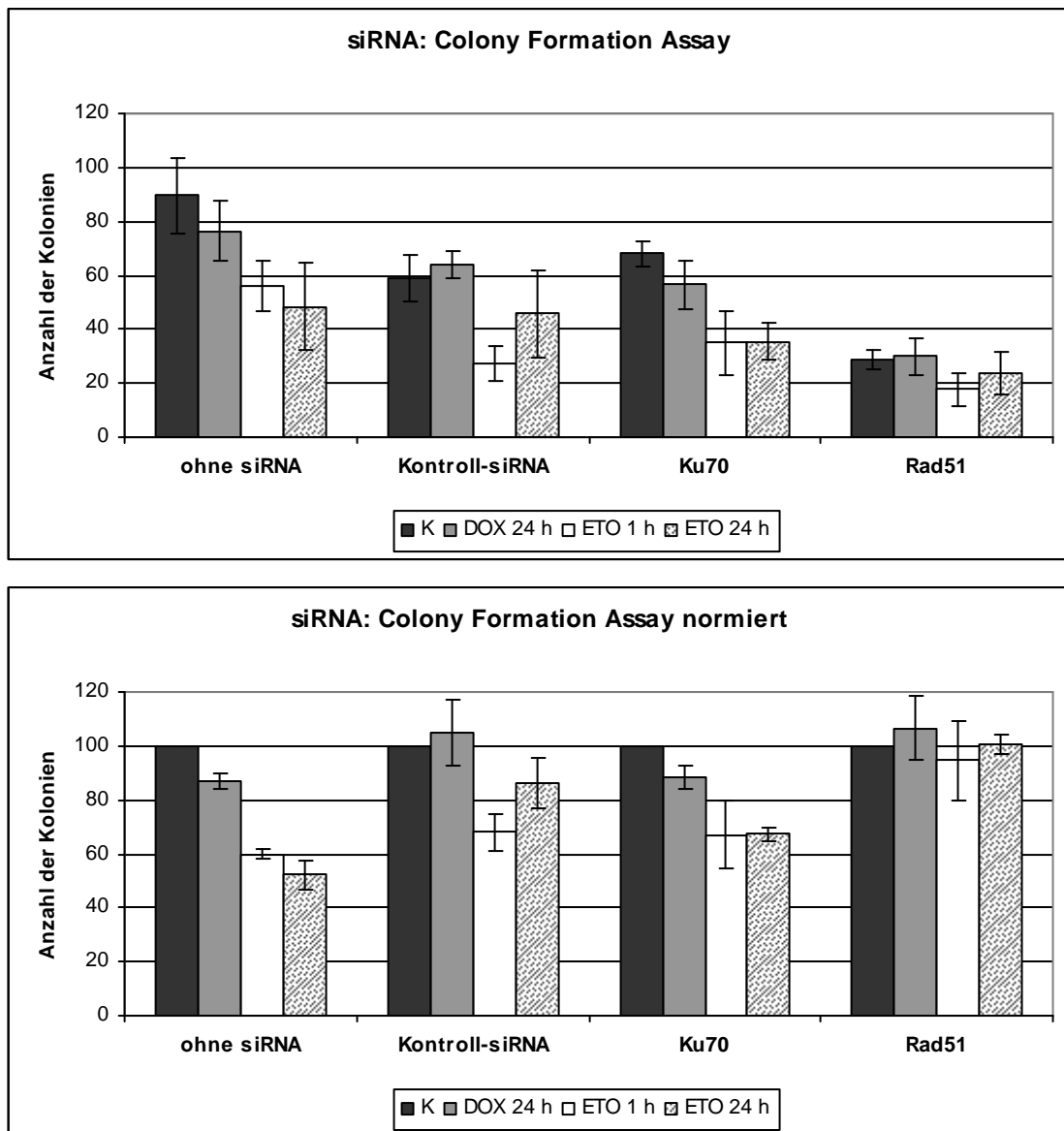


**Abbildung 3.28:** Koloniezahl in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Zellen wurden zuvor 1 (obere Grafik) oder 24 h (untere Grafik) mit ETO behandelt und anschließend 24 h mit 500 µM DMNB versetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei (HT-29) bzw. zwei (DMNB) Versuchen, die jeweils Doppelbestimmungen beinhalten.

Zur Untersuchung der siRNA-transfizierten Zellen wurden diese mit 10 nM DOX für 24 h, 15 µM ETO für 1 h oder 1 µM ETO für 24 h behandelt. Diese Konzentrationen und Zeiten entsprechen einer Reduktion der Koloniezahl um ein Drittel, entnommen aus der Steigung der in Abbildung 3.27 und 3.28 erstellten Regressionsgeraden. Der Einsatz dieser Bedingungen stellt sicher, dass sowohl eine Erhöhung als auch Erniedrigung der Koloniezahl detektiert werden kann. Abbildung 3.29 gibt in der oberen

## Ergebnisse

Grafik die Ergebnisse von untransfizierten Zellen sowie nach Transfektion von Kontroll-, Ku70- und Rad51-siRNA wieder. Die über 24 Stunden mit DOX und ETO behandelten Zellen bildeten dabei nach Kontroll-siRNA-Transfektion ähnlich viele Kolonien wie untransfizierte Zellen. Unbehandelte Kontrollzellen bildeten hingegen weniger Kolonien, ebenso die Zellen nach einstündiger ETO-Behandlung. Ein ähnliches Bild erhielt man bei Ku70-Knockdown-Zellen.

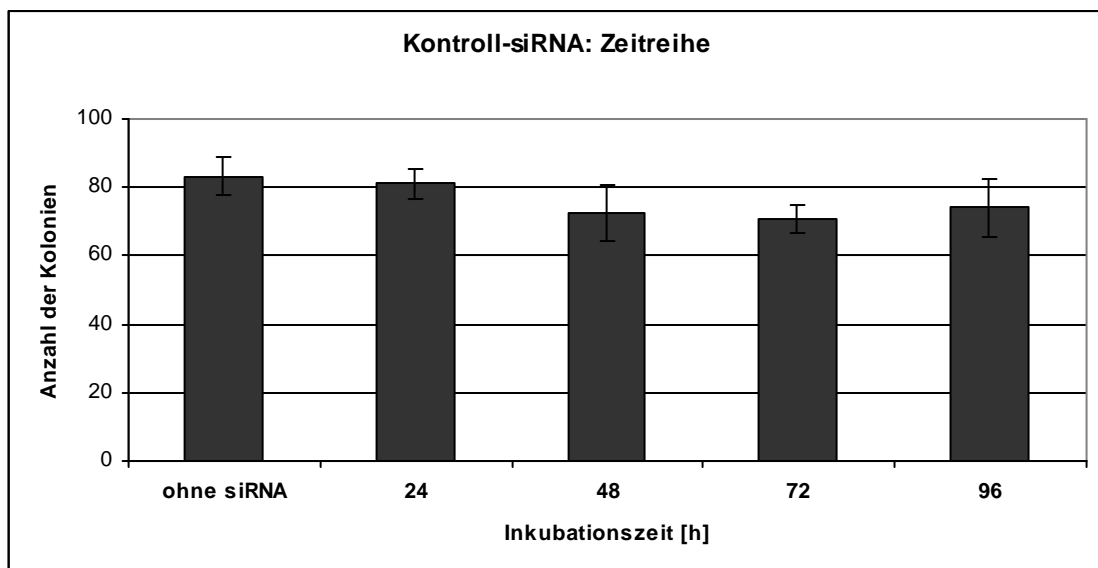


**Abbildung 3.29:** Koloniebildung siRNA-transfizierter Zellen nach Behandlung mit Topo II $\alpha$ -Inhibitoren. Die obere Grafik zeigt die Zahl der aus 100 Zellen gebildeten Kolonien im Vergleich mit unbehandelten Zellen (K), die untere Grafik die Zahl nach Normierung von K auf 100 Kolonien. Abgebildet sind die Mittelwerte aus drei Versuchen, die jeweils Doppelbestimmungen beinhalten.

## Ergebnisse

Nach siRNA-vermittelter Rad51-Ausschaltung kam es dagegen zu einer Veränderung. In allen Versuchen wuchsen hier statistisch signifikant weniger Kolonien je Ansatz, auch bei unbehandelten Zellen. Normiert man die Koloniezahl der unbehandelten Zellen in allen Ansätzen auf 100, so fällt zudem auf, dass der zytostatische Effekt von DOX und ETO durch die Rad51-Ausschaltung verloren gegangen ist (Abbildung 3.29 untere Grafik). Auch nach Transfektion von Kontroll- und Ku70-siRNA war die Zytotoxizität vermindert. Signifikant war dieser Effekt allerdings nur nach 24-stündiger ETO-Behandlung.

Wie Abbildung 3.30 zeigt kann der Rückgang der Koloniezahl nach der 72-stündigen Rad51-Transfektion nicht auf unspezifische Toxizität durch das Transfektionsreagenz oder die siRNA zurückgeführt werden. Denn nach Transfektion von Kontroll-siRNA über 24, 48, 72 oder 96 Stunden ließ sich zwar eine leichte Abnahme der Koloniezahl beobachten. Diese betrug nach 72 h jedoch nur 12 Kolonien, während mit Rad51-siRNA ein Rückgang um 61 Kolonien zu verzeichnen war. Allerdings fiel die Reduktion der Koloniezahl in der Zeitreihe grundsätzlich geringer aus als in Abbildung 3.29 beobachtet. So waren auch bei der Negativkontrolle und Ku70-siRNA 20 bzw. 11 Kolonien mehr gewachsen. Dieser Unterschied war im Gegensatz zu Rad51-siRNA jedoch nicht signifikant.



**Abbildung 3.30:** Koloniebildung nach Inkubation mit Kontroll-siRNA als Zeitreihe über 96 Stunden. Die Grafik zeigt die Mittelwerte aus drei Versuchen, die jeweils Doppelbestimmungen beinhalten.

### 3.1.8 Ergebnisüberblick

Nach Untersuchung der HT-29-Zellen können folgende Ergebnisse festgehalten werden:

- DOX und ETO induzierten in den getesteten Konzentrationen DNA-Doppelstrangbrüche. Der Unterschied in der Höhe des DNA-Schadens war nach Behandlung mit 10 und 100  $\mu\text{M}$  ETO nicht statistisch signifikant.
- Die Strangbrüche wurden außer nach 24-stündiger Behandlung mit 750 nM DOX repariert. Die durch ETO induzierten Doppelstrangbrüche wurden dabei schneller entfernt, als die durch DOX induzierten.
- Der intrazelluläre DOX-Gehalt verlief linear zur Konzentration im Medium. Nach Entfernung des zytostatikahaltigen Mediums war ein exponentieller Rückgang zu beobachten.
- Der durch DOX und ETO ausgelöste Zelltod erfolgte nicht in den ersten sechs Stunden nach Ende der Behandlung.
- Außer nach einstündiger Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  ETO fand quasi kein Koloniewachstum statt. Desweiteren traten bei dieser Behandlung nach acht Tagen nur halb so viele tote Zellen auf wie nach allen anderen getesteten Bedingungen.
- Außer nach einstündiger Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  ETO kam es zu einer Blockade des Zellzyklus in der G2/M-Phase. Von dort gingen die Zellen direkt in den Zelltod über.
- DOX und ETO induzierten die Expression von Rad51.
- Die Ausschaltung von Ku70 und die Hemmung von DNA-PKcs verzögerte die Reparatur der durch DOX induzierten Strangbrüche, der Knockdown von Rad51 dagegen nicht.
- Die Ausschaltung von Ku70 und Rad51 verzögerte die Reparatur der durch ETO induzierten Strangbrüche. Die Hemmung von DNA-PKcs hatte dagegen keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Reparatur.
- Der Knockdown von Rad51 reduzierte die Zahl der über 14 Tage gebildeten Kolonien. Die Ausschaltung von Ku70 beeinflusste die Koloniezahl hingegen kaum.

### 3.2 Untersuchungen mit Patientenzellen

Der erste Teil der Arbeit lieferte Erkenntnisse über die Reaktion von HT-29-Zellen auf die Behandlung mit Topo II $\alpha$ -Inhibitoren. Zudem wurde untersucht, welche Proteine an der Reparatur der induzierten DNA-Doppelstrangbrüche beteiligt sind und welche Folgen das Ausschalten dieser Proteine für das Überleben der Zellen hat. Im zweiten Teil der Arbeit erfolgt nun die Überprüfung der klinischen Relevanz der Ergebnisse durch Vergleich der HT-29-Zelllinie mit Patientenzellen. Hierbei soll untersucht werden, ob die den Patienten entnommenen primären Zellen gegenüber dem Zelllinienmodell einen Unterschied in Reparaturverlauf, Proteinexpression und/oder Sensitivität aufweisen.

Die Patientenzellen stammen von zwei Kolonkarzinom-Patienten mit malignen Ergüssen (Ascites). Die Ascitesflüssigkeit wurde punktiert und die darin befindlichen Zellen in Kultur genommen (Abschnitt 7.2.2 und 7.2.3). Die Patientenzellen sind also nicht dem Primärtumor entnommene, sondern gestreute Zellen.

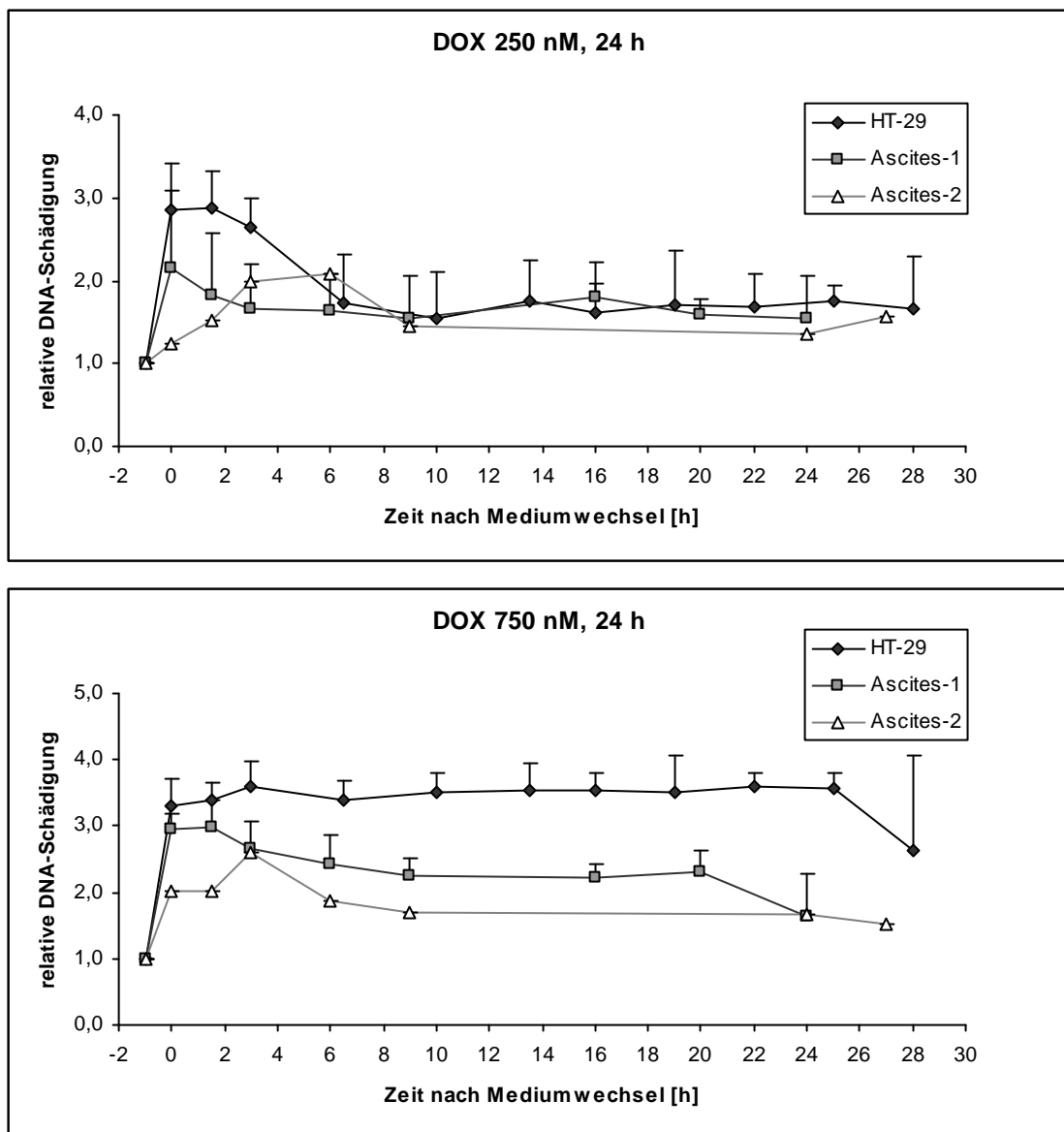
#### 3.2.1 DNA-Schädigung durch Topo II $\alpha$ -Inhibitoren

Zunächst sollte untersucht werden, ob die an den HT-29-Zellen getesteten DOX- und ETO-Konzentrationen in Asciteszellen im gleichen Maße DNA-Doppelstrangbrüche induzieren und ob und ggf. wie schnell die Zellen diese entfernen. Die Behandlung erfolgte mit 100  $\mu$ M ETO für eine Stunde sowie 250 und 750 nM DOX für 24 Stunden. Die Zellen der beiden Ascites-Linien wurden dazu wie in Abschnitt 7.4.1 beschrieben ausplattiert und behandelt. Nach Ende der Inkubation wurde das Medium gewechselt und die Zellen zu insgesamt acht verschiedenen Zeitpunkten mittels Comet-Assay untersucht. Die ermittelten Schädigungen wurden graphisch gegen die Zeit nach Mediumwechsel aufgetragen und mit der im ersten Teil ermittelten HT-29-Kurve verglichen. Zum besseren Vergleich wurden die Kurven auf einen Kontrollwert von eins normiert.

Wie Abbildung 3.31 zu entnehmen ist, induzierte DOX in den beiden Ascites-Linien weniger Doppelstrangbrüche als in HT-29-Zellen. Die Zellen der Ascites-1-Linie vermochten den Schaden zudem schneller zu entfernen, was besonders nach Behandlung mit 750 nM DOX gut zu erkennen ist.

## Ergebnisse

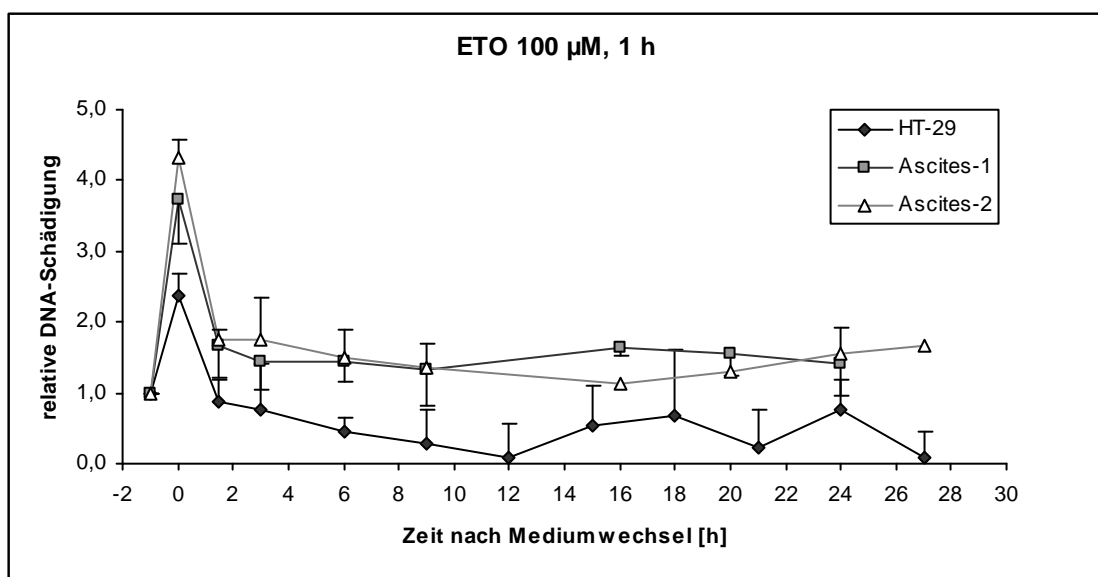
Wurden Ascites-2-Zellen mit DOX behandelt, zeigte sich ein ganz anderer zeitlicher Verlauf der Schädigung. So war der Schaden zum Zeitpunkt 0 h deutlich geringer als bei den anderen beiden Linien und lag bei 250 nM DOX kaum über der Kontrolle. Erst in den nächsten drei bis sechs Stunden kam es zu einer stärkeren Schädigung der DNA, die nach Erreichen des Maximums jedoch schnell wieder verschwand. Aufgrund mangelnden Patientenmaterials konnten die Versuche mit den Ascites-2-Zellen nicht wiederholt werden.



**Abbildung 3.31:** Verlauf der DNA-Schädigung DOX-behandelter HT-29- und Asciteszellen. Die Kurven wurden auf einen Kontrollwert von eins normiert, der zum Zeitpunkt -1 h aufgetragen wurde. Die Standardabweichung wurde aus Gründen der Übersicht in nur einer Richtung aufgetragen. Sie ist symmetrisch um den Mittelwert verteilt.

## Ergebnisse

Behandelte man die drei Zelllinien eine Stunde mit 100  $\mu\text{M}$  ETO, so zeigte der Verlauf der Schädigung keine gravierenden Unterschiede (Abbildung 3.32). Zwar war der induzierte Schaden in den Asciteszellen höher als in den HT-29-Zellen, doch war der Verlauf gleich: Binnen 1,5 Stunden wurde der Großteil der Doppelstrangbrüche entfernt, danach blieb der Schaden in etwa konstant. Dieser Level lag bei den Asciteszellen ca. 100 Einheiten (AU) über dem der HT-29-Zellen. Vergleicht man jedoch die Höhe des Initialschadens mit dem später erreichten Level, so scheint die Entfernung der Strangbrüche in den Asciteszellen etwas effektiver zu sein als in den HT-29-Zellen.



**Abbildung 3.32:** Verlauf der DNA-Schädigung ETO-behandelter HT-29- und Asciteszellen. Die Kurven wurden auf einen Kontrollwert von eins normiert. Die Standardabweichung wurde aus Gründen der Übersicht in nur einer Richtung aufgetragen. Sie ist symmetrisch um den Mittelwert verteilt.

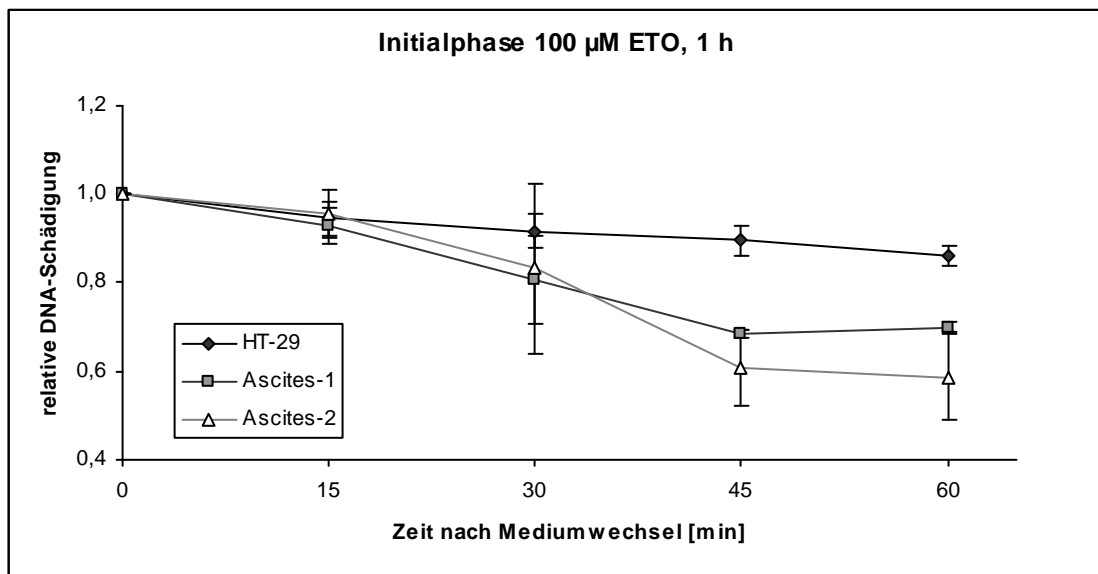
Die Entfernung der durch ETO induzierten Doppelstrangbrüche scheint also in allen drei Zelllinien gleich schnell abzulaufen. Blaise et al. <sup>[122]</sup> konnten an UV-bestrahlten B-CLL-Zellen jedoch zeigen, dass die größten Unterschiede im Reparaturverhalten während der ersten 60 Minuten auftraten.

Um diesen Zeitraum detailliert zu erfassen, folgte am Beispiel von 100  $\mu\text{M}$  ETO 1 h eine erneute Untersuchung der initialen Reparaturphase aller drei Zelllinien. In einer 24 well-Platte wurden dazu je  $1,5 \times 10^4$  Zellen in

## Ergebnisse

500  $\mu$ l Medium ausplattiert und nach 24 Stunden eine Stunde lang mit 100  $\mu$ M ETO versetzt. Am Ende der Inkubation wurde das Medium durch zytostatikafreies Medium ersetzt und die Ansätze nach 0, 15, 30, 45 und 60 min per Comet-Assay analysiert.

Die Untersuchung der Initialphase zeigte, dass es durchaus Unterschiede zwischen HT-29- und Asciteszellen gibt (Abbildung 3.33). Während in HT-29-Zellen die induzierten Doppelstrangbrüche in den ersten 60 Minuten nur um 14 % reduziert wurden, gab es bei den Ascites-Linien nach 30 bis 45 Minuten einen starken Abfall. Die DNA-Schädigung sank hier innerhalb einer halben Stunde von 93 auf 69 % (Ascites-1) bzw. von 96 auf 61 % (Ascites-2) und liegt damit 45 Minuten nach Mediumwechsel signifikant unter der der HT-29-Zellen (90 %). Die Asciteszellen entfernen den induzierten Schaden in den ersten 60 Minuten also schneller als die HT-29-Zellen.



**Abbildung 3.33:** Initiale Phase der DNA-Reparatur am Beispiel von ETO-behandelten HT-29- und Asciteszellen (n=2).



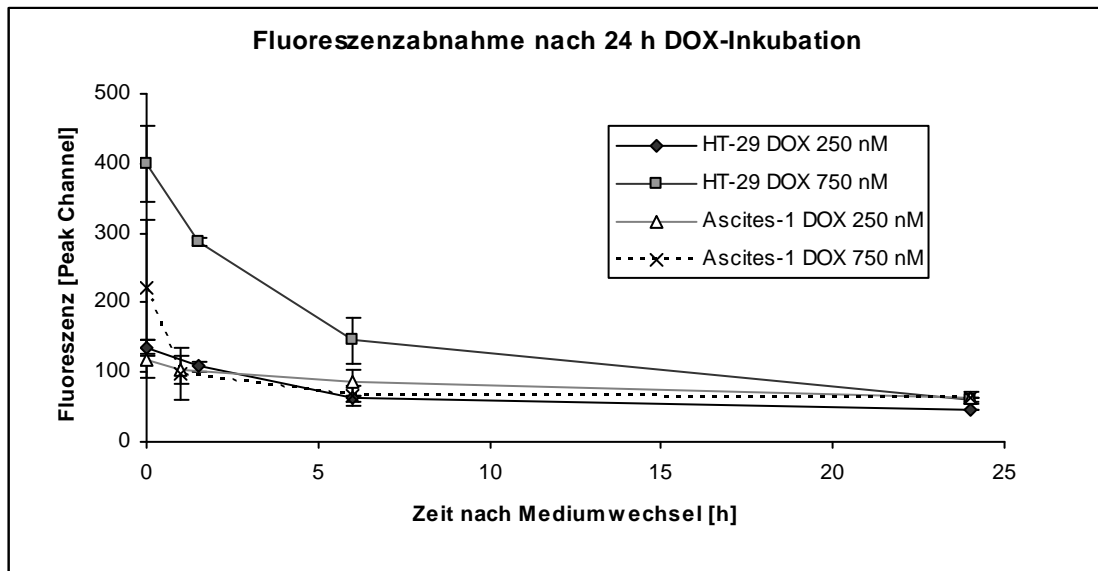
### 3.2.2 Bestimmung des zellulären Doxorubicingehalts von Ascites-1-Zellen

Abbildung 3.31 lässt erkennen, dass der durch DOX induzierte DNA-Schaden in den Ascites-Zellen erheblich geringer ausfällt, als bei der Linie HT-29 zu beobachten war. Als Grund dafür wäre eine niedrigere intrazelluläre DOX-Konzentration denkbar, bedingt beispielsweise durch eine geringere Aufnahme oder einen gesteigerten Efflux des Zytostatikums. Aus diesem Grund wurde analog Abschnitt 3.1.3 der intrazelluläre DOX-Gehalt der Ascites-1-Zellen bestimmt. Abbildung 3.34 gibt die Ergebnisse der Messung im Vergleich mit HT-29 wieder.

Die Grafik zeigt, dass die intrazelluläre Menge an DOX in den Ascites-1-Zellen unterhalb der der HT-29-Zellen lag. Während dieser Unterschied nach 24-stündiger Inkubation mit 250 nM DOX gering und statistisch nicht signifikant war, betrug die Fluoreszenz nach 750 nM DOX nur die Hälfte. Wurde das Medium am Ende der Inkubation durch zytostatikafreies Medium ersetzt und die Fluoreszenz nach 1, 6 sowie 24 Stunden erneut gemessen, zeigte sich auch bei den Ascites-1-Zellen eine exponentielle Abnahme der Intensität. Der intrazelluläre Gehalt der mit 750 nM DOX behandelten Zellen sank dabei bereits nach einer Stunde auf das Niveau der mit 250 nM inkubierten Ascites-1, welches dem bei HT-29 gemessenen Wert entsprach. Nach 24 Stunden zytostatikafreiem Intervall befand sich die Fluoreszenz aller Ansätze auf gleicher Höhe.

Obwohl die Untersuchung auch für die Ascites-2-Linie interessant gewesen wäre, konnte sie aufgrund der langen Generationszeit dieser Zellen nicht durchgeführt werden.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.34:** Vergleich der intrazellulären DOX-Konzentration von HT-29- und Ascites-1-Zellen, gemessen anhand der Eigenfluoreszenz (n=3).

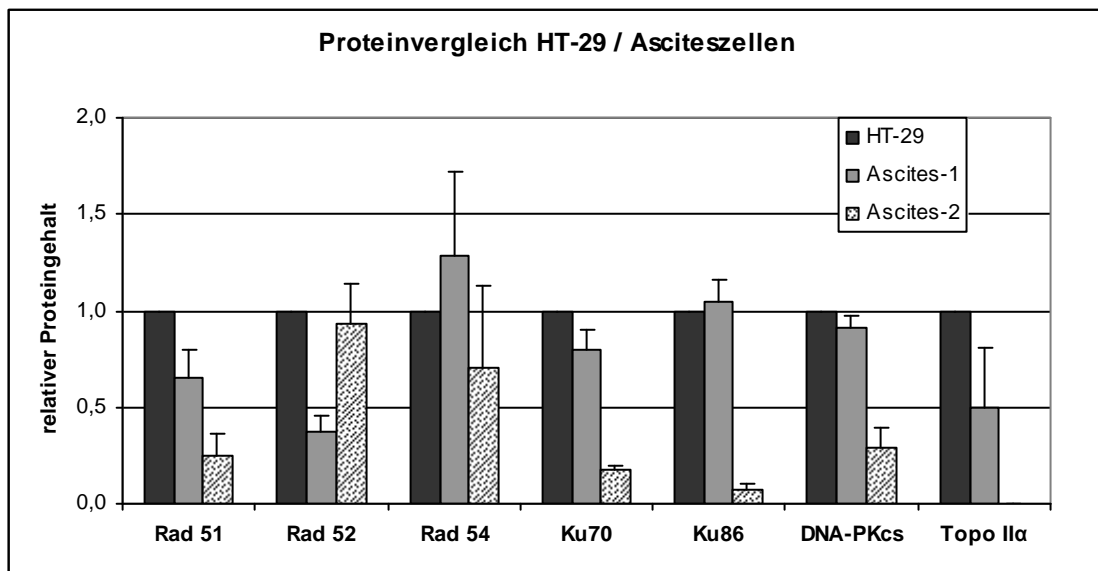
### 3.2.3 Analyse der DNA-Reparaturproteine im Vergleich mit HT-29-Zellen

Die in Abschnitt 3.2.1 beobachteten Unterschiede im Schadensverlauf der drei Zelllinien könnten auf einem unterschiedlichen Gehalt der beteiligten DNA-Reparaturproteine beruhen. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden je Zelllinie  $5 \times 10^5$  Zellen ausplattiert und fünf Tage bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend wurden die Proteine wie beschrieben isoliert und mittels Western Blot detektiert. Als interne Kontrolle diente wiederum die Bandenstärke des Coomassie-gefärbten Proteingels.

Zusätzlich zu den bereits bekannten NHEJ- und HR-Proteinen wurde das Protein Topo II $\alpha$  quantifiziert, da die Möglichkeit besteht, dass der Unterschied in der Höhe des DOX-induzierten DNA-Schadens auf unterschiedlichen Topo II $\alpha$ -Gehalten in den verschiedenen Zellen beruhen könnte. Die Quantifizierung von Topo II $\alpha$  erfolgte nach gezielter Isolierung der Kernproteine gemäß Abschnitt 7.5.1.2 und Trennung auf einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamid-Gel.

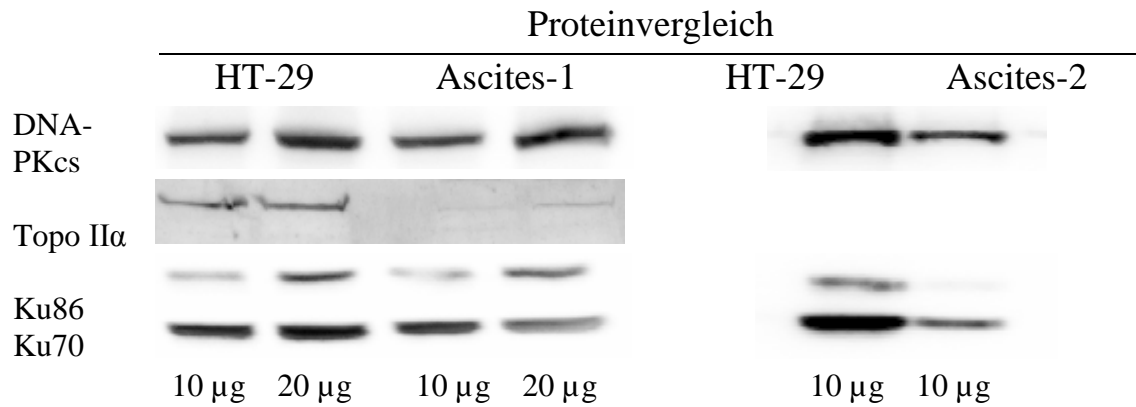
## Ergebnisse

Der Vergleich der drei Zelllinien zeigte deutliche Unterschiede im Gehalt der HR-Proteine (Abbildungen 3.35 - 3.37). So wiesen beide Ascites-Linien signifikant weniger Rad51- und Ku70-Proteine auf. Die Ascites-1-Zellen waren zudem durch eine Reduktion von Rad52 gekennzeichnet. Ascites-2-Zellen zeigten hingegen einen signifikant niedrigeren Gehalt aller untersuchten NHEJ-Proteine, der bei Ascites-1 nicht zu beobachten war. Die Quantifizierung von Topo II $\alpha$  zeigte im Vergleich mit HT-29-Zellen wiederum einen erniedrigten Level bei den Ascites-1-Zellen. Der Topo II $\alpha$ -Gehalt der Ascites-2-Zellen ließ sich nicht quantifizieren, da für die Kernproteinisolierung sehr hohe Zellzahlen nötig sind, die aufgrund der langsamen Proliferation nicht erreicht wurden.

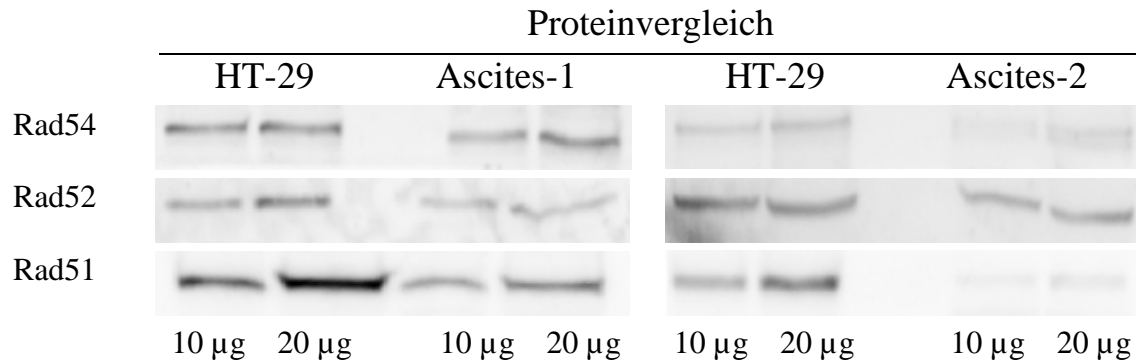


**Abbildung 3.35:** Bestimmung des Gehalts von DNA-Reparaturproteinen und Topo II $\alpha$ : Vergleich unbehandelter HT-29- und Asciteszellen. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei Versuchen. Topo II $\alpha$  konnte aufgrund geringer Proteinausbeute nicht quantifiziert werden.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.36:** Vergleich unbehandelter HT-29- und Asciteszellen im Western Blot: Untersuchung von NHEJ-Proteinen und Topo II $\alpha$ . Die Proteinbanden lagen auf der Höhe von 420 (DNA-PK<sub>cs</sub>), 170 (Topo II $\alpha$ ), 86 (Ku86) und 70 kDa (Ku70).



**Abbildung 3.37:** Vergleich unbehandelter HT-29- und Asciteszellen im Western Blot: Untersuchung von HR-Proteinen. Die Proteingröße betrug 84 (Rad54), 46 (Rad52) und 37 kDa (Rad51).

### 3.2.4 Untersuchungen zur Zytotoxizität

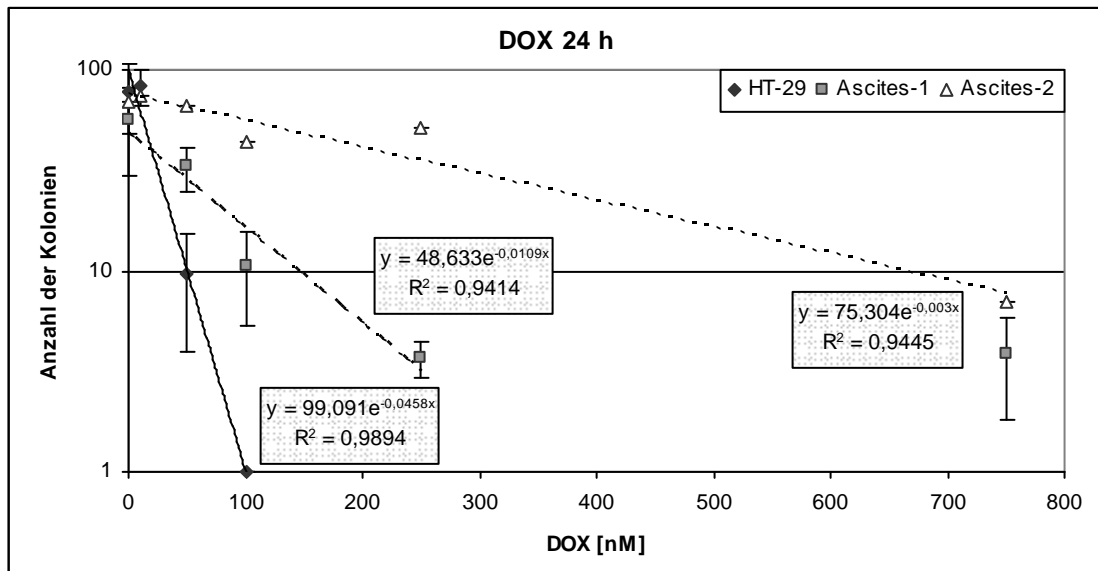
Abschließend gilt der Blick nochmals der zytotoxischen Wirkung von Topo II $\alpha$ -Inhibitoren. So soll erneut die Kolonieformation bei HT-29-Zellen untersucht und mit dem Koloniebildungsvermögen der Asciteszellen in Vergleich gestellt werden. Zudem wird die Art des Zelltods der Ascites-1-Zellen mittels FACS charakterisiert.

#### 3.2.4.1 Vergleich des Koloniebildungsvermögens

Um eine Aussage über die Sensitivität der Asciteszellen gegenüber DOX und ETO machen zu können, wurden alle drei Zelllinien in einer Konzentrationsreihe über 1 bzw. 24 h mit diesen Substanzen behandelt und anschließend per Colony Formation Assay untersucht (Abschnitt 7.7.1). Die Koloniezahl wurde graphisch gegen die Konzentration aufgetragen und die Regressionsgerade bestimmt. Aus ihr wurde die EC<sub>50</sub>, also die Konzentration, bei der die Koloniezahl auf die Hälfte zurückgeht, berechnet.

Abbildung 3.38 gibt die Koloniebildung nach 24-stündiger DOX-Behandlung wieder. Die Grafik zeigt einen deutlichen Unterschied in der Sensitivität der drei Linien gegenüber DOX. Während HT-29-Zellen auf eine Erhöhung der DOX-Konzentration mit einer raschen Abnahme der Koloniezahl reagierten (EC<sub>50</sub> = 15,1 nM) und bei 250 und 750 nM keine Kolonien mehr bildeten, zeigten sich die Asciteszellen weniger sensitiv. Hier ließen sich selbst bei 750 nM DOX noch vier (Ascites-1) bzw. sieben Kolonien (Ascites-2) registrieren. Die konzentrationsabhängige Abnahme der Koloniezahl verlief bei den Ascites-1-Zellen nur bis 250 nM linear, daher wurde der 750 nM-Wert nicht zur Erstellung der Regressionsgeraden heran gezogen. Entsprechend lag die EC<sub>50</sub> bei Ascites-1-Zellen bei 63,6 nM, bei Ascites-2 sogar bei 231,0 nM. Auffällig ist außerdem, dass es nach Behandlung mit 10 nM DOX verglichen mit der Kontrolle zu einer leichten Steigerung der Koloniezahl kam. Dies ist interessant, da es im alamar Blue™-Assay bei geringen DOX-Konzentrationen zu einer Steigerung des Umsatzes gekommen war (Abschnitt 3.1.5.3).

## Ergebnisse



**Abbildung 3.38:** Zahl der gebildeten Kolonien in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Zellen wurden zuvor über 24 h mit DOX behandelt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen, die jeweils Doppelbestimmungen beinhalten. Die Versuche mit den Ascites-2-Zellen konnten aufgrund mangelnden Patientenmaterials nicht wiederholt werden.

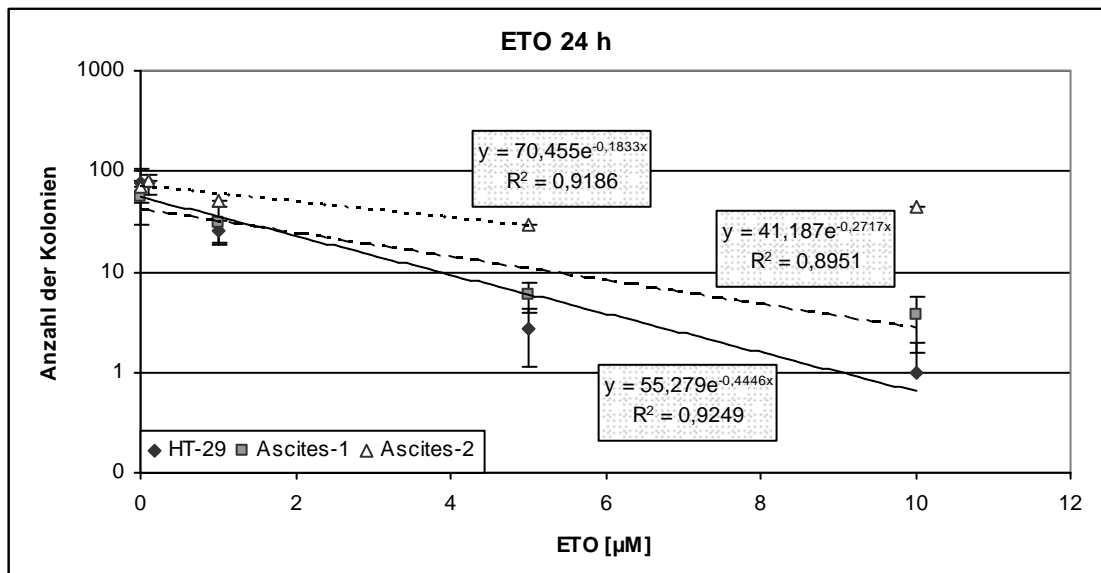
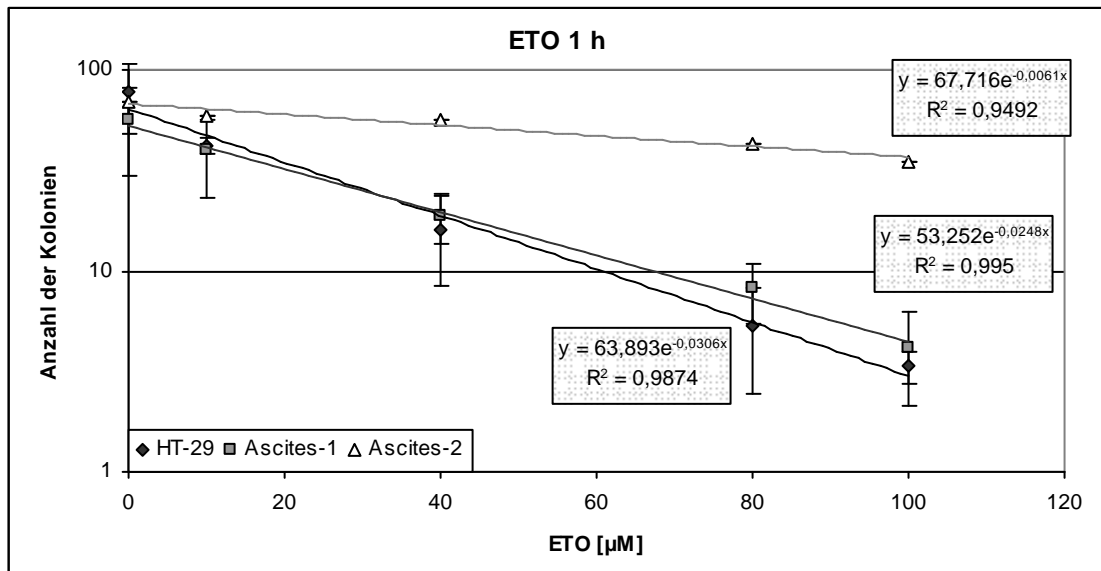
Das Koloniebildungsvermögen in ETO-behandelten Ascites-Zellen unterscheidet sich nicht so stark von dem der HT-29-Linie (Abbildung 3.39). Zwar erwiesen sich die Ascites-2-Zellen auch hier als am wenigsten sensitiv. Allerdings waren die HT-29- und Ascites-1-Zellen etwa gleich empfindlich. So betrug der  $EC_{50}$ -Wert nach einstündiger ETO-Behandlung für HT-29-Zellen  $22,7 \mu\text{M}$ , für Ascites-1-Zellen  $27,9 \mu\text{M}$  und für Ascites-2  $113,6 \mu\text{M}$ . Nach 24-stündiger Behandlung betragen die  $EC_{50}$ -Werte  $1,6 \mu\text{M}$  für HT-29-Zellen,  $2,6 \mu\text{M}$  für Ascites-1- und  $3,8 \mu\text{M}$  für Ascites-2-Zellen.

In Tabelle 3.5 werden die  $EC_{50}$ -Werte der drei Zelllinien nochmals zusammengefasst.

	<i>DOX 24 h [nM]</i>	<i>ETO 1 h [<math>\mu\text{M}</math>]</i>	<i>ETO 24 h [<math>\mu\text{M}</math>]</i>
HT-29	15,1	22,7	1,6
Ascites-1	63,6	27,9	2,6
Ascites-2	231,0	113,6	3,8

**Tabelle 3.5:**  $EC_{50}$ -Werte im Colony Formation Assay

## Ergebnisse



**Abbildung 3.39:** Zahl der gebildeten Kolonien in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Zellen wurden zuvor über 1 h (obere Grafik) bzw. 24 h (untere Grafik) mit ETO behandelt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus drei Versuchen, die jeweils Doppelbestimmungen beinhalten. Die Versuche mit den Ascites-2-Zellen konnten aufgrund mangelnden Patientenmaterials nicht wiederholt werden.

### 3.2.4.2 Charakterisierung des Zelltods anhand von Membranveränderungen am Beispiel der Zelllinie Ascites-1

In Abschnitt 3.1.5.3 wurde der Zelltod DOX- und ETO-behandelter HT-29-Zellen durchflusszytometrisch nach Markierung mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid charakterisiert. In diesem Abschnitt erfolgt nun die entsprechende Untersuchung mit Ascites-1-Zellen.  $1 \times 10^5$  Zellen wurden dazu ausplattiert, nach 24 Stunden gemäß Tabelle 3.1 behandelt und geerntet. Je Ansatz wurden 30.000 Zellen am FACS gemessen. Da die Eigenfluoreszenz von DOX eine ähnliche Wellenlänge wie die Fluoreszenz des Propidiumiodids aufweist, ist bei DOX-behandelten Zellen eine Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose nicht möglich.

Zudem ist bei den Ascites-1-Zellen eine höhere Grundschädigung der unbehandelten Kontrolle zu erwarten, da es sich im Gegensatz zur HT-29-Linie um primäres Zellmaterial handelt.

Wie in Abbildung 3.40 (obere Grafik) zu erkennen, unterscheidet sich bei den Ascites-1-Zellen die Menge apoptotischer und nekrotischer Zellen nach Behandlung mit 250 und 750 nM DOX deutlich. Dieser Unterschied war bei HT-29-Zellen nicht zu beobachten (Abbildung 3.7). Während der Anteil toter Zellen nach Behandlung mit 250 nM DOX in den ersten sechs Stunden nach Austausch des Mediums im Bereich der Kontrolle (10,2 %) lag, wiesen bei Behandlung mit 750 nM DOX zu diesem Zeitpunkt bereits 19,6 bis 36,8 % der Zellen entsprechende Membranschädigungen auf. Bei den HT-29-Zellen bewegte sich der Anteil zwischen 17,5 und 22,2 %.

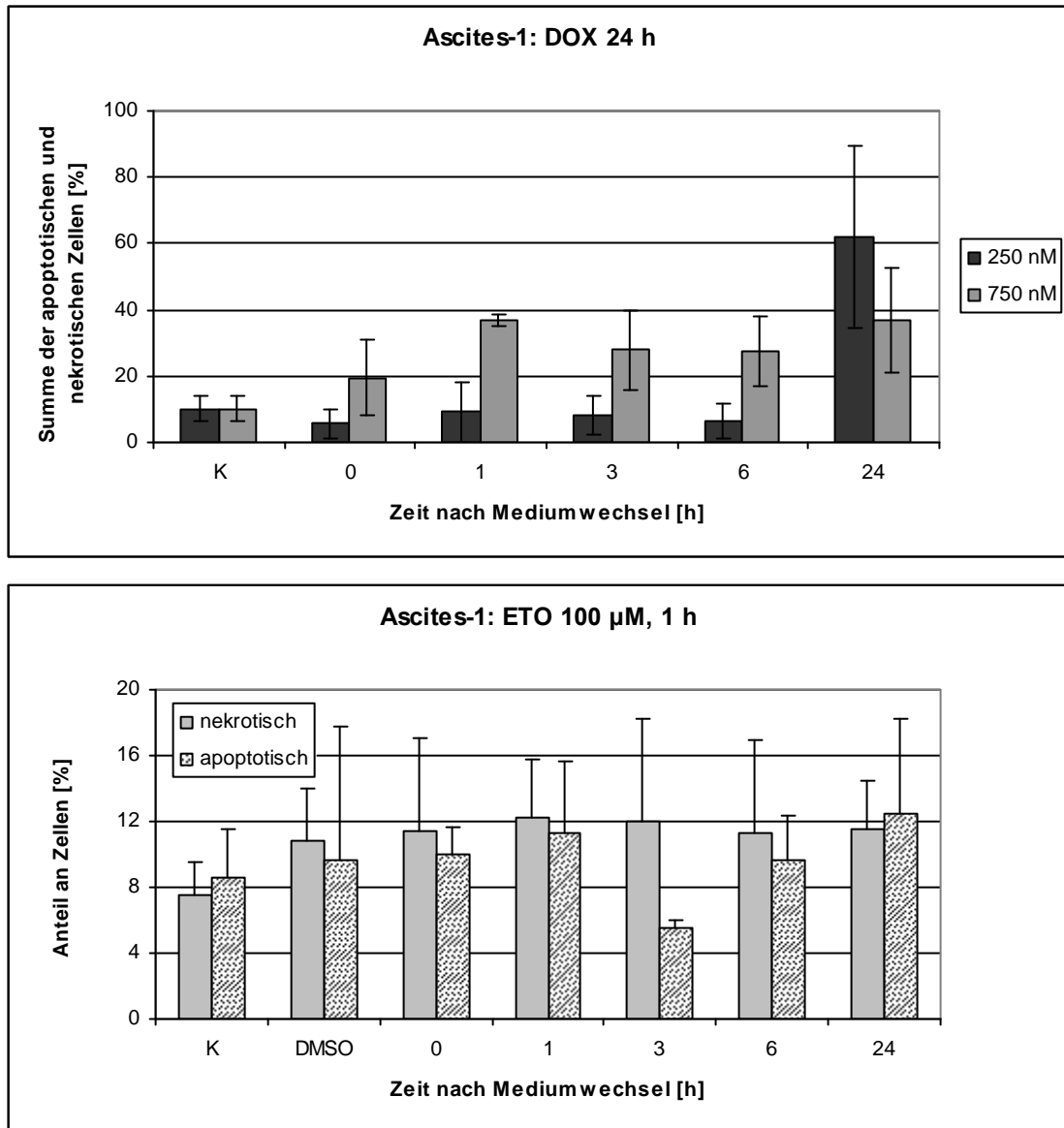
Nach 24 Stunden trat in den Ascites-1-Zellen eine Umkehr dieses Unterschieds auf. Zu diesem Zeitpunkt lag der Anteil geschädigter Zellen nach Behandlung mit 250 nM DOX mit 62,1 % deutlich über dem durch 750 nM induzierten Anteil (36,7 %). Aufgrund der kurzen Zeitspanne, während der Apoptose auftritt, kam es hierbei zu großen Schwankungen (Abschnitt 3.1.5.3). Die einzelnen Werte bewegten sich zwischen 35,4 und 90,0 % (250 nM) bzw. 20,6 und 52,1 % (750 nM). Dieser Effekt war auch bei den HT-29-Zellen aufgetreten.

Die Analyse ETO-behandelter Zellen erfolgte am Beispiel von 100  $\mu$ M ETO für 1 h (untere Grafik). Hier kommt es bei allen Ansätzen zu einem leichten Anstieg nekrotischer Zellen von 7,5 auf 10,9 bis 12,3 %, der jedoch auch bei 0,25 % DMSO auftritt. Der Anteil apoptotischer Zellen erhöht sich in einem



## Ergebnisse

ähnlichen Ausmaß wie bei HT-29-Zellen, nur dass die Kontrollzellen hier bereits stärker geschädigt sind (8,6 vs. 2,0 % Apoptose). Ihr Anteil nach 24 Stunden beträgt 12,5 %. Er liegt mit Ausnahme des 3 h-Wertes jedoch auch zuvor schon über dem Kontrollniveau.



**Abbildung 3.40:** Anteil apoptotischer und nekrotischer Ascites-1-Zellen nach Behandlung mit DOX (obere Grafik) und ETO (untere Grafik). K zeigt den entsprechenden Anteil bei unbehandelten Zellen, DMSO den Anteil bei mit 0,25 % DMSO versetzten Zellen. Aufgetragen wurde der Mittelwert mit Standardabweichung (n=3).

### 3.2.5 Ergebnisüberblick

Aus der Untersuchung der Asciteszellen und durch den Vergleich mit der HT-29-Linie können folgende Resultate festgehalten werden:

- Die Asciteszellen induzierten nach Inkubation mit DOX weniger Doppelstrangbrüche als HT-29-Zellen.
- Nach Behandlung mit ETO lag der DNA-Schaden über dem der HT-29-Zellen. Die Reparatur dieser Strangbrüche erfolgte in den ersten 60 Minuten jedoch wesentlich schneller.
- Der intrazelluläre DOX-Gehalt der Ascites-1-Zellen liegt unter dem der HT-29-Zellen. Der Rückgang nach Entfernung des Zytostatikums verläuft ebenfalls exponentiell.
- Die Ascites-1-Zellen waren durch einen statistisch signifikant geringeren Gehalt der Proteine Rad51, Rad52, Ku70 und Topo II $\alpha$  gekennzeichnet. Die Ascites-2-Zellen wiesen signifikant weniger Rad51, Ku70, Ku86 und DNA-PK<sub>cs</sub> auf.
- Die Sensitivität der Asciteszellen, gemessen an der Zahl der über 14 Tage gebildeten Kolonien, war gegenüber HT-29 verringert. Am meisten ausgeprägt war dieser Effekt nach 24-stündiger Behandlung mit DOX sowie in der Ascites-2-Linie.
- Der zeitliche Eintritt von Apoptose und Nekrose unterscheidet sich in den Ascites-1-Zellen nicht von dem der HT-29-Zellen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Aspekte der DNA-Reparatur in der Zelllinie HT-29

Zunächst werden die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch die Topo II $\alpha$ -Inhibitoren DOX und ETO sowie deren Auswirkungen auf Kolonkarzinomzellen der Linie HT-29 betrachtet. Zudem wird der Einfluss von DNA-Reparaturmechanismen diskutiert.

#### 4.1.1 Verlauf des Topo II $\alpha$ -Inhibitor-induzierten DNA-Schadens

##### 4.1.1.1 Auswahl der Inkubationsbedingungen

Da in der vorliegenden Arbeit die Reparatur Topo II $\alpha$ -Inhibitor-induzierter DNA-Doppelstrangbrüche untersucht werden sollte, mussten zu Beginn der experimentellen Arbeiten für die Modellsubstanzen DOX und ETO Inkubationszeiten und Konzentrationen gefunden werden, bei denen es zu einer statistisch signifikanten Induktion von Strangbrüchen kam. Zu diesem Zweck wurden HT-29-Zellen mit klinisch relevanten Konzentrationen der Substanzen inkubiert und nach einer bzw. 24 Stunden mittels Comet-Assay untersucht. Die einstündige Inkubation simulierte dabei die Bolusgabe, die Inkubation über 24 Stunden die Langzeitinfusion der Substanzen. Im Falle von DOX stand die Behandlung über 24 Stunden zudem stellvertretend für die langsame Eliminationsphase aus dem Plasma. Es zeigte sich, dass nach einstündiger Inkubation mit bis zu 20  $\mu$ M DOX keine DNA-Doppelstrangbrüche induziert wurden. Bei 24-stündiger Inkubation reichte dagegen eine nahezu 100-fach geringere Konzentration zur Induktion aus. Die lange Zeitspanne lässt sich damit erklären, dass DOX DNA-Strangbrüche nicht durch direkte Hemmung der Topo II $\alpha$ , sondern indirekt nach Interkalation in die DNA induziert. Zur Fixation des Cleavage Complex und nachfolgender Bildung von Doppelstrangbrüchen kommt es daher erst, wenn ein Topo II $\alpha$ -Enzym im Rahmen seiner Tätigkeit auf interkaliertes DOX trifft<sup>[34-36]</sup>. Für die nachfolgenden Versuche wurde somit die 24-stündige Inkubation mit der niedrigsten DOX-Konzentration gewählt, bei der die Strangbruchzahl statistisch signifikant erhöht war (250 nM). Zusätzlich wurde mit 750 nM

eine Konzentration ausgewählt, bei der nahezu alle Zellen im Comet-Assay maximale Schädigung aufwiesen (Abschnitt 3.1.1). Im Falle von ETO wurde unter ähnlichen Gesichtspunkten die Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  über eine und 24 Stunden gewählt, sowie die einstündige Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$ . Damit wurden sowohl die Bolusgabe mit normaler und hoher Dosierung, als auch die Langzeitinfusion simuliert. Da ETO die Topo II $\alpha$  direkt hemmt<sup>[39]</sup>, ließ sich die Zahl der Doppelstrangbrüche bereits durch einstündige Inkubation erhöhen.

### 4.1.1.2 Verlauf der DNA-Schädigung

Um das Absinken des Blutplasmaspiegels nach Ende einer Infusion zu imitieren, wurde in den nachfolgenden Experimenten das zytostatikahaltige Zellkulturmedium nach Ablauf der Inkubationszeit abgenommen und gegen zytostatikafreies Medium ersetzt. Interessanterweise ließ sich daraufhin eine unterschiedliche Entwicklung des induzierten DNA-Schadens beobachten (Abbildung 3.1). Intrazelluläres DOX bewirkte nach Austausch des Mediums zunächst eine weitere Zunahme an Doppelstrangbrüchen, wohingegen ihre Zahl nach ETO-Inkubation sofort zurückging. Dieser Unterschied lässt sich ebenfalls mit den Angriffsmechanismen der beiden Substanzen erklären. Da ETO nicht in die DNA interkaliert<sup>[39]</sup>, wird nach Ende der Inkubation die gesamte Substanz entsprechend dem Konzentrationsgefälle rasch aus der Zelle entfernt. Der Anteil, der im Moment des Mediumwechsels kovalent an die DNA gebunden ist, wird durch Abbau des Cleavage Complex freigesetzt<sup>[27, 31, 37]</sup> und kann ebenfalls aus der Zelle befördert werden. Ein Teil des DOX ist dagegen in die DNA interkaliert und wird daher in der Zelle festgehalten. Er kann erst entfernt werden nachdem es zur Interaktion mit Topo II $\alpha$  und Entstehung eines Doppelstrangbruchs gekommen ist und DOX dabei von der DNA gelöst wurde<sup>[34-36]</sup>. Aus diesem Grund stieg die Zahl DOX-induzierter Doppelstrangbrüche nach Austausch des Mediums zunächst weiter an. Erst drei Stunden nach Inkubationsende war der Anteil an interkaliertem DOX offenbar soweit zurückgegangen, dass die Zahl neu gebildeter Strangbrüche geringer war als die Zahl der entfernten. Infolgedessen war im Comet-Assay ein Rückgang der DNA-Schädigung festzustellen. Die zeitverzögerte Zunahme DOX-induzierter Doppelstrangbrüche ist zuvor bereits an anderer Stelle beschrieben worden<sup>[100, 123]</sup>.

## Diskussion

---

Wie die Messung des intrazellulären DOX-Gehalts zeigte, lässt sich der unterschiedliche Schadensverlauf nach der Behandlung mit 250 und 750 nM DOX zum Teil mit der intrazellulären Konzentration der Substanz erklären. So wird durch 24-stündige Inkubation mit 750 nM DOX eine dreifach höhere intrazelluläre DOX-Konzentration erreicht als mit 250 nM. Im untersuchten Konzentrationsbereich kommt es folglich nicht zur Absättigung der Zelle mit DOX. Stattdessen liegt ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration im Medium und in der Zelle vor (Abschnitt 3.1.3). Allerdings bewirkt die dreifach höhere Konzentration keine Zunahme der im Comet-Assay ermittelten DNA-Schädigung um den Faktor drei. Dies ist jedoch darauf zurückzuführen, dass im Comet-Assay nicht die absolute Zahl induzierter DNA-Doppelstrangbrüche bestimmt wird, sondern die Form des in der Elektrophorese entstandenen Kometen (Abschnitt 7.4.1). Da der Komet ab einer gewissen Zahl von Doppelstrangbrüchen die höchste Kategorie der Schädigung erreicht hat, ist die Linearität zwischen Konzentration und DNA-Schädigung im Comet-Assay begrenzt.

Nach Entfernung des DOX-haltigen Mediums kam es bei beiden untersuchten Konzentrationen zu einem exponentiellen Rückgang des intrazellulären Gehalts. Allerdings ließ sich im Comet-Assay nur bei der Behandlung mit 250 nM DOX eine Abnahme der Strangbruchzahl beobachten. Offenbar ist die Zahl interkalierter Moleküle nach Inkubation mit 750 nM DOX zu groß, als dass in der Zelle eine Reparatur der Strangbrüche durchgeführt würde bzw. als dass sie sich detektieren ließe. Diese Erklärung kann jedoch nur in den ersten sechs Stunden nach Mediumwechsel gelten. Danach sank der intrazelluläre DOX-Gehalt in den mit 750 nM behandelten Zellen auf den Wert, den die mit 250 nM inkubierten Zellen am Ende der 24-stündigen Inkubation aufwiesen. Spätestens nach 10 Stunden müsste also auch bei der höheren Konzentration ein Rückgang der Strangbruchzahl erkennbar sein. Da dies nicht der Fall war, lässt sich vermuten, dass es ein zelluläres Zeitlimit gibt, in dem eine Reparatur der DNA versucht wird. Erweist sich der Schaden in dieser Zeit als zu hoch, werden weitere Reparaturbemühungen offenbar eingestellt und der programmierte Zelltod induziert (Abschnitt 4.1.2).

In der mit 750 nM DOX inkubierten Versuchsreihe war daher lediglich in einem von drei Ansätzen ein Rückgang der DNA-Schädigung zu

## Diskussion

---

verzeichnen und zwar 28 Stunden nach Mediumwechsel. Da dieser Ansatz bei mikroskopischer Betrachtung einen hohen Anteil abgelöster Zellen aufwies, steht zu vermuten, dass der Rückgang der Schädigung nicht auf Reparatur beruht. Eher ist anzunehmen, dass die Zellen mit der größten DNA-Schädigung in diesem Ansatz nicht erfasst wurden, da sie sich bereits von der Zellkulturplatte gelöst hatten und bei der Aufarbeitung mit dem Medium abgesaugt wurden. Um sicherzustellen, dass das Absinken der Strangbruchzahl im Comet-Assay nicht grundsätzlich durch Ablösung stark geschädigter Zellen hervorgerufen wurde, wurde die Zellzahl im abgesaugten Medium beim Mediumwechsel sowie sechs und 24 Stunden danach bestimmt. Da die Zahl abgelöster Zellen in den ersten sechs Stunden in keinem Ansatz stieg, muss der Rückgang an DNA-Doppelstrangbrüchen durch Reparatur erfolgen (Abbildung 3.2).

Bei Betrachtung des Reparaturverlaufs nach einstündiger Behandlung mit ETO ist festzustellen, dass die Höhe des induzierten DNA-Schadens nach Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  nur geringfügig über der durch 10  $\mu\text{M}$  erzielten Höhe lag. Dieser Unterschied war nicht statistisch signifikant. Ebenso unterschieden sich die Reparaturkurven nicht voneinander (Abbildung 3.1). Behandelte man die Zellen hingegen über 24 Stunden mit 10  $\mu\text{M}$  ETO, war der initiierte Schaden gegenüber beiden 1 h-Werten statistisch signifikant erhöht. Die Beobachtungen legen nahe, dass die Zahl der induzierten DNA-Doppelstrangbrüche im untersuchten Konzentrationsbereich durch die Menge nukleär lokalisierter Topo II $\alpha$ -Enzyme limitiert wird. Diese ist über 24 Stunden höher als über eine Stunde, da Topo II $\alpha$  zum Einen neu synthetisiert wird; zum Anderen ist der proteasomale Abbau<sup>[124]</sup> durch die Fixation des Cleavage Complex und den Zellzyklusarrest in der G<sub>2</sub>/M-Phase (Abschnitt 4.1.2.3) verzögert. Sicher ist, dass eine qualitative oder quantitative Abnahme von Topo II $\alpha$  zur Verringerung der zellulären Sensitivität gegenüber Topo II $\alpha$ -Inhibitoren führt<sup>[27, 107]</sup>. Eine Korrelation zwischen Topo II $\alpha$ -Aktivität und Strangbruchzahl wurde bisher nicht beschrieben, ist angesichts des Mechanismus der Topo II $\alpha$ -Inhibitoren jedoch zu vermuten.

Zudem fällt bei Betrachtung des Reparaturverlaufs auf, dass es über 12 Stunden nach Mediumwechsel zu erneuten, unterschiedlich stark ausgeprägten Anstiegen von Doppelstrangbrüchen kam. Nach der Behandlung mit DOX trat dieser Effekt ebenfalls auf, war aber geringer

ausgeprägt. Wie in Abschnitt 4.1.2.2 diskutiert wird, beruhen die neuen Strangbrüche auf der Induktion von Apoptose, in deren Verlauf die DNA fragmentiert wird<sup>[103]</sup>. Die Schwankungen lassen sich damit erklären, dass die Apoptose innerhalb einer kurzen Zeitspanne von ca. 30 Minuten abläuft. Erfolgt die Präparation des Comet-Assay vor diesem Zeitraum, kann noch keine Fragmentierung der DNA festgestellt werden; erfolgt sie danach, haben sich die Zellen bereits abgelöst und werden durch die Aufarbeitung nicht erfasst.

Festzuhalten bleibt, dass durch ETO induzierte DNA-Doppelstrangbrüche nach Ende der Inkubation schnell repariert wurden. Die Zahl DOX-induzierter Strangbrüche stieg hingegen aufgrund der Interkalation leicht an. Erst nach drei Stunden konnte bei niedriger DOX-Konzentration ebenfalls ein Rückgang der Strangbruchzahl verzeichnet werden. Bei hoher DOX-Konzentration fand dagegen keine Reparatur mehr statt, da der induzierte DNA-Schaden offenbar zu groß und damit irreparabel war. In den ETO- und DOX-Ansätzen, in denen Reparatur stattgefunden hatte, traten ab 12 Stunden nach Inkubationsende erneut Doppelstrangbrüche auf. Sie sind auf die Fragmentierung der DNA, die im Rahmen von Apoptose und Nekrose stattfindet, zurückzuführen.

### 4.1.2 Betrachtung der zytotoxischen Effekte

#### 4.1.2.1 Koloniebildungsvermögen

Bei mikroskopischer Betrachtung der mit DOX und ETO inkubierten Zellen ließen sich für Apoptose und Nekrose typische Veränderungen beobachten. Morphologische Merkmale der Apoptose sind die Kondensation von Nukleus und Zytoplasma, das Ablösen aus dem Zellverband, die Bildung von Vesikeln an der Oberfläche der Zellmembran und das Abschnüren dieser Vesikel als apoptotische Körperchen<sup>[104]</sup>. Kennzeichen der Nekrose sind ein Anschwellen der Zelle und ihrer Organellen sowie im späteren Stadium die Ruptur der zellulären Membranen<sup>[105]</sup>. Die Behandlung mit DOX und ETO gemäß Tabelle 3.1 führte nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden zu Veränderungen beider Art, wobei apoptotische Körperchen erst nach Ende der Inkubation entstanden. Nach einstündiger Behandlung mit ETO waren keine Veränderungen im morphologischen Erscheinungsbild zu beobachten.

18 Stunden nach Austausch des Mediums entsprach das Bild jedoch dem nach 24-stündiger Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  ETO (Abschnitt 3.1.4). Ausgehend von diesen morphologischen Veränderungen wurden verschiedene Aspekte des Zelltods und der Zytotoxizität analysiert. Ein wichtiges Merkmal der Resistenz ist die Fähigkeit von Zellen, nach zytostatischer Behandlung Kolonien bilden zu können. Voraussetzung für das Entstehen einer solchen Zellkolonie ist, dass mindestens eine proliferationsfähige Zelle die Behandlung überlebt. Die hier getesteten Bedingungen ließen kaum (100  $\mu\text{M}$  ETO 1 h) oder kein (DOX und ETO 24 h) Koloniewachstum zu. Ausnahme ist die einstündige Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  ETO, also die kurzzeitige Inkubation mit geringer ETO-Konzentration (Abschnitt 3.1.5.1). Hier kam es im Vergleich mit unbehandelten Zellen zwar zu einer Abnahme der Koloniezahl, doch war diese nicht signifikant. Dies ist erstaunlich, da der DNA-Schaden in Höhe und Verlauf nicht signifikant unter dem der ebenso lang mit 100  $\mu\text{M}$  ETO inkubierten Zellen lag. Dort bildeten sich jedoch nur zwei Kolonien. Das bedeutet, dass andere Effekte als die Zahl induzierter Doppelstrangbrüche den Erfolg einer Therapie mit ETO beeinflussen. Diese Ansicht entspricht der von Chatterjee et al. <sup>[125]</sup>, die in unterschiedlich sensitiven Hamsterzellen die gleiche Zahl von ETO-induzierten Doppelstrangbrüchen fanden.

Nach 24-stündiger Behandlung mit niedriger ETO- sowie mit verschiedenen DOX-Konzentrationen konnten die HT-29-Zellen keine Kolonien mehr bilden. Das unterstreicht wie wichtig es ist, Krebspatienten über eine ausreichend lange Zeitspanne mit ausreichend hohen Zytostatika-Konzentrationen zu behandeln.

#### 4.1.2.2 Untersuchung des Zelltods

Der Ablauf des Zelltods wurde in zwei weiteren Versuchsreihen näher beleuchtet. Zunächst wurde mit dem alamar Blue<sup>TM</sup>-Assay ein Test durchgeführt, der den Mediumumsatz einer Zellpopulation anzeigt. Er beruht auf der durch Zellumsatz bedingten Reduktion des Farbstoffs Resazurin zu Resorufin und der quantitativen fluorimetrischen Erfassung der reduzierten Form. Da der Zellumsatz mit der Zahl der Zellen steigt, wird der alamar Blue<sup>TM</sup>-Assay als Proliferations- bzw. Zytotoxizitätstest eingesetzt <sup>[126]</sup>. Allerdings haben Vorversuche gezeigt, dass die Linearität zwischen Zellzahl und Fluoreszenz begrenzt ist. Überstieg die Zelldichte zum Zeitpunkt der



## Diskussion

---

Farbstoffzugabe die Grenze von  $3,2 \times 10^5$  Zellen/ml, so nahm die Fluoreszenz wieder ab. Grund dafür ist die weitere Reduktion des fluoreszierenden Resorufins zu nicht-fluoreszierendem Hydroresorufin <sup>[127]</sup>. Daher wurden in den alamar Blue™-Versuchen nur  $5 \times 10^3$  Zellen/ml ausplattiert, um die kritische Zellzahl von  $3,2 \times 10^5$ /ml im untersuchten Zeitraum nicht zu überschreiten und alle Messungen im linearen Bereich durchführen zu können. Bei unbehandelten Kontrollzellen wurde die Zellzahl jedoch offenbar trotzdem überschritten, da die Fluoreszenz geringer war als 48 Stunden nach der Inkubation mit niedrigen DOX- und ETO-Konzentrationen. Selbst gegenüber der Behandlung mit 250 nM DOX und 10  $\mu$ M ETO über 24 Stunden war die Fluoreszenz erniedrigt (Abschnitt 3.1.5.2). Sollte die niedrige Fluoreszenz der Kontrollzellen nicht auf einer Reduktion des fluoreszierenden Resorufins beruhen, hieße dies, dass niedrige DOX- und ETO-Konzentrationen eine Steigerung der Proliferation bewirken. Zwar wurde diese bei niedrigen DOX-Konzentrationen bereits mehrfach beschrieben, allerdings bewegten sich die eingesetzten Konzentrationen mit  $10^{-7}$  bis  $10^{-10}$  M dabei unter 250 nM. Zum Anderen kam es im Gegensatz zu den hier durchgeführten Versuchen dabei zu einer Zunahme der Koloniezahl <sup>[43, 128, 129]</sup>.

Grundsätzlich wäre dennoch denkbar, dass DOX und ETO, wie von Arsenit bekannt, dosisabhängig ERK oder JNK aktivieren und so entweder proliferationssteigernd oder apoptotisch wirken können <sup>[130]</sup>. So konnte in DOX-inkubierten Leukämiezellen in subletaler und letaler Dosierung eine Aktivierung von JNK, aber nicht von ERK gemessen werden <sup>[131, 132]</sup>. Gleiches gilt für Tumorzellen, die mit ETO behandelt wurden <sup>[132]</sup>. Allerdings bewegten sich die Konzentrationen, bei denen es im alamar Blue™-Assay zu einer scheinbaren Steigerung der Proliferation kam, zum Teil bereits im letalen Bereich, so dass sich eine ERK-vermittelte Proliferationssteigerung ausschließen lässt. In jedem Fall zeigten diese Versuche, dass es in den ersten 48 Stunden nach Ende der DOX- und ETO-Behandlungen nicht zu einem exzessiven Zellsterben kam. Der Zelltod tritt also, wie schon die Bestimmung der Zahl abgelöster Zellen beim Comet-Assay gezeigt hatte, keinesfalls direkt nach Induktion der Doppelstrangbrüche auf.

## Diskussion

---

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Art des Zelltods charakterisiert. Zudem erfolgte die Untersuchung über einen längeren Zeitraum. Hierzu wurde die Tatsache genutzt, dass Apoptose und Nekrose unterschiedliche Veränderungen der Zellmembran verursachen<sup>[117]</sup>, die sich durch Inkubation mit Annexin V und Propidiumiodid differenzieren lassen (Abschnitt 3.1.5.3). Die Untersuchung ETO-behandelter Zellen zeigte 24 Stunden nach Inkubationsende einen leicht erhöhten Anteil apoptotischer Zellen, wobei zwischen der Induktion der Strangbrüche und dem Anstieg des apoptotischen Anteils ein Zeitraum von über sieben Stunden lag. Der Anteil nekrotischer Zellen blieb bis zu diesem Zeitpunkt auf dem Niveau unbehandelter Kontrollzellen. Dieses Ergebnis überrascht nicht, da ETO als effektiver Apoptoseinduktor bekannt ist<sup>[19]</sup>. Die Doppelstrangbrüche, die im Comet-Assay ab 12 Stunden nach Inkubationsende zu Anstiegen im Kurvenverlauf geführt haben, sind somit auf die oligonukleosomale DNA-Fragmentierung apoptotischer Zellen zurückzuführen (Abschnitt 4.1.1.2). Ob die Induktion der Apoptose in Verbindung mit der Reparatur der Doppelstrangbrüche steht oder unabhängig davon erfolgt, soll in dieser Arbeit an späterer Stelle diskutiert werden. Zudem bestätigt das Ergebnis erneut, dass der Zelltod nicht spontan nach Induktion der Doppelstrangbrüche auftritt, wie auch von Lundin et al.<sup>[133]</sup> beschrieben. Die Abnahme des DNA-Schadens in den ersten 1,5 Stunden nach Behandlung mit ETO ist somit nicht auf Zelltod sondern auf Reparatur zurückzuführen.

Über einen Zeitraum von acht Tagen betrachtet stieg die Summe der toten Zellen kontinuierlich an, wobei fast alle Ansätze am achten Tag rund 80 % tote Zellen aufwiesen (Abbildung 3.9). Nur nach einstündiger Inkubation mit 10  $\mu$ M ETO wurde lediglich ein Anteil von 41 % erreicht. Dies korreliert mit dem Ergebnis des Colony Formation Assay. Betrachtet man den apoptotischen und nekrotischen Anteil der ETO-behandelten Zellen getrennt voneinander, so wies der nekrotische Anteil dieselbe Tendenz auf wie die Summe toter Zellen insgesamt (Abbildung 3.10). Im Verlauf des apoptotischen Anteils trat dagegen nach 48 bis 72 Stunden ein Maximum auf. Danach stieg nur noch der Anteil nekrotischer Zellen. Da apoptotische Körperchen eine sekundäre Nekrose eingehen, wenn sie nicht phagozytiert werden<sup>[105]</sup>, verringert sich ihr Anteil nach diesem Zeitpunkt offenbar zu Gunsten der Nekrose. Auffällig ist zudem, dass durch die einstündige Behandlung mit

## Diskussion

---

10  $\mu\text{M}$  ETO sowohl weniger Apoptose als auch Nekrose induziert wurden. Der apoptotische Anteil unterschied sich dadurch kaum von dem der Kontrollzellen. Das größere Koloniebildungsvermögen könnte daher auf einer mangelnden Induktion des Zelltods beruhen.

Bei mit DOX behandelten Zellen ließ sich aufgrund der Eigenfluoreszenz von DOX nicht zwischen Apoptose und Nekrose differenzieren. Die Summe Annexin-positiver Zellen in den ersten 24 Stunden nach Inkubationsende nahm jedoch einen ähnlichen Verlauf wie der apoptotische Anteil nach 24-stündiger ETO-Inkubation. Da Dunkern et al.<sup>[100]</sup> zeigen konnten, dass der Anteil DOX-induzierter Apoptose dosisabhängig steigt wohingegen sich der Anteil der Nekrose nur marginal ändert, lässt sich vermuten, dass die hier beschriebene Zunahme toter Zellen auf der Zunahme apoptotischer Zellen beruht. Paradoxerweise war der Anteil toter Zellen 24 Stunden nach Inkubationsende bei 250 nM höher als bei 750 nM DOX, wobei in beiden Fällen große Schwankungen auftraten. Ein statistisch signifikanter Unterschied bestand nicht. Die Analyse über acht Tage zeigte dagegen einen statistisch signifikant höheren Anteil toter Zellen nach 750 nM DOX, was der oben beschriebenen Dosisabhängigkeit entspricht<sup>[100]</sup>. Die Schwankungen im ersten Fall beruhen daher vermutlich auf der Nicht-Erfassung abgelöster Zellen, wie bereits für den Comet-Assay diskutiert.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass der durch ETO induzierte Zelltod sowohl apoptotisch als auch nekrotisch war, wobei der apoptotische Anteil 48 und 72 Stunden nach Mediumwechsel überwog. Die einstündige Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  ETO induzierte nach acht Tagen signifikant weniger Zelltod als die anderen in Tabelle 3.1 angegebenen Behandlungen, insbesondere wurde kaum Apoptose induziert. Der Zelltod DOX-behandelter Zellen konnte dagegen nicht differenziert werden, entsprach im Ausmaß aber der Toxizität der 24-stündigen ETO-Inkubation. Die Ergebnisse der Untersuchung bestätigten die Beobachtungen des Colony Formation Assays.

### 4.1.2.3 Beeinflussung des Zellzyklus

Die Charakterisierung des Zelltods der mit DOX und ETO behandelten HT-29-Zellen zeigte, dass die Zahl der induzierten Doppelstrangbrüche nicht mit der Höhe des apoptotischen oder nekrotischen Anteils oder deren Summe korreliert. Die fehlende Korrelation zwischen Strangbruchzahl und Apoptose bzw. Zytotoxizität wurde bereits zuvor beschrieben <sup>[125, 134]</sup>. Das bedeutet, dass andere intrazelluläre Vorgänge die Toxizität beeinflussen. Aus diesem Grund wurde die Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus analysiert. Es ist bekannt, dass Zellen als Reaktion auf die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen die Progression durch den Zellzyklus stoppen und so Zeit für die DNA-Reparatur erhalten können <sup>[99]</sup>. DOX und ETO blockieren den Zellzyklus dazu in der G<sub>2</sub>/M-Phase <sup>[135, 136]</sup>. Dieses Ergebnis wurde auch in den gemäß Tabelle 3.1 behandelten HT-29-Zellen erhalten, wobei sich die einstündige Behandlung mit 10 µM ETO erneut absetzte. Während sich in allen anderen Versuchen 24 Stunden nach Mediumwechsel 80 bis 90 % der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase befanden, entsprach die Verteilung in diesem Fall der von unbehandelten Zellen. Zudem verringerte sich der G<sub>2</sub>/M-Anteil hier in den folgenden acht Tagen zu Gunsten des G<sub>1</sub>-Anteils, sowie nach 72 Stunden zu Gunsten des Anteils toter Zellen mit einem DNA-Gehalt < G<sub>1</sub>. Der Anteil toter Zellen entsprach dabei dem bei der Annexin V-Färbung erzielten Ergebnis. Die Teilung in den eine Stunde mit 10 µM ETO behandelten Zellen nahm also langsam ab, was sich damit erklären lässt, dass das Nährmedium verbraucht wurde und der freie Platz auf der Zellkulturplatte abnahm. Das gleiche Phänomen trat bei unbehandelten Kontrollzellen auf. Bei langen Inkubationszeiten oder hohen Konzentrationen von DOX und ETO korrelierte die Abnahme des G<sub>2</sub>/M-Blocks dagegen mit der Zunahme toter Zellen. Das bedeutet, dass die Zellen nicht mehr aus der Blockade heraustraten und keine Teilung mehr durchliefen, sondern direkt in den Zelltod übergingen. Dies verwundert insofern, da die Reparatur der Strangbrüche schon nach wenigen Stunden augenscheinlich abgeschlossen war. Der G<sub>2</sub>/M-Block blieb dagegen über Tage bestehen. Eine Erklärung bietet die von Iliakis und Wang <sup>[73, 79]</sup> aufgestellte Theorie, nach der Doppelstrangbrüche zwar zunächst durch NHEJ repariert werden, aber aufgrund von Fehlern durch HR überarbeitet werden müssen. Da HR zur Reparatur einen Abschnitt homologer Sequenz benötigt, erfolgt sie vorwiegend in der späten S- und G<sub>2</sub>-Phase wenn ein

## Diskussion

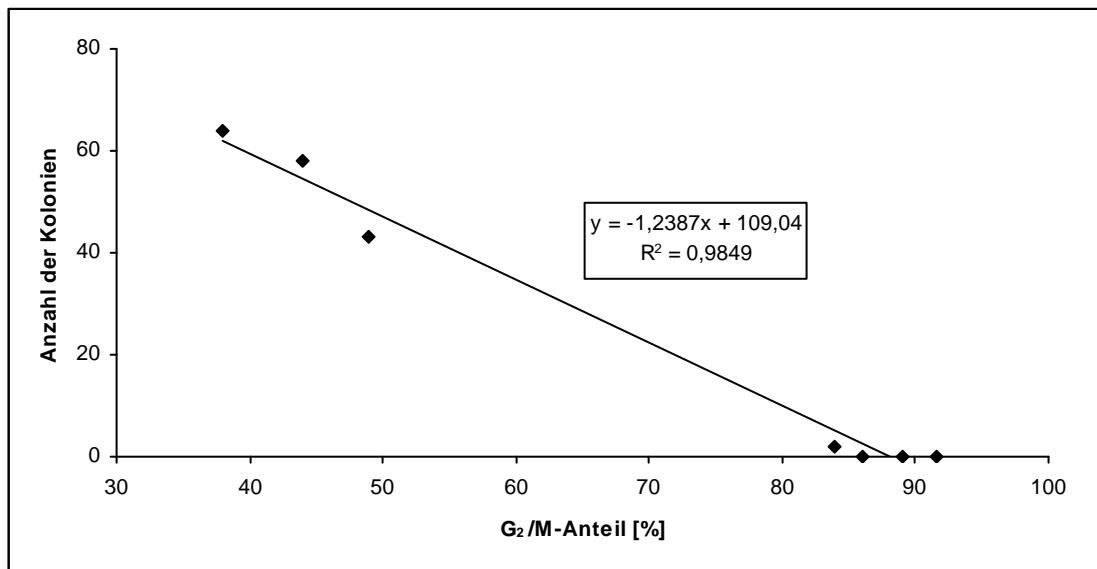
---

Schwesterchromatid zur Verfügung steht <sup>[71]</sup>. Eine Blockade des Zellzyklus in der G<sub>2</sub>/M-Phase unterstützt somit eine Reparatur durch HR. Die Tatsache, dass die Blockade nicht wieder aufgelöst wurde, untermauert die in Abschnitt 4.1.1.2 diskutierte Theorie des Zeitfensters, während dessen eine Reparatur der DNA möglich ist. Sollte der Schaden in diesem Zeitraum nicht oder falsch repariert worden sein, wird der programmierte Zelltod induziert und die Blockade des Zellzyklus beibehalten. Denkbar ist auch, dass die Reparatur der DNA während des gesamten G<sub>2</sub>/M-Blocks erfolgte, aufgrund der Komplexität des Schadens aber nicht abgeschlossen werden konnte und es aus denselben Gründen zum Zelltod kam. Die unzureichende Reparatur der Strangbrüche zeigte sich im Comet-Assay nach 24-stündiger Inkubation mit DOX und ETO. Hier ging die Höhe der DNA-Schädigung nicht wieder auf das Maß der Kontrollzellen zurück (Abbildung 3.1). Da sich der G<sub>2</sub>/M-Block bei kurzer Inkubation mit geringer ETO-Konzentration nicht ausbildete, lässt sich annehmen, dass der induzierte DNA-Schaden zuvor korrekt repariert wurde. Bei kurzer Inkubation mit hoher ETO-Konzentration bildete sich die Zellzyklusblockade hingegen aus, obwohl die DNA zu diesem Zeitpunkt augenscheinlich bereits repariert war. Da die Höhe des durch 10 µM ETO induzierten Schadens nur geringfügig unter der der Behandlung mit 100 µM lag, bedeutet dies, dass der durch 100 µM induzierte Schaden entweder komplexer war oder dass die Induktion G<sub>2</sub>/M-blockierender Signalwege unabhängig von der Strangbruchzahl erfolgte. Zwar wird die ATM/ATR-vermittelte Zellzyklusblockade in Abhängigkeit von den Strangbrüchen induziert, doch kann ETO auch ATM/ATR-unabhängig den Zyklus blockieren <sup>[137]</sup>. Ein Kandidat dafür ist die p38-MAP-Kinase, die durch ETO aktiviert wird und die G<sub>2</sub>/M-Passage via Cdk2 inhibiert <sup>[138]</sup>.

Wie Abbildung 4.1 zeigt, gab es interessanterweise eine negative Korrelation zwischen der Höhe des G<sub>2</sub>/M-Anteils 24 Stunden nach Ende der Inkubation und der Anzahl der über 14 Tage gebildeten Zellkolonien. Nach 48 Stunden und später bestand keine Korrelation mehr, da hier bereits vermehrt programmierter Zelltod auftrat. Ein Zusammenhang zwischen Zellzyklusverschiebungen und Chemosensitivität wurde bereits von Petru und Kollegen <sup>[135]</sup> beschrieben. Der Zeitraum von 24 Stunden nach Behandlung scheint dabei von kritischer Bedeutung zu sein, da in bestrahlten NSCLC-

## Diskussion

Zellen zum gleichen Zeitpunkt eine negative Korrelation von Koloniezahl und Rad51-Foki gezeigt werden konnte <sup>[139]</sup>. Rad51 wiederum wird vor allem in der späten S- und G<sub>2</sub>-Phase exprimiert <sup>[84]</sup>. Diese beiden Korrelationen mit der Koloniezahl legen nahe, dass die Entscheidung zwischen Zelltod und Reparatur in den ersten 24 Stunden nach Ende der Inkubation fällt und unterstützt damit die Theorie des Reparatur-Zeitfensters.

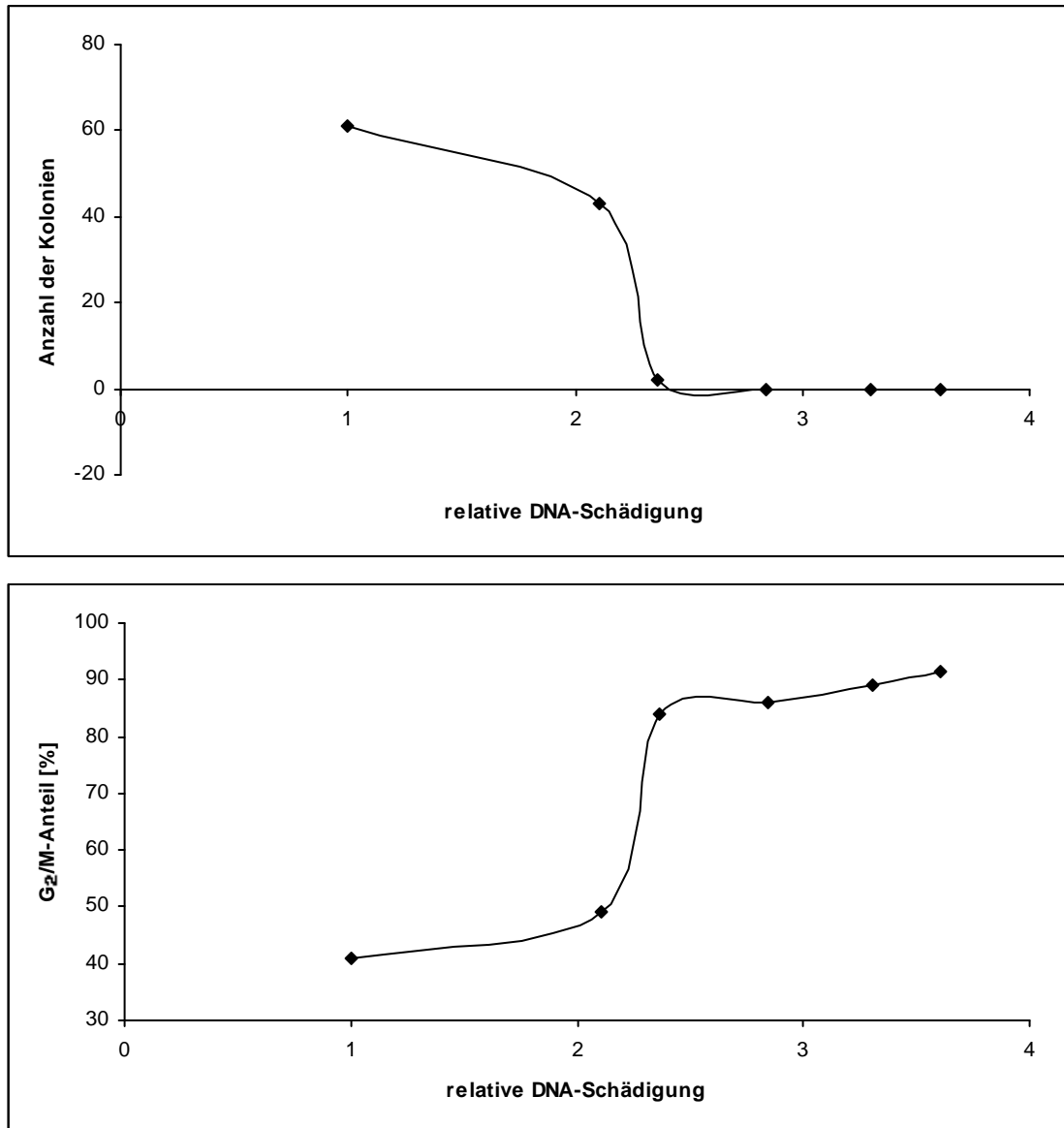


**Abbildung 4.1:** Negative Korrelation zwischen dem G<sub>2</sub>/M-Anteil 24 Stunden nach Ende der Inkubation und der Zahl der nach 14 Tagen gebildeten Kolonien.

Zwischen der Höhe der induzierten DNA-Schädigung und der Koloniezahl gibt es hingegen keinen linearen Zusammenhang. Gleiches gilt für die Korrelation zwischen DNA-Schädigung und G<sub>2</sub>/M-Anteil (Abbildung 4.2). Vielmehr scheint es in diesen Fällen einen sprunghaften Anstieg des G<sub>2</sub>/M-Anteils bzw. eine abrupte Abnahme der Koloniezahl zu geben, wenn die DNA-Schädigung gegenüber der Kontrolle um Faktor 2,3 zunimmt (siehe Wendepunkte der interpolierten Kurven). Das heißt, dass es eine kritische Zahl an Doppelstrangbrüchen gibt, nach deren Überschreitung G<sub>2</sub>/M-Block und Zelltod induziert werden. Da es keine Datenpunkte zwischen 50 und 80 % G<sub>2</sub>/M-Anteil gibt, kann zwar nicht sichergestellt werden, dass der in Abbildung 4.1 dargestellte Zusammenhang zwischen Koloniezahl und G<sub>2</sub>/M-Anteil tatsächlich linear ist. Nimmt man jedoch die jeweiligen Werte an den Wendepunkten der Kurven in Abbildung 4.2, so liegt der entstehende

## Diskussion

Datenpunkt auf der erstellten Regressionsgeraden (25 Kolonien, 70 % G<sub>2</sub>/M-Anteil). Für einen linearen Zusammenhang spricht auch die von Sak und Kollegen<sup>[139]</sup> gefundene negative lineare Korrelation zwischen Rad51-Foki und Koloniezahl, da Rad51 wiederum vor allem in der späten S- und G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus gebildet wird<sup>[84]</sup>.



**Abbildung 4.2:** Zusammenhang zwischen der induzierten DNA-Schädigung und der Anzahl der Kolonien (oben) bzw. dem G<sub>2</sub>/M-Anteil 24 Stunden nach Ende der Inkubation (unten). Die Datenpunkte wurden interpoliert.

## Diskussion

---

Zusammenfassend wird festgehalten, dass die 24-stündige Gabe von DOX und ETO sowie die einstündige Behandlung mit hoher ETO-Konzentration das Koloniewachstum von HT-29-Zellen inhibierten. Der Zelltod erfolgte bei den meisten Zellen dabei in den ersten acht Tagen nach der Behandlung. Zudem kam es zu einer Blockade des Zellzyklus in der G<sub>2</sub>/M-Phase, aus der die Zellen vor ihrem Tod nicht wieder heraustraten. Da der G<sub>2</sub>/M-Block 24 Stunden nach Mediumwechsel negativ mit der Zahl der gebildeten Kolonien korrelierte, wird angenommen, dass die Entscheidung über das Schicksal der Zelle in diesen ersten 24 Stunden fällt. Die einstündige Behandlung mit einer niedrigen ETO-Konzentration führte weder zur Blockade des Zellzyklus noch wurde das Koloniewachstum signifikant verringert, obwohl sich die Höhe des DNA-Schadens und der Reparaturverlauf nicht signifikant von der hochdosierten ETO-Kurzbehandlung unterschieden. Daher wird postuliert, dass die G<sub>2</sub>/M-Blockade auch durch Signalwege ausgelöst wird, die unabhängig von der Zahl der Doppelstrangbrüche induziert werden.

Zudem wird die von Iliakis und Wang<sup>[73, 79]</sup> entwickelte Theorie unterstützt, dass DNA-Doppelstrangbrüche zunächst zur schnellen Reparatur des Schadens von NHEJ zusammengefügt, danach aber aufgrund von Fehlern durch HR überarbeitet werden. Dafür spricht, dass die Reparatur der Strangbrüche augenscheinlich nach wenigen Stunden abgeschlossen war, die Blockade des Zellzyklus jedoch weiter bestehen blieb. Da der Zyklus in der G<sub>2</sub>/M-Phase blockiert wurde, unterstützt dies die HR. Durch welchen der beiden DNA-Reparaturwege die durch DOX und ETO induzierten Doppelstrangbrüche tatsächlich repariert wurden, wird im folgenden Abschnitt diskutiert.



### 4.1.3 Diskussion möglicher DNA-Reparaturmechanismen

#### 4.1.3.1 Untersuchung der an der DNA-Reparatur beteiligten Proteine

Wie in Abschnitt 4.1.1 gezeigt werden konnte, kam es außer im Falle von 750 nM DOX nach Ende der Inkubation mit DOX und ETO zu einer Reparatur der induzierten DNA-Doppelstrangbrüche. Eukaryontische Zellen verfügen mit NHEJ und HR über zwei potentielle Wege zur Reparatur derartiger Schäden<sup>[71]</sup>. Diese wurden in Abschnitt 1.5 bereits eingehend besprochen. Um die Bedeutung dieser Wege für die beobachteten Reparaturvorgänge festzustellen, wurde untersucht, ob die Behandlung mit den beiden Topo II $\alpha$ -Inhibitoren DOX und ETO zu einer Veränderung des Gehaltes der jeweils wichtigsten Reparaturproteine in HT-29-Zellen führte. Dies sind im Falle von NHEJ DNA-PK<sub>cs</sub>, Ku70 und Ku86 und bei HR Rad51, Rad52 und Rad54 (Abschnitt 3.1.6.1). Da die Topo II $\alpha$ -Inhibitor-induzierten Doppelstrangbrüche repariert werden, ist eher eine Induktion der Proteinexpression als eine Reduktion zu erwarten. Die Untersuchung zeigte, dass es weder nach einstündiger noch nach 24-stündiger Behandlung mit DOX und ETO zu einer Regulation der NHEJ-Proteine kam. Da DNA-PK<sub>cs</sub>, Ku70 und Ku86 für die schnelle Schadenserkennung benötigt und daher konstitutiv hoch exprimiert werden<sup>[71]</sup>, überrascht dieses Ergebnis nicht. In den folgenden 24 Stunden, in denen die DNA-Reparatur stattfand, ließ sich jedoch ein stetiger, wenn auch geringer Rückgang der drei Proteine beobachten. Allerdings konnten bei der Standardisolierung Proteine, die an die DNA gebunden waren, nicht mit erfasst werden. Bei der Untersuchung der Gesamtproteine, bei der auch die an die DNA gebundenen Proteine isoliert wurden, fiel der Rückgang dagegen geringer aus (Abschnitt 3.1.6.2). Das zeigt, dass während der Reparaturzeit mehr NHEJ-Proteine an die DNA gebunden waren als in der Kontrolle. Diese Bindung der Proteine an die DNA ist ein Indiz für eine Reparatur durch NHEJ<sup>[71, 72]</sup>. Jedoch kam es auch bei Untersuchung der Gesamtproteine teilweise zu einer leichten Abnahme der untersuchten NHEJ-Proteine. Der Grund hierfür könnte sein, dass sich ein Teil der Zellen zum Zeitpunkt der Isolierung bereits in der Apoptose befand. Da die DNA im Rahmen der Apoptose fragmentiert wird, wäre eine DNA-Reparatur in diesen Zellen kontraproduktiv und würde unnötigerweise ATP verbrauchen. Aus diesem Grund werden DNA-PK<sub>cs</sub>, Ku70 und Ku86 in

## Diskussion

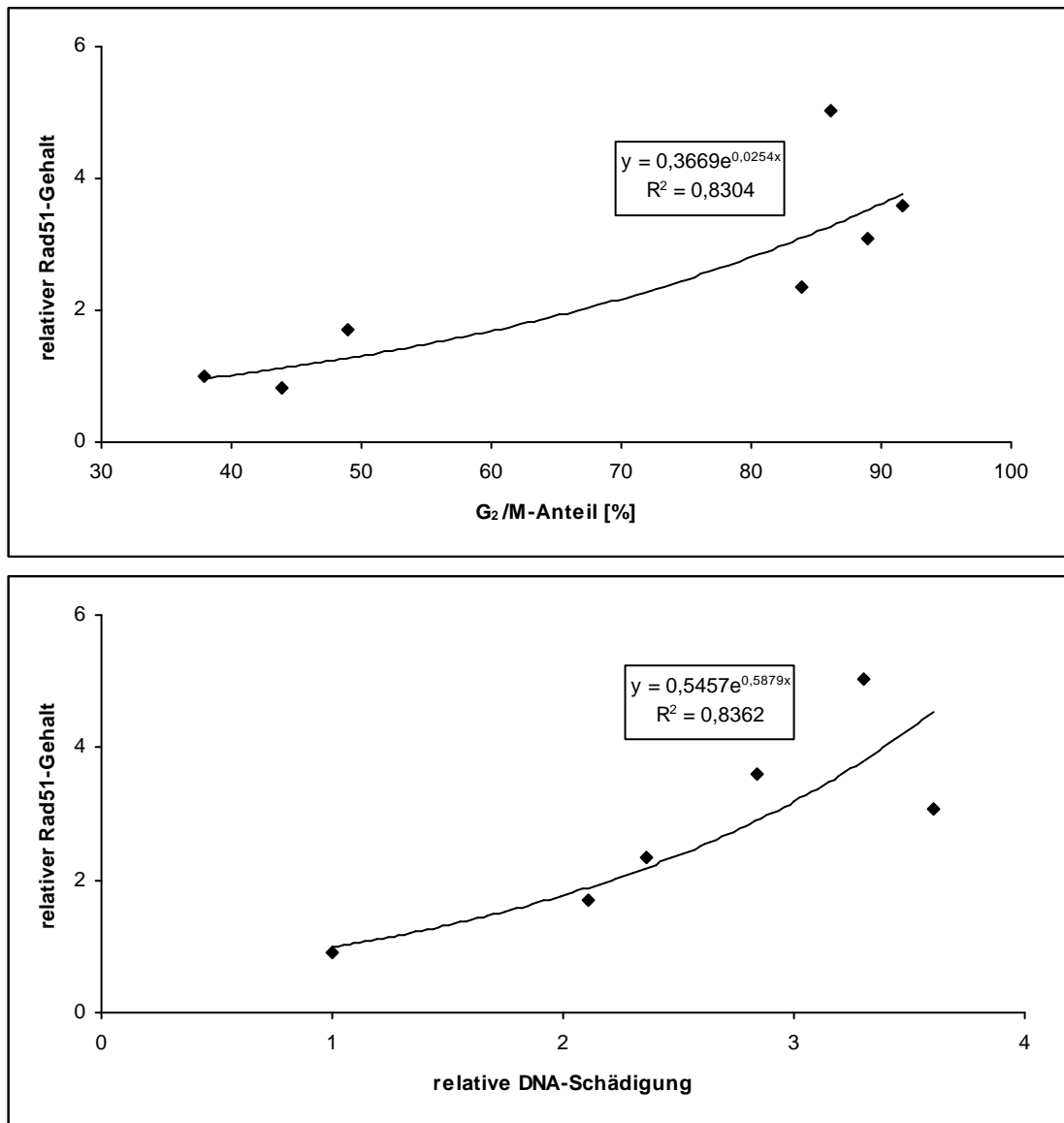
---

apoptotischen Zellen durch Caspase-3 und andere caspaseartige Proteasen abgebaut <sup>[77, 112]</sup>.

Der Gehalt der HR-Proteine Rad52 und Rad54 wurde ebenfalls nicht verändert, noch kam es hier während der Reparaturzeit zu einem Rückgang des Gehalts. Über einen Abbau von Rad52 und Rad54 während der Apoptose ist in der Literatur nichts bekannt. Allerdings wurde mehrfach über einen Caspase-3-vermittelten Abbau von Rad51 berichtet <sup>[95, 140, 141]</sup>. Dieser ließ sich im Rahmen der hier durchgeführten Experimente jedoch nicht beobachten. Stattdessen kam es durch die Inkubation mit DOX bzw. ETO sowohl nach einer als auch nach 24 Stunden zu einer deutlichen Zunahme des Rad51-Spiegels. Der Gehalt stieg auch nach Austausch des Mediums weiter an und erhöhte sich gegenüber Kontrollzellen auf das 1,7- bis 5-fache (Abbildung 3.18). Da die möglicherweise auf Apoptose zurückzuführende Abnahme der NHEJ-Proteine nur gering ausgefallen war, wäre eine Abnahme der Rad51-Proteine in der gleichen Größenordnung aufgrund der starken Induktion gar nicht zu bemerken. Hierbei ist anzumerken, dass Induktion und Abnahme von Rad51 möglicherweise in verschiedenen Zellpopulationen ablaufen. Auf die Untersuchung dieses Aspekts wurde jedoch verzichtet, da er für den weiteren Verlauf der Arbeit von untergeordneter Bedeutung war.

Die Zunahme des Rad51-Spiegels infolge DOX- bzw. ETO-Behandlung steht in Verbindung mit einigen in Abschnitt 4.1.2 diskutierten zellulären Effekten. Zum Einen besteht ein positiver Zusammenhang zwischen der Höhe des Rad51-Gehalts und dem Zellzyklusarrest in der G<sub>2</sub>/M-Phase <sup>[142]</sup>. Dieser ließ sich auch hier feststellen, wobei die Korrelation exponentiell und eher schwach ausgeprägt war. Gleiches gilt für die Korrelation zwischen Rad51 und der Strangbruchzahl (Abbildung 4.3). Interessanterweise gibt es bei letzterer keinen sprunghaften Anstieg des Rad51-Gehalts, wie er beim G<sub>2</sub>/M-Block und der Koloniezahl aufgetreten war. Demzufolge erfolgt die Induktion von Rad51 in Abhängigkeit von der Strangbruchzahl, während die Blockade des Zellzyklus durch weitere Faktoren beeinflusst wird.

## Diskussion



**Abbildung 4.3:** Exponentielle Korrelation zwischen dem Rad51-Gehalt und dem G<sub>2</sub>/M-Anteil 24 Stunden nach Ende der zytostatischen Behandlung (oben) bzw. der relativen DNA-Schädigung (unten).

Zum Anderen ist ein hoher Rad51-Spiegel mit der Induktion von Apoptose assoziiert <sup>[133, 143]</sup>. Der Grund hierfür könnte in der erhöhten Zahl von chromosomalen Veränderungen liegen, mit denen ein gesteigerter Rad51-Level assoziiert ist <sup>[144]</sup>. Ist hiervon ein essentielles Gen betroffen, so kommt es zum programmierten Zelltod <sup>[114, 125]</sup>. Ob Rad51 an sich die Apoptose fördert oder ob ein hoher Rad51-Spiegel und eine hohe Apoptoseinduktion lediglich die gleiche Ursache haben, ist nicht abschließend geklärt. In einer anderen Veröffentlichung wurde dagegen über einen Rad51-vermittelten

## Diskussion

---

Schutz vor ETO-induzierter Apoptose berichtet <sup>[145]</sup>. Die Erhöhung des Rad51-Spiegels könnte in diesem Zusammenhang den Versuch darstellen, NHEJ durch ein erhöhtes Angebot an HR-Proteinen am Doppelstrangbruch zurückzudrängen. Dass NHEJ bei einer großen Anzahl von Doppelstrangbrüchen negative Auswirkungen für die Zelle hat, lässt sich an meiotischen Zellen erkennen. Hier kommt es vor der Ausbildung der Strangbrüche zu einer drastischen Hemmung der Expression von Ku70, um die fehlerbehaftete Ligation der meiotischen Strangbrüche durch NHEJ zu verhindern <sup>[146]</sup>. Bei der Behandlung mit ETO treten die Strangbrüche jedoch unerwartet für die Zelle auf, so dass der Ku70-Gehalt nicht vorbereitend gesenkt werden kann. Eine Möglichkeit NHEJ zurückzudrängen ist daher, das Angebot an HR-Proteinen zu erhöhen <sup>[91]</sup>. Da außer bei der einstündigen Inkubation mit 10 µM ETO alle behandelten Ansätze nach acht Tagen rund 80 % tote Zellen aufwiesen und trotz erhöhtem Rad51-Spiegel einen Anstieg des apoptotischen Anteils zeigten, schien der hohe Rad51-Gehalt in den getesteten Konzentrationen keinen ausreichenden Schutz vor Apoptose zu bieten.

Die geringste Zunahme des Rad51-Spiegels war nach der einstündigen Behandlung mit 10 µM ETO zu verzeichnen, was mit den Ergebnissen der Zytotoxizitätstests und der Zellzyklusanalyse harmoniert. Zwar lag der Rad51-Spiegel hier 24 Stunden nach Mediumwechsel statistisch signifikant über dem Kontrollwert, aber auch signifikant unter dem durch 100 µM erreichten Gehalt (Abbildung 3.18). Das legt nahe, dass der durch 10 µM ETO induzierte DNA-Schaden weniger Überarbeitung durch HR benötigt, da er bereits durch NHEJ korrekt repariert wurde. Eine Publikation von Pastwa und Blasiak <sup>[147]</sup> zeigt, dass komplizierte DNA-Doppelstrangbrüche durch NHEJ häufiger fehlerhaft repariert werden als einfache DNA-Enden. Als kompliziert ist ein Doppelstrangbruch hierbei einzustufen, wenn die überhängenden DNA-Enden nicht komplementär sind oder weitere Schäden in den Nukleotiden aufweisen. Ein einfacher Doppelstrangbruch weist dagegen zwei gerade Enden oder komplementäre Überhänge auf. Da Topo II $\alpha$ -Inhibitoren vermutlich konzentrationsunabhängig komplementäre Überhänge einer Länge von vier Basen verursachen <sup>[34]</sup>, kann dies nicht der Grund für den beobachteten Unterschied sein. In Abschnitt 4.1.1.2 wurde jedoch bereits angesprochen, dass es im Comet-Assay nur eine begrenzte Linearität zwischen absoluter Strangbruchzahl und der über die

Kometenform ermittelten DNA-Schädigung gibt. Insofern ist möglich, dass der Unterschied in der Zahl der induzierten Strangbrüche zwischen 10 und 100  $\mu\text{M}$  ETO größer war als es der Comet Assay zum Ausdruck bringt. Da mit zunehmender Strangbruchzahl auch das Risiko steigt, nicht-komplementäre DNA-Enden zu verknüpfen, wäre die Wahrscheinlichkeit einer fehlerhaften Reparatur nach Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  ETO entsprechend erhöht, so dass mehr Rad51 benötigt wird.

### 4.1.3.2 Ausschaltung der an der DNA-Reparatur beteiligten Proteine

Unterschiedliche Veränderungen in der Reparaturkurve zeigten sich nach spezifischer Ausschaltung der zentralen Proteine Ku70 (NHEJ) und Rad51 (HR) mittels siRNA bzw. nach Inhibition des NHEJ-Proteins DNA-PK<sub>cs</sub> (Abschnitt 3.1.7.1). Ku70 und Rad51 sind für diese Untersuchung ideal, da sie jeweils von zentraler Bedeutung sind und die Reparatur Richtung NHEJ bzw. HR dirigieren<sup>[91]</sup>. Für die Behandlung wurden 250 nM DOX für 24 Stunden und 100  $\mu\text{M}$  ETO für eine Stunde gewählt, da untransfizierte Zellen nach diesen Inkubationsbedingungen eine ausgeprägte Reparatur des induzierten Schadens gezeigt hatten.

Die Inhibition der DNA-PK<sub>cs</sub> durch den spezifischen Inhibitor DMNB zeigte die Relevanz von NHEJ in der Reparatur DOX-induzierter Doppelstrangbrüche. Die initiale Reparatur in den ersten 1,5 Stunden nach Behandlung mit ETO zeigte sich dagegen unverändert (Abbildung 3.23). Ungeklärt blieb, warum es in den ETO-behandelten Zellen nach drei Stunden zu einer erneuten Zunahme des DNA-Schadens kam, da sich dieser weder auf das Lösungsmittel DMSO zurückführen ließ, noch wiesen die Zellen bei mikroskopischer Betrachtung Anzeichen von Apoptose oder Nekrose auf.

Bei der Untersuchung der transfizierten Zellen fiel auf, dass die Reparatur ETO-induzierter Doppelstrangbrüche sowohl nach Ausschalten von Ku70 als auch von Rad51 deutlich verlangsamt und weniger effizient erfolgte (Abbildung 3.26). Die Reparatur DOX-induzierter Strangbrüche zeigte sich hingegen nur nach Ku70-Knockdown verändert, wobei deutlich mehr Strangbrüche induziert, aber kaum noch repariert wurden. Warum der initiierte Schaden nach Ausschaltung von Ku70 nur bei Behandlung mit DOX stieg, aber nicht nach ETO-Behandlung<sup>[148]</sup>, ist unbekannt, kann aber möglicherweise auf die unterschiedlich langen Inkubationszeiten

## Diskussion

---

zurückgeführt werden. Nach Ausschaltung von Rad51 entsprach der Reparaturverlauf DOX-behandelter Zellen dagegen fast dem untransfizierter Zellen. Lediglich nach sechs und neun Stunden kam es in einem Ansatz zu einer verzögerten Reparatur (Abbildung 3.25). Das gleiche Phänomen zeigte sich nach Transfektion nicht-targetierender siRNA. Diese diente als Negativkontrolle und konnte außer in dem einen erwähnten DOX-Ansatz unspezifische Effekte des Transfektionsreagenzes oder der siRNA ausschließen (Abbildung 3.24). Als Grund für die verzögerte Reparatur des DOX-Schadens wird eine unerwünschte Senkung des Ku70-Spiegels durch die nicht-targetierende und die Rad51-siRNA vermutet. Dies liegt nahe, da sich Ku70 bereits im Vorversuch als relativ anfällig für einen unspezifischen Knockdown erwiesen hatte, zumindest verglichen mit Rad51 (Tabelle 3.2). Allerdings zeigte der Vorversuch auch, dass das Ausmaß der Expressionshemmung durch siRNA schwankte und die unspezifische Ku70-Senkung daher von Ansatz zu Ansatz variierte. Dies kann Schwankungen in den Ergebnissen der einzelnen Experimente erklären.

Die Ausschaltung von Ku70 und Rad51 hat also gezeigt, dass ETO-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche durch NHEJ und HR repariert werden. DOX-induzierte Strangbrüche werden hingegen vorwiegend durch NHEJ repariert. Das bedeutet, dass HR nach Behandlung mit DOX entweder nicht möglich oder nicht erwünscht ist. Obwohl NHEJ in höheren Eukaryonten als präferierter Reparaturweg von Doppelstrangbrüchen gilt<sup>[71, 72]</sup>, ist dieser Unterschied bislang in der Literatur nicht beschrieben worden. Angesichts der mehrfach erwähnten DNA-Interkalation von DOX<sup>[34-36]</sup> lässt sich jedoch spekulieren, dass ein Teil der interkalierten Moleküle bei Entstehung der Doppelstrangbrüche nicht aus der DNA freigesetzt wird und die entsprechende DNA aufgrund der sterischen Veränderung nicht für eine Reparatur durch HR zugänglich ist. Möglicherweise verhindert interkaliertes DOX die Invasion in das homologe Partnermolekül. Die einfache Ligation per NHEJ scheint dagegen nicht behindert zu werden. ETO beeinträchtigt die HR hingegen offenbar nicht, da es nur an Topo II $\alpha$  gebunden ist und daher im Rahmen des Topo II $\alpha$ -Abbaus mit entfernt wird<sup>[149]</sup>.

## Diskussion

---

Die Tatsache, dass die Ausschaltung von Ku70 im Gegensatz zur Hemmung von DNA-PK<sub>cs</sub> eine deutliche Verzögerung der Reparatur ETO-induzierter Strangbrüche mit sich brachte, kann unterschiedliche Gründe haben. Zum Einen lässt sich die Möglichkeit nicht ausschließen, dass die eingesetzte DMNB-Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  zu gering war, um DNA-PK<sub>cs</sub> ausreichend zu hemmen und einen Effekt bei der Reparatur der ETO-induzierten Strangbrüche beobachten zu können. Da jedoch bei mit DOX behandelten Zellen bereits eine Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  einen Effekt zeigte und die IC<sub>50</sub> von 15  $\mu\text{M}$  (ermittelt am isolierten Enzym)<sup>[119]</sup> um das 33-fache überschritten wird, ist diese Möglichkeit unwahrscheinlich. Zum Anderen spricht dieser Unterschied für die Existenz eines DNA-PK<sub>cs</sub>-abhängigen und eines -unabhängigen NHEJ-Weges, wie er von Adachi und Kollegen<sup>[150]</sup> postuliert wurde. Diese begründen ihre Theorie mit der Beobachtung, dass sich DNA-PK<sub>cs</sub><sup>-/-</sup>-Zellen gegenüber einer Inkubation mit ETO als weniger sensitiv erwiesen als Ku70- und Ku86-defiziente Zellen. Bei Inkubation mit ICRF-193, einem katalytischen Topo II $\alpha$ -Inhibitor der ebenfalls DNA-Doppelstrangbrüche induziert, waren hingegen alle Zellen sensitiv<sup>[148, 150]</sup>. Da die durch ICRF-193 ausgelösten Strangbrüche vor Ligation modifiziert werden müssen, schlussfolgern Adachi et al., dass der DNA-PK<sub>cs</sub>-unabhängige Weg nur benutzt werden kann wenn eine Ligation des Doppelstrangbruchs ohne vorherige Überarbeitung möglich ist. Dass Ku unabhängig von DNA-PK<sub>cs</sub> arbeiten kann, gilt mittlerweile als gesichert<sup>[148]</sup>. Diese Theorie deckt sich mit den Ergebnissen der HT-29-Zellen. Denn während ETO-induzierte Strangbrüche hier nach DNA-PK<sub>cs</sub>-Inhibition schneller repariert wurden als nach Ku70-Ausschaltung, wurden DOX-induzierte Strangbrüche in beiden Fällen verlangsamt repariert. Wenn die Theorie von Adachi et al. korrekt ist, zeigt dies, dass durch DOX ausgelöste Strangbrüche aufgrund der Interkalation vor Abschluss der Ligation überarbeitet werden müssen. Ihre Reparatur durch NHEJ ist daher DNA-PK<sub>cs</sub>-abhängig. ETO-induzierte Strangbrüche könnten dagegen teilweise ohne Modifizierung ligiert werden und wären somit nicht auf DNA-PK<sub>cs</sub> angewiesen.

## Diskussion

---

Wie aber wird die Sensitivität der HT-29-Zellen durch die Ausschaltung der drei Proteine beeinflusst? Als Maß hierfür diene das Koloniebildungsvermögen der behandelten Zellen. Vorab sei erwähnt, dass die Koloniezahl durch die Hemmung oder Ausschaltung von DNA-PK<sub>cs</sub>, Ku70 und Rad51 an sich gesenkt wurde, das heißt auch in Kontrollzellen (Abbildung 3.29 oben). Statistisch signifikant war dieser Effekt nur bei Rad51-siRNA und DNA-PK<sub>cs</sub>-Hemmung. Wie eine Zeitreihe mit Kontroll-siRNA zeigen konnte, ist die Abnahme der Koloniezahl nicht auf unspezifische Toxizität durch das Transfektionsreagenz oder die siRNA zurückzuführen. Zwar kam es bei Kontroll-siRNA ebenfalls zu einer Abnahme der Koloniezahl, aber in abgeschwächter Form (Abbildung 3.30). Grund könnte erneut eine Senkung des Ku70-Spiegels sein. Die vor allem nach Rad51-Knockdown verminderte Koloniebildung stimmt mit den Ergebnissen, die mit NHEJ- und Rad51-defekten Zellen und Mäusen erhalten wurden, überein und unterstützt die essentielle Bedeutung von Rad51 für den Erhalt der Chromosomenstabilität<sup>[71, 77, 87]</sup>. Wurden die HT-29-Zellen zusätzlich zur Ausschaltung von Ku70 mit DOX und ETO behandelt, sank die Koloniezahl weiter. Das Ausmaß unterschied sich jedoch kaum von dem untransfizierter Zellen. Das heißt, dass Ku70 zwar für die Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche benötigt wird, aber keinen Einfluss auf die Sensitivität hat. Dies steht im Widerspruch zu in der Literatur gefundenen Beobachtungen, die eine Erhöhung der zellulären Sensitivität gegenüber  $\gamma$ -Strahlung und ETO beschreiben. Allerdings erfolgte diese Untersuchung an HeLa- und HCT116-Zellen. Der Einfluss auf die Sensitivität hing dort zudem stark von der Transfektionsdauer ab<sup>[111]</sup>. Die Inhibierung von DNA-PK<sub>cs</sub> führte ebenfalls zu einer Senkung der Koloniebildung. Der Einfluss auf die EC<sub>50</sub> variierte allerdings. Während diese für die 24-stündige ETO-Behandlung sank, erhöhte sich die EC<sub>50</sub> der einstündigen Behandlung. Die EC<sub>50</sub> für 24 Stunden DOX blieb unverändert (Tabelle 3.4). Da die Änderungen somit weder substanzspezifisch waren noch von der Inkubationsdauer abhingen, wird angenommen, dass die Variationen nur durch die Toxizität von DMNB<sup>[119]</sup> entstanden sind. Die Hemmung der DNA-PK<sub>cs</sub> hatte somit keinen Einfluss auf die Sensitivität der HT-29-Zellen, wie bereits von Hansen et al. vermutet<sup>[101]</sup>. Auch hier lassen sich in der Literatur gegenteilige Berichte finden, die jedoch mit anderen Zelllinien durchgeführt wurden und sich meistens auf die Radiosensitivität beziehen. Die Hemmung der DNA-PK<sub>cs</sub>



## Diskussion

---

erfolgte dort zudem durch die Inhibitoren Wortmannin und NU7026 oder durch siRNA<sup>[151-153]</sup>. Die Untersuchung von humanen Lymphoblasten bestätigte daneben die oben genannte Theorie von Hansen et al. und unterstützt somit die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit<sup>[153]</sup>.

Bei Rad51-Knockdown kam es dagegen nach allen Behandlungen zu einer deutlichen Abnahme der Koloniezahl, die nur bei 24 Stunden ETO keine statistische Signifikanz aufwies (Abbildung 3.29 oben). Grund für Letzteres war die schwankende Koloniezahl der untransfizierten, mit ETO behandelten Zellen. Durch die Ausschaltung von Rad51 werden also weniger Kolonien gebildet. Das bedeutet, dass Rad51 Resistenz vermittelt, obwohl die Reparatur der Strangbrüche durch die Ausschaltung nicht beeinflusst wird<sup>[139]</sup>. Bei Vergleich der Koloniezahl unbehandelter und behandelter Rad51-Knockdownzellen ist dagegen festzustellen, dass ihre Anzahl zwar vermindert, der zytostatische Effekt von DOX und ETO gegenüber der Kontrolle jedoch verloren gegangen ist (Abbildung 3.29 unten). Auch nach Transfektion von Ku70- und Kontroll-siRNA ist der Effekt leicht vermindert, was auf Senkung von Rad51 beruhen könnte. Das hieße, dass Rad51 zelluläre Sensitivität vermitteln würde, was allerdings den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen widersprechen würde. Eine Senkung des Rad51-Spiegels steht dort immer in Verbindung mit einer erhöhten zellulären Sensitivität gegenüber ETO oder Bestrahlung, egal ob Rad51 durch siRNA<sup>[154]</sup> oder Antisense-Oligonukleotide<sup>[101]</sup> gesenkt oder Zellen mit unterschiedlichem Rad51-Gehalt verglichen wurden<sup>[101, 133]</sup>. Die einzige Beobachtung, die für Rad51 als Teil des Wirkmechanismus spricht, ist die Tatsache, dass es an der Entstehung von Schwesterchromatidaustauschen beteiligt ist<sup>[83, 155]</sup>, die wiederum mit der Zytotoxizität korrelieren<sup>[114, 125]</sup>. Denkbar ist, dass der Rad51-Knockdown bereits so toxisch ist, dass die Zytostatika dagegen kaum ins Gewicht fallen. Dagegen spricht jedoch, dass die Koloniezahl deutlich über null liegt. Allerdings lässt sich eine einfache Erklärung für den vermeintlichen Verlust der zytostatischen Wirkung finden. Wie in Abschnitt 3.1.6 festgestellt wurde, induziert die Inkubation mit DOX und ETO einen Anstieg des Rad51-Gehalts. Folglich dürfte dies auch in Rad51-Knockdownzellen geschehen. Da die siRNA-Transfektion aufgrund ihrer Toxizität nicht über die Dauer des Colony Formation Assays erfolgen kann, wird das Ausmaß der Rad51-Ausschaltung durch die Induktion

## Diskussion

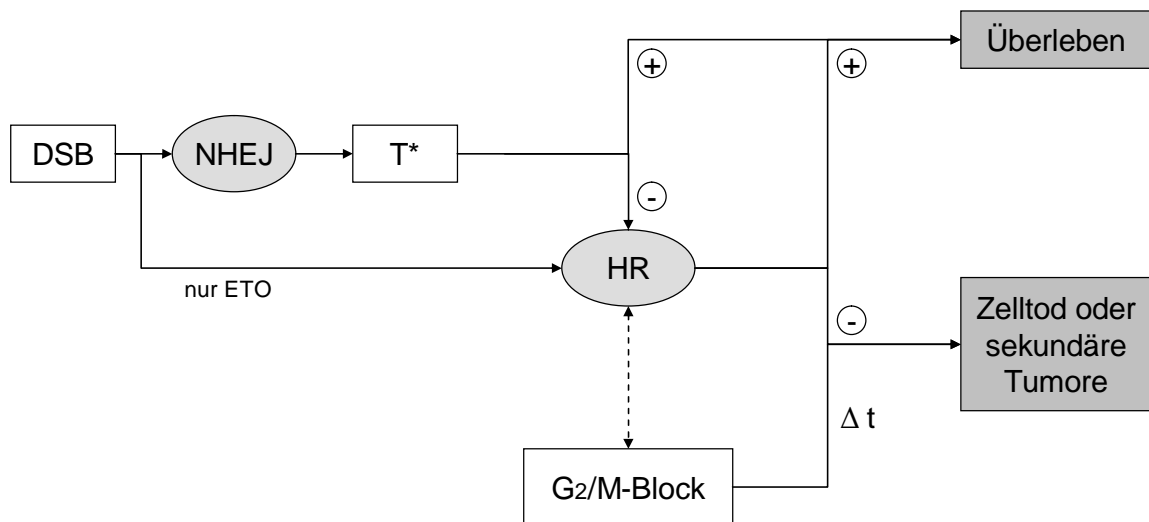
---

abgeschwächt. In den unbehandelten Kontrollzellen wird dagegen kein Rad51 induziert, daher liegt dessen Spiegel dort unter dem der behandelten Zellen. Den Ansätzen liegen also unterschiedliche Rad51-Spiegel zu Grunde, so dass sich die Koloniezahl der behandelten Zellen nicht mit der der unbehandelten Zellen vergleichen lässt.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Ausschaltung von DNA-PK<sub>cs</sub> und Ku70 zwar eine verlangsamte Reparatur der DOX- und ETO-induzierten Doppelstrangbrüche bewirkte, aber keinen Einfluss auf die Sensitivität hatte. Rad51-Knockdown hatte dagegen keinen oder kaum Auswirkungen auf den Reparaturverlauf, vermittelte jedoch Resistenz. Somit ist NHEJ offenbar wichtig für die schnelle Reparatur des DNA-Schadens, HR jedoch entscheidend für das Überleben. Diese Hypothese wurde bereits von Hansen und Kollegen<sup>[101]</sup> aufgestellt. Diese fanden in SCLC-Zellen eine positive Korrelation zwischen Rad51-Spiegel und Resistenz gegen ETO, wohingegen DNA-PK<sub>cs</sub> zwar die Strangbrüche reparierte, aber keine Auswirkungen auf die Sensitivität hatte.

### 4.1.4 Modell zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

In Zusammenfassung der an der HT-29-Zelllinie erhaltenen Ergebnisse lässt sich folgender Mechanismus zur Reparatur von Topo II $\alpha$ -Inhibitor-induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen postulieren (Abbildung 4.3):



**Abbildung 4.3:** Schematische Darstellung der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen. Ein + steht für eine erfolgreiche Reparatur, - für Fehler in der DNA. Das Reparaturzeitfenster wurde mit  $\Delta t$  abgekürzt und DNA-Doppelstrangbrüche sind als DSB bezeichnet. T\* bezeichnet den temporären Zustand der durch NHEJ ligierten Doppelstrangbrüche. Weitere Erläuterungen erfolgen im Text.

Wie eine Untersuchung von Rapp und Greulich<sup>[156]</sup> aus dem Jahr 2004 zeigt, wird der DNA-Doppelstrangbruch zunächst durch das phosphorylierte Histon  $\gamma$ -H2AX markiert. In der Folge werden der Mre11/Rad50/Nbs1-Komplex, der die DNA-Enden zurechtschneiden kann, und DNA-PK<sub>cs</sub> rekrutiert, wodurch die Reparatur durch NHEJ in Gang gesetzt wird. Die Bindung von Ku wurde im Rahmen der oben erwähnten Arbeit nicht untersucht. Allerdings ist bekannt, dass die Ku-Proteine vor DNA-PK<sub>cs</sub> an die DNA binden<sup>[72]</sup>. Der Abschluss der Ligation erfolgt durch Xrcc4 und Ligase IV<sup>[77]</sup>. Xrcc4 verbleibt allerdings wie  $\gamma$ -H2AX über mehrere Stunden an der Stelle des ehemaligen Doppelstrangbruchs<sup>[156]</sup>. Beide sind daher potentielle Kandidaten zur Markierung des von Iliakis und Wang<sup>[73, 79]</sup> postulierten temporären Zustands T\*, der nach NHEJ-vermittelter Ligation des Doppelstrangbruchs entsteht. Durch die Markierung kann der betroffene

## Diskussion

---

DNA-Abschnitt auf Richtigkeit überprüft und eventuell durch HR überarbeitet werden, da NHEJ zwar eine schnelle Reparatur garantiert<sup>[73]</sup>, aber aufgrund des Mechanismus relativ fehlerträchtig ist<sup>[72]</sup>. Ob die Überprüfung der DNA durch Proteine des HR selbst durchgeführt wird oder andere Mechanismen daran beteiligt sind, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen. Sollte bei der Überprüfung des Schadens festgestellt werden, dass die Reparatur durch NHEJ erfolgreich war, überlebt die Zelle. Dies war offenbar nach der einstündigen Behandlung mit 10  $\mu$ M ETO größtenteils der Fall. Enthält der markierte DNA-Abschnitt jedoch Fehler, kommt es zu einer Reparatur durch HR. Ebenso können ETO-induzierte Strangbrüche abweichend von der beschriebenen Abfolge auch sofort durch HR repariert werden, da ETO im Gegensatz zu DOX nicht in die DNA interkaliert<sup>[34-36]</sup>. Die HR wird durch Bindung von Rad51 und Rad52 initiiert<sup>[156]</sup> und durch die Blockade des Zellzyklus in der G<sub>2</sub>/M-Phase sowie eine erhöhte Expression von Rad51 unterstützt. Repariert die HR die DNA erfolgreich, so überlebt die Zelle. Sollte die HR den Schaden jedoch fehlerhaft reparieren bzw. sollte der Schaden innerhalb eines noch näher zu bestimmenden Zeitfensters  $\Delta t$  nicht reparierbar sein, so wird der G<sub>2</sub>/M-Block beibehalten und der programmierte Zelltod induziert. Dies war bei den langen oder hochdosierten Behandlungen mit DOX und ETO der Fall. Die HT-29-Zellen haben sich also trotz DNA-Reparaturmechanismen gegenüber den meisten getesteten Konzentrationen als sensitiv erwiesen. Wie die Korrelation von G<sub>2</sub>/M-Anteil und Koloniebildung zeigte, scheint der G<sub>2</sub>/M-Block dabei von zentraler Bedeutung für die zytostatische Wirkung zu sein.

Darüber hinaus ist lange bekannt, dass es nach Behandlung mit Topo II $\alpha$ -Inhibitoren zu sekundären Tumoren kommen kann<sup>[157]</sup>. Dies könnte dadurch zustande kommen, dass die lebenswichtigen Sequenzen im zellulären Genom zwar korrekt repariert wurden, in anderen Bereichen jedoch Fehler vorliegen. So könnte die Zelle den DNA-Schaden zwar überleben, aufgrund der Mutationen jedoch später Sekundärtumore bilden.

### 4.2 DNA-Reparatur und Resistenz in primären Zellen

Die Ergebnisse der Versuche an HT-29-Zellen haben gezeigt, dass die Reparatur der durch DOX und ETO induzierten DNA-Doppelstrangbrüche die zelluläre Sensitivität gegenüber den Substanzen verringert. Dies wurde insbesondere durch das HR-Protein Rad51 vermittelt. Daher stellt sich die Frage, inwieweit die beschriebenen Mechanismen Auswirkungen auf den klinischen Erfolg der Therapie haben und ob die Reparatur der Doppelstrangbrüche einen verbreiteten Resistenzmechanismus darstellt. Hierzu gibt es zur Zeit nur wenige publizierte Untersuchungen. Zwar weisen viele Tumorzellen einen erhöhten Rad51-Spiegel auf<sup>[120, 142, 144]</sup>, doch besitzen viele Zelllinien, die gegenüber Topo II $\alpha$ -Inhibitoren resistent sind, mehr als einen Resistenzmechanismus<sup>[158]</sup>. Daher ist unklar, ob die Bestimmung des Rad51-Gehalts tatsächlich ein guter prognostischer Marker für eine erfolgreiche Tumorthherapie mit Topo II $\alpha$ -Inhibitoren ist, wie von Henning und Stürzbecher<sup>[142]</sup> behauptet, oder ob die HR-vermittelte Resistenz nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Um diesen Aspekt näher zu beleuchten, wurden primäre Zellen von Tumorpatienten hinsichtlich DNA-Reparatur und Sensitivität untersucht. Die primären Zellen wurden aus der Ascitesflüssigkeit zweier Kolonkarzinom-Patienten gewonnen. Asciteszellen sind für diese Untersuchung besonders geeignet, da sie häufig eine verringerte Sensitivität gegenüber Zytostatika aufweisen<sup>[16, 17]</sup>. Diese entsteht zum Einen durch genetische Instabilität, zum Anderen kann sie auf den durch die Therapie entstandenen Selektionsdruck zurückgeführt werden<sup>[17]</sup>. Die Zellen der Ascites-Linie 1 wurden einem Patienten entnommen, der zum Zeitpunkt der Punktion noch keine antiproliferative Therapie bekommen hatte. Die Zellen der Linie 2 entstammen der Ascitesflüssigkeit einer Patientin, die bereits eine Behandlung mit 5-Fluorouracil, Irinotecan und Folsäure erhalten hatte. Die Untersuchung ermöglicht also den Vergleich zwischen Zellen, die mit und ohne Selektionsdruck metastasiert sind.

Der Vergleich des Reparaturverlaufs nach Behandlung mit 250 und 750 nM DOX über 24 Stunden mit dem der HT-29-Zellen ergab, dass in beiden Ascites-Linien weniger Doppelstrangbrüche induziert wurden. Diese wurden in den Ascites-1-Zellen zudem schneller entfernt. In der Ascites-2-

## Diskussion

---

Linie kam es zu einer Verschiebung des kompletten Verlaufs (Abschnitt 3.2.1). Ein Grund für die geringere Zahl induzierter Strangbrüche war im Falle der Ascites-1-Zellen ein geringerer intrazellulärer DOX-Gehalt verglichen mit HT-29. Dies begünstigte auch einen schnellen Rückgang der Strangbruchzahl nach Inkubationsende, da durch die verringerte Zahl interkalierter DOX-Moleküle weniger neue Strangbrüche entstanden. Der niedrigere DOX-Gehalt könnte zum Beispiel auf eine Überexpression von P-gp oder anderen MDR-assoziierten Proteinen zurückzuführen sein<sup>[107]</sup>. Dies wurde jedoch nicht untersucht, da der Schwerpunkt der Arbeit auf der Untersuchung der DNA-Reparaturmechanismen lag. Ob Ascites-2-Zellen ebenfalls durch eine Verringerung des DOX-Gehaltes gekennzeichnet waren, ließ sich nicht feststellen, da die Linie nur äußerst langsam proliferierte (Verdoppelungszeit 14 Tage). Daher stand nicht genügend Zellmaterial für eine Untersuchung zur Verfügung. Die langsame Proliferation könnte jedoch der Grund für den gegenüber HT-29 verschobenen Reparaturverlauf sein. Da Doppelstrangbrüche nach Behandlung mit DOX erst entstehen, wenn Topo II $\alpha$  auf ein interkaliertes Molekül trifft<sup>[34-36]</sup> und der fixierte Cleavage Complex durch die Replikations- oder Transkriptionsmaschinerie von der DNA gelöst wird<sup>[27, 37]</sup>, sind deren Anzahl und die Geschwindigkeit mit der sie gebildet werden von der Replikation und Transkription abhängig. Diese sind bei langsamer Proliferation jedoch herabgesetzt, so dass die Kurve gegenüber den schnell proliferierenden HT-29- und Ascites-1-Zellen verzögert verläuft.

Ein weiterer Grund für eine geringere Induktion von Doppelstrangbrüchen könnte ein verminderter Topo II $\alpha$ -Gehalt sein. Dieser war bei Ascites-1-Zellen um 50 % reduziert (Abschnitt 3.2.3). Bei Ascites-2-Zellen konnte er aus den oben genannten Gründen nicht bestimmt werden. Die quantitative Abnahme von Topo II $\alpha$  ist ein Mechanismus, der zur Ausbildung von at-MDR führt<sup>[27, 107]</sup>. Ob die verringerte Zahl von Topo II $\alpha$ -Molekülen jedoch tatsächlich ein Grund für die verringerte Strangbruchzahl nach DOX-Inkubation ist, bleibt fraglich, da die Zahl der Strangbrüche nach einstündiger Behandlung mit 100  $\mu$ M ETO gegenüber HT-29 erhöht anstatt erniedrigt war. Allerdings wurde der ETO-induzierte DNA-Schaden in beiden Ascites-Linien in den ersten 60 Minuten nach Inkubationsende erheblich schneller repariert (Abschnitt 3.2.1).

## Diskussion

---

Daher wurde erwartet, dass die Ascites-Zellen einen erhöhten Gehalt von NHEJ- und/oder HR-Proteinen aufweisen. Wie die relative Quantifizierung der Reparaturproteine unbehandelter Zellen zeigte, war jedoch das Gegenteil der Fall. Ascites-1-Zellen waren durch einen statistisch signifikant niedrigeren Gehalt von Rad51 und Rad52 gekennzeichnet. Ascites-2-Zellen besaßen signifikant weniger Rad51, DNA-PK<sub>cs</sub>, Ku70 und Ku86. Dabei könnte der niedrige Rad51-Gehalt mit der langsamen Proliferation der Ascites-2-Zellen in Verbindung stehen, da Rad51 vor allem in der späten S- und G<sub>2</sub>-Phase gebildet wird<sup>[84]</sup>. Dies trifft jedoch nicht auf die NHEJ-Proteine zu. Der Gehalt der anderen untersuchten Reparaturproteine war unverändert (Abschnitt 3.2.3). Dieses Ergebnis ist erstaunlich, da vor allem bei Ascites-2 die Reparatur der ETO-induzierten Strangbrüche beschleunigt war, wohingegen die zentralen HR- und NHEJ-Proteine gegenüber HT-29 vermindert vorlagen. Die Anzahl der Strangbrüche war dagegen unverändert, so dass ein Einfluss von P-gp oder Topo II $\alpha$  auf den Reparaturverlauf ausgeschlossen wird. Die Möglichkeit, dass die DNA-Reparatur in den Asciteszellen durch das von Iliakis und Wang<sup>[73, 79]</sup> postulierte B-NHEJ erfolgt, erscheint ebenfalls unwahrscheinlich, da B-NHEJ mit einer Halbwertszeit von 2 bis 10 Stunden operiert. Das DNA-PK<sub>cs</sub>-abhängige D-NHEJ besitzt hingegen eine Halbwertszeit von nur 10 bis 30 Minuten. Die Gründe warum die ETO-vermittelten Doppelstrangbrüche in den Asciteszellen schneller entfernt werden, bleiben daher unklar. Möglicherweise erfolgt die Erkennung der Doppelstrangbrüche in den Asciteszellen schneller, was außer an ATM und ATR auch an einer posttranslationalen Veränderung von DNA-PK<sub>cs</sub> liegen könnte.

Trotz des im Vergleich zu HT-29 verringerten intrazellulären Gehalts an NHEJ- und HR-Proteinen zeigten die Asciteszellen im Colony Formation Assay eine höhere Resistenz gegenüber DOX und ETO. Diese war besonders bei den Ascites-2-Zellen sowie bei Behandlung mit DOX ausgeprägt (Abschnitt 3.2.4.1). Betrachtet man den Reparaturverlauf nach DOX-Behandlung, so war Letzteres zu erwarten. Allerdings ist die verminderte Sensitivität gegenüber DOX hier nicht auf eine veränderte Reparatur, sondern auf MDR oder at-MDR zurückzuführen. Die erhöhte Resistenz gegenüber ETO könnte dagegen mit einer beschleunigten Reparatur der Doppelstrangbrüche in Verbindung stehen. Diese scheint jedoch unabhängig

## Diskussion

---

vom DNA-PK<sub>cs</sub>-abhängigen D-NHEJ und von HR zu sein, da die zentralen Proteine der beiden Reparaturwege vor allem in den besonders resistenten Ascites-2-Zellen vermindert vorlagen. Die Koloniebildung zeigte zudem, dass die Zellen der Ascites-2-Linie resistenter gegenüber DOX und ETO waren als die der unbehandelten Ascites-1-Linie. Dies war einerseits zu erwarten, da die Ascites-2-Zellen bereits dem Selektionsdruck einer zytostatischen Behandlung ausgesetzt waren. Andererseits ist es erstaunlich, da die Therapie keine Topo II $\alpha$ -Inhibitoren beinhaltet hatte.

Durch Färbung mit Annexin V und Propidiumiodid wurde zudem der Ablauf des Zelltods in den ersten 24 Stunden nach Behandlung der Ascites-1-Zellen untersucht. Dieser zeigte sich nach einstündiger Behandlung mit 100  $\mu$ M ETO gegenüber HT-29 unverändert, wies allerdings eine höhere Grundschädigung der unbehandelten Kontrollzellen auf. Diese beruht vermutlich darauf, dass Ascites-1-Zellen im Gegensatz zu HT-29 nicht-adhären sind und tote Zellen daher nicht abgesaugt, sondern mit erfasst wurden. Nach Behandlung mit 250 nM DOX blieb der Anteil toter Zellen in den ersten sechs Stunden unter dem der HT-29-Zellen, was mit der höheren Resistenz korreliert. Nach 750 nM DOX lag der Anteil dagegen über dem von HT-29. Dies lässt sich ebenfalls damit erklären, dass die HT-29-Zellen mit der größten Schädigung nicht erfasst wurden, da sie sich von der Platte gelöst hatten und bei der Aufarbeitung verworfen wurden. Die Zahl der toten Zellen ist bei Ascites-1 daher nur scheinbar höher. Die Tatsache, dass bei den Ascites-1-Zellen auch alle toten Zellen mit erfasst werden und trotzdem ein Rückgang der Schädigung im Comet-Assay zu verzeichnen ist, zeigt, dass dieser ebenfalls durch Reparaturmechanismen bedingt sein muss.

Im Vergleich mit den HT-29-Zellen lässt sich zusammenfassen, dass die untersuchten primären Zellen eine erhöhte Resistenz gegenüber Topo II $\alpha$ -Inhibitoren aufwiesen. Der verringerte Gehalt an NHEJ- und HR-Proteinen stimmte jedoch nicht mit den Ergebnissen der HT-29-Zellen überein. Die Schlussfolgerung lautet daher, dass der Gehalt an DNA-Reparaturproteinen (vor allem an Rad51) zwar einen Einfluss auf die zelluläre Resistenz von soliden Tumoren gegenüber Topo II $\alpha$ -Inhibitoren hat, ihr Einfluss in der klinischen Praxis jedoch von untergeordneter Bedeutung ist, da der Effekt durch andere Resistenzmechanismen überlagert wird. Selbstverständlich erlaubt das Kollektiv von zwei Patienten keine Verallgemeinerung, so dass



## Diskussion

---

der Zusammenhang zwischen Resistenz, DNA-Reparatur und anderen Resistenzmechanismen an einer größeren Patientengruppe weiter untersucht werden muss. Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge scheint es nur bedingt möglich, anhand des Rad51-Spiegels oder anderer Reparaturproteine eines Tumors mögliche Resistenzen vorherzusagen. Unberücksichtigt blieben hier der Zusammenhang zwischen Proteingehalt und -funktion, sowie weitere Elemente der Signalkette wie Strangbrucherkenkung und G<sub>2</sub>/M-Block, so dass über deren Bedeutung keine Aussage gemacht werden kann. Jedoch scheint ein niedriger Rad51-Spiegel alleine kein Garant für eine erfolgreiche Therapie zu sein. Kombiniert mit P-gp- und Topo II $\alpha$ -Expression sollte es jedoch möglich sein, einen Test zu entwickeln, mit dessen Hilfe das Ansprechen eines Tumors auf Topo II $\alpha$ -Inhibitoren *in vitro* simuliert werden kann. Zudem scheint die Senkung des Rad51-Spiegels durch therapeutische Anwendung von Inhibitoren oder Antisense-Strategien ein guter Ansatz zu sein, das Ansprechen resistenter Tumore mit hohem Rad51-Gehalt zu verbessern <sup>[142]</sup>.

### 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, inwieweit die DNA-Reparatur eine Bedeutung für die Resistenzentwicklung von soliden Tumoren gegenüber Topo II $\alpha$ -Inhibitoren hat. Die Untersuchung erfolgte *in vitro* an Kolonkarzinomzellen der Linie HT-29 und primären Zellen aus der Ascitesflüssigkeit zweier Tumorpatienten. Als Modellsubstanzen wurden DOX und ETO verwendet, die in Anlehnung an in verschiedenen Therapieprotokollen erreichte Plasmaspiegel in unterschiedlichen Konzentrationen und über verschiedene Zeiten eingesetzt wurden.

Die Ergebnisse bestätigten, dass DOX und ETO DNA-Doppelstrangbrüche induzieren. Weitere Effekte der Behandlung waren eine dauerhafte Blockade des Zellzyklus in der G<sub>2</sub>/M-Phase, die Erhöhung des Rad51-Spiegels, die Reparatur der Strangbrüche sowie die Induktion des programmierten Zelltods. Infolge der beschriebenen Effekte war die Koloniebildung der HT-29-Zellen inhibiert, wobei eine negative Korrelation mit dem Anteil der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus 24 Stunden nach der zytostatischen Behandlung bestand. Daher wird postuliert, dass die Entscheidung über das Schicksal der Zelle in diesen ersten 24 Stunden fällt. Eine Sonderrolle nahm die Behandlung mit ETO in niedriger Konzentration und für kurze Zeit ein. Hierdurch wurde weder der Zellzyklus blockiert noch das Koloniewachstum gehemmt, obwohl sich die Höhe des DNA-Schadens und der Reparaturverlauf nicht von der Behandlung mit zehnfach höherer ETO-Konzentration unterschieden. Es wird daher angenommen, dass der Zellzyklusarrest außer durch die Zahl der Doppelstrangbrüche von weiteren Faktoren beeinflusst wird.

Zudem wurde gezeigt, dass die Reparatur der durch DOX induzierten Doppelstrangbrüche aufgrund der Interkalation der Substanz in die DNA langsamer erfolgte als die der ETO-vermittelten Strangbrüche. Durch die spezifische Ausschaltung der NHEJ-Proteine DNA-PK<sub>cs</sub> und Ku70 sowie des zentralen HR-Proteins Rad51 konnte gezeigt werden, dass die NHEJ-Proteine für eine schnelle Reparatur des induzierten Schadens benötigt werden. Das zelluläre Überleben ist jedoch an Rad51 gebunden. Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse wurde daher ein Reparaturmechanismus

## Zusammenfassung

---

postuliert, bei dem die Doppelstrangbrüche zur schnellen Entfernung zunächst durch NHEJ ligiert werden, aufgrund von Fehlern aber anschließend durch HR überarbeitet werden müssen. Dafür spricht auch, dass die Blockade des Zellzyklus über mehrere Tage bestehen bleibt, obwohl die Entfernung der Strangbrüche wenige Stunden nach Ende der Inkubation augenscheinlich abgeschlossen ist.

Die Untersuchungen an der HT-29-Linie zeigten also, dass Rad51 Resistenz vermittelt. Durch Vergleich mit den Asciteszellen deutete sich jedoch an, dass dieser Aspekt in der klinischen Praxis von untergeordneter Bedeutung ist. Hier scheinen eher MDR und at-MDR von Bedeutung zu sein. Aufgrund des kleinen Patientenkollektivs bedarf es jedoch weiterer Versuche, um diese Frage abschließend zu klären. Zudem muss getestet werden, ob die Sensitivität eines Tumors gegenüber Topo II $\alpha$ -Inhibitoren durch Quantifizierung von Rad51, P-gp und Topo II $\alpha$  prognostiziert werden kann. Mit Hilfe eines solchen Tests wäre es möglich, Tumorzellen vor Beginn einer Therapie auf Resistenzen zu untersuchen und dem Patienten so eine erfolglose, aber mit Nebenwirkungen behaftete Behandlung ersparen zu können. In resistenten Tumoren mit hohem Rad51-Gehalt scheint zudem die Senkung des Rad51-Spiegels durch therapeutische Anwendung von Antisense-Strategien und spezifischen Inhibitoren ein viel versprechender Ansatz zu sein, das Ansprechen des Tumors zu verbessern.

Die vorliegende Arbeit hat somit gezeigt, dass molekulare Vorgänge wie DNA-Reparatur und Zellzyklusblockade, die nach der Entstehung der Doppelstrangbrüche einsetzen, die Sensitivität von soliden Tumoren gegenüber Topo II $\alpha$ -Inhibitoren beeinflussen. Wie groß die klinische Bedeutung dieser Mechanismen ist, muss sich in Zukunft zeigen.

### 6 Summary

The present work focuses on the question whether the repair of DNA double-strand breaks has an influence on the sensitivity of solid tumours against topoisomerase II $\alpha$ -inhibitors. The study was carried out *in vitro* using the colon carcinoma cell line HT-29 and primary cells from two patients' ascites. The substances chosen for treatment were DOX and ETO and the exposure conditions were set according to the concentrations and times that are achieved in patients' plasma levels.

The results confirmed the DNA strand-breaking qualities of DOX and ETO. Additionally, the substances induced cell cycle arrest during G<sub>2</sub>/M-phase, expression of Rad51, repair of strand-breaks and programmed cell death. As a result, colony formation of HT-29-cells was abrogated with a negative correlation between the number of colonies and the amount of cells in the G<sub>2</sub>/M-phase of the cell cycle 24 hours after incubation. This indicates that the decision about the cell's fate is being made during the first 24 hours. A slightly different reaction was observed in cells that had been incubated with a low concentration of ETO for a short time. Here, neither cell cycle arrest nor reduced colony formation were detectable, although the amount and repair of DNA damage did not differ from that of cells that had been incubated with the tenfold concentration. Based on this result, it is assumed that cell cycle arrest is being influenced by more factors than only the number of double-strand breaks.

Besides this finding, the study showed that following incubation with DOX and ETO, DNA double-strand breaks are being rapidly repaired. Repair of DOX-induced breaks was carried out more slowly, based on its intercalation into DNA. The pathways by which DNA repair was carried out could be identified by specifically knocking down the NHEJ proteins DNA-PK<sub>cs</sub> and Ku70 as well as the central protein of HR, Rad51. The data indicated that the NHEJ proteins are primarily related to repair, whereas Rad51 is more important for survival after DOX and ETO damage. Thus, a mechanism for DNA repair is postulated where error-prone NHEJ carries out the initial rejoining of DNA strand breaks while HR then checks and corrects the NHEJ-ligated breaks. This hypothesis is supported by the fact that the cell

## Summary

---

cycle is arrested for several days, although the rejoining of strand-breaks is obviously finished a few hours after removal of the topoisomerase II $\alpha$ -inhibitor.

So, in HT-29-cells Rad51 was found to mediate cellular resistance to topoisomerase II $\alpha$ -inhibitors. However, the comparison of HT-29 and ascites cells raised the question whether this resistance mechanism is of particular importance in clinical praxis. It rather seems that MDR and at-MDR are of greater significance. To answer this question, further experiments are necessary. In addition, it ought to be tested whether the quantification of Rad51, topoisomerase II $\alpha$  and P-gp is a reliable predictive marker for a tumour's sensitivity towards topoisomerase II $\alpha$ -inhibitors. If so, it would be possible to test patients' tumour cells before treatment and avoid unsuccessful therapies. Additionally, in resistant tumours expressing high amounts of Rad51, the therapeutic use of antisense strategies and specific inhibitors seems to be a promising attempt to improve sensitivity.

The present study has demonstrated that molecular actions initiated after the induction of strand-breaks, like DNA repair and cell cycle arrest, modulate the sensitivity of solid tumours towards topoisomerase II $\alpha$ -inhibitors. Whether this aspect is of clinical importance has to be explored by future experiments.

## 7 Materialien und Methoden

### 7.1 Geräte

#### **Elektrophoresekammer**

Horizon 11.14, Fa. Whatman Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland

#### **FACS**

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

#### **Fluoreszenzmikroskop**

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

#### **Gelkamera**

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

#### **pH-Meter**

Metrohm 632 mit Glaselektrode Metrohm 6.0203.000, Deutsche Metrohm GmbH & Co.KG, Filderstadt, Deutschland

#### **Slot Blot-Apparatur**

Hybri-Slot™ Manifold, Fa. Life Technologies Inc, Gaithersburg, MD, USA

#### **UV/VIS-Spektrometer**

Cary 50 Bio, Fa. Varian Inc, Pablo Alto, CA, USA

#### **Western Blot-Apparatur**

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

#### **Zytostatikawerkbank**

HERAsafe™ HSP 18, Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Klasse 2, Fa. Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland

### 7.2 Zellkultur

Alle Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Frank Gieseler, Universitätsklinikum Kiel, zur Verfügung gestellt.

#### 7.2.1 HT-29

Wie in Abschnitt 1.1.2 erwähnt, wurden die Zellen der Linie HT-29 ursprünglich im Jahr 1964 aus dem primären Tumor einer 44-jährigen Patientin mit kolorektalem Adenokarzinom isoliert <sup>[9]</sup>.

Ihre Kultivierung erfolgt bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in McCoy's 5a-Medium, versetzt mit 1,5 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung und 10 % FBS. Die Zellen wachsen adhärent. Die Kulturen werden alle drei bis vier Tage passagiert, wozu sie mit Trypsin-EDTA-Lösung von der Kulturflasche abgelöst und im Verhältnis 1:8 bis 1:15 gesplittet werden. Die Zelldichte der frisch passagierten Zellen beträgt 1-2x10<sup>4</sup>/ml. Die Verdoppelungszeit der HT-29-Zellen liegt bei 24 h.

Zur längerfristigen Konservierung werden 1-5x10<sup>6</sup> Zellen/ml FBS mit 10 % DMSO versetzt und für 12 Stunden bei -80°C eingefroren. Anschließend erfolgt die Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen werden die Zellen in 20 ml vorgewärmtes Medium (37°C) gebracht; nach 24-stündiger Anwachsphase wird das Medium gewechselt. Für die Versuche wurden ausschließlich Zellen der Passagen 5-55 verwendet.

---

Penicillin-Streptomycin-Lösung	5.000 I.E. Penicillin/ml + 5.000 µg/ml Streptomycin in 0,9 % NaCl
Trypsin-EDTA-Lösung	0,25 % Trypsin + 0,1 % EDTA in 0,9 % NaCl

---

## Materialien und Methoden

---

### 7.2.2 Ascites-Zelllinie 1

Die Zellen der Ascites-Linie 1 – im Folgenden als Ascites-1 bezeichnet – wurden aus der punktierten Ascitesflüssigkeit eines 77-jährigen, männlichen Kolonkarzinom-Patienten gewonnen, der zum Zeitpunkt der Entnahme noch keine antiproliferative Therapie bekommen hatte.

Zur Anzucht der Linie wurde das Punktat zentrifugiert (12.000 g, 10 min) und das Zellpellet in zwei großen Kulturflaschen mit je 20 ml RPMI 1640-Medium versetzt, ergänzt mit 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 25 mM Glucose, 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung, 10 % FBS und 5 % Ascitesüberstand (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>). In den folgenden Wochen erfolgte ein schrittweises Verdünnen der Zellen, um die Kulturen von den ebenfalls im Punktat enthaltenen Erythrozyten und Leukozyten zu reinigen.

Die Kulturen werden alle drei bis vier Tage passagiert und dabei im Verhältnis 1:10 mit frischem Medium verdünnt. Sie sind nicht-adhären. Die Zelldichte der passagierten Zellen beträgt  $5 \times 10^4$  bis  $3 \times 10^5$ /ml; die Verdoppelungszeit liegt bei ca. 24 h.

---

Penicillin-Streptomycin-Lösung	5.000 I.E. Penicillin/ml + 5.000 µg/ml Streptomycin in 0,9 % NaCl
--------------------------------	---

---

### 7.2.3 Ascites-Zelllinie 2

Die Zellen der Ascites-Linie 2 – im Folgenden als Ascites-2 bezeichnet – entstammen der punktierten Ascitesflüssigkeit einer 40-jährigen, weiblichen Kolonkarzinom-Patientin. Die Therapie, die die Patientin bis zu diesem Zeitpunkt erhalten hatte, bestand aus 5-Fluorouracil, Irinotecan und Folsäure.

Zur Anzucht der Linie wurde das Punktat zentrifugiert (12.000 g, 10min) und das Zellpellet in zwei großen Kulturflaschen mit je 20 ml RPMI 1640-Medium versetzt, ergänzt mit 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 25 mM Glucose, 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung, 10 % FBS und 5 % Ascitesüberstand (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>). Mit dem Überstand der Linie 2 zeigten die Zellen jedoch kaum Proliferation. In der Folge wurde daher der Zusatz von Ascitesüberstand anderer Zelllinien getestet, wobei der



## Materialien und Methoden

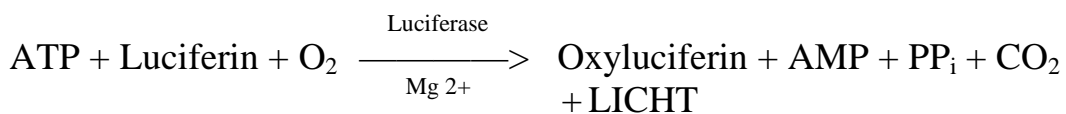
Ascites-1-Überstand das stärkste Wachstum induzierte, ohne dabei eine Immunreaktion auszulösen.

Die Kulturen werden alle 14 Tage passagiert, wozu sie mit Trypsin-EDTA-Lösung von der Kulturflasche abgelöst und im Verhältnis 1:2 gesplittet werden. Die Zelldichte der frisch passagierten Zellen beträgt  $6-8 \times 10^4$ /ml; die Verdoppelungszeit liegt bei 14 Tagen.

Penicillin-Streptomycin-Lösung	5.000 I.E. Penicillin/ml + 5.000 µg/ml Streptomycin in 0,9 % NaCl
Trypsin-EDTA-Lösung	0,25 % Trypsin + 0,1 % EDTA in 0,9 % NaCl

### 7.2.4 Mykoplasmen-Test

Mykoplasmen sind eine weit verbreitete Kontamination kultivierter Zellen. Dies ist unerwünscht, da sie die Eigenschaften der infizierten Zellkultur beeinflussen und zu dauerhaften Änderungen der Genexpression führen können<sup>[159]</sup>. Daher wurden die eingesetzten Zellkulturen routinemäßig auf eine Mykoplasmeninfektion überprüft. Dies erfolgte mit Hilfe des MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit der Firma Cambrex (Rockland, USA). Hierzu werden 100 µl Zellkulturüberstand 5 min mit 100 µl MycoAlert™-Reagenz inkubiert, welches Mykoplasmen selektiv lysiert. Das freigesetzte ATP wird in einer Biolumineszenzreaktion mit Luciferin zu AMP umgesetzt (Abbildung 6.1) und die Intensität des emittierten Lichts mit einem Luminometer gemessen (Messung A).



**Abbildung 6.1:** Biolumineszenzreaktion der Umsetzung von ATP

Anschließend erfolgt für die Dauer von 10 min die Zugabe von 100 µl MycoAlert™-Substrat. Das darin enthaltene ADP wird von den mykoplasmatischen Enzymen zu ATP umgesetzt. Im Falle einer Kontamination kommt es somit zu einem mittels der erläuterten

Biolumineszenzmethode detektierbaren Anstieg an ATP (Messung B). Ist das Verhältnis von Messung B zu Messung A  $> 1$ , liegt ein Befall der Kultur mit Mykoplasmen vor. Ist das Verhältnis jedoch  $\leq 1$ , ist die Probe nicht kontaminiert.

Die bei dieser Arbeit verwendeten Zellkulturen waren bei allen Untersuchungen frei von Mykoplasmen.

### 7.3 Mikroskopie

#### 7.3.1 Lichtmikroskopie

Je Ansatz werden  $2,5 \times 10^5$  HT-29-Zellen in 3 ml Medium ausplattiert (60 mm-Dish) und nach frühestens 24 h mit den Untersuchungssubstanzen behandelt. Am Ende der Inkubation wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit 3 ml Methanol 20 min fixiert. Anschließend erfolgt die Färbung mit 2 ml Giemsa-Lösung für weitere 20 min; überschüssige Farbstoffreste werden nach Absaugen der Färbelösung mit ausreichend destilliertem Wasser ausgewaschen. Die Präparate werden an der Luft getrocknet und an einem Zeiss Axiovert 135-Mikroskop fotografiert (Hellfeld-Aufnahme, 20-fache Vergrößerung).

---

Giemsa-Lösung	10 % Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung in Aqua dest.
---------------	---

---

### 7.4 Methoden zur Untersuchung der DNA

#### 7.4.1 Comet-Assay

Die Einzelzell-Gelelektrophorese – auch Comet-Assay genannt – ist eine einfache, schnelle und empfindliche Methode, DNA-Strangbrüche auf Einzelzellebene zu detektieren. Sie wurde 1988 von Singh et al. erstmals publiziert <sup>[160]</sup> und hier folgendermaßen modifiziert:

Je Ansatz werden  $2,5 \times 10^5$  HT-29- oder Ascites-1-Zellen in 3 ml Medium ausplattiert (60 mm-Dish), 24 h inkubiert und anschließend mit den Untersuchungssubstanzen behandelt. Da die Zellkultur der Ascites-2-Linie nur langsam proliferiert, erfolgt ihre Aussaat im verkleinerten Ansatz von  $2,5 \times 10^4$  Zellen in 500  $\mu$ l (24 well-Platte). Am Ende der Inkubation werden die HT-29-Zellen mit 2x2 ml PBS gewaschen und in 500  $\mu$ l PBS abgekratzt. Von den Ascites-1 werden 500  $\mu$ l Zellsuspension zentrifugiert (5 min, 300 g), das Pellet mit 1 ml PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 100  $\mu$ l PBS suspendiert. Die Ascites-2-Zellen werden mit 2x150  $\mu$ l PBS gewaschen und in 100  $\mu$ l PBS abgekratzt. 100  $\mu$ l der jeweils erhaltenen Zellsuspension werden mit 300  $\mu$ l einer auf 37°C temperierten LMPA-Lösung vermischt. 150  $\mu$ l dieser Suspension werden auf einen mit 1 % Agarose in PBS-beschichteten Objektträger pipettiert, mit einem Deckglas abgedeckt und 5 min bei 4°C erstarren gelassen. Nach Aufbringen von weiteren 100  $\mu$ l LMPA-Lösung als zweite Schicht verbleibt der Objektträger wiederum abgedeckt 5 min bei 4°C. Anschließend werden alle Deckgläser entfernt und die Objektträger für einen Zeitraum von einer Stunde bis zu zwei Wochen bei 4°C und unter Lichtausschluss in Final-Lysing-Solution gelagert. Hierdurch wird die Plasmamembran der Zelle lysiert, so dass die DNA in der nun folgenden Mikroelektrophorese die Zelle verlassen und abhängig von ihrer Größe im elektrischen Feld wandern kann. Liegen in der DNA viele Doppelstrangbrüche vor, entsteht dabei die Form eines Kometen, die dem Assay seinen Namen verliehen hat.

Zunächst werden die Objektträger zweimal mit Neutralisationspuffer gewaschen, in der Elektrophoresekammer platziert und anschließend mit Elektrophoresepuffer übergossen. Nach 45 min Inkubationszeit, in der die DNA Zeit hat sich zu entwinden, folgt die 20-minütige Elektrophorese (0,7 V/cm, 150 mA). Die Temperatur wird während des gesamten Prozesses

## Materialien und Methoden

bei 4°C gehalten. Außerdem müssen die Schritte unter Lichtausschluss durchgeführt werden, da die nun freiliegende DNA anderenfalls geschädigt wird. Anschließend werden die Objektträger zweimal mit Neutralisationspuffer gewaschen, für 5 min in kaltem Ethanol 96 % fixiert und an der Luft getrocknet.

Zur Auswertung wird die DNA mit SYBR Green I™-Lösung gefärbt und je Ansatz 100 Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt (40-fache Vergrößerung). Sie werden abhängig von Länge und Diffusität des Kometen in sechs verschiedene Kategorien der Schädigung eingeteilt, wobei Zellen der Kategorie 1 keine Schädigung aufweisen, die der Kategorie 6 hingegen nahezu keine intakte DNA mehr besitzen. Die jeweiligen Summen der sechs Typen werden gebildet und der Grad der Schädigung („Score“, in arbitrary units = AU) gemäß folgender Formel berechnet:

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

$n_1$  ist dabei die Summe der Kategorie 1-Zellen,  $n_2$  die der Kategorie 2-Zellen usw. Bei 100 ausgezählten Kometen pro Ansatz ergibt sich also ein Score zwischen 100 und 600 AU. Da die Zahl der Strangbrüche in unbehandelten Zellen abhängig von der eingesetzten Passage variiert, werden Kurven, die miteinander verglichen werden sollen, auf einen einheitlichen Kontrollwert oder Initialschaden normiert.

Alternativ dazu könnte die Auswertung auch Software-gestützt erfolgen. Allerdings ist dies weder präziser noch schneller <sup>[161]</sup>, daher wurde aus Kostengründen auf diese Vorgehensweise verzichtet.

Als Positivkontrolle wird beim Comet-Assay H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eingesetzt, da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ein exzellenter Induktor von DNA-Doppelstrangbrüchen ist <sup>[162]</sup>. In Vorversuchen erwiesen sich 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 min als geeignet.

Elektrophoresepuffer	300 mM NaOH, 0,1 mM Na <sub>2</sub> EDTA, pH 13
Final-Lysing-Solution	2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1 % Triton X-100, pH 10
LMPA-Lösung	0,5 % LMPA in PBS
Neutralisationspuffer	0,4 M Tris-HCl, pH 7,5
PBS	135 mM NaCl, 9 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2,7 mM KCl
SYBR Green I™-Lösung	1:10.000 SYBR Green I in TE-Puffer
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5

### 7.5 Methoden zur Proteinuntersuchung

#### 7.5.1 Proteinisolierung

##### 7.5.1.1 Standardmethode

$5 \times 10^5$  Zellen werden in 9 ml Medium ausplattiert (10 mm-Dish), vier bis fünf Tage inkubiert und mit den Untersuchungssubstanzen behandelt. Am Ende der Inkubation werden sie mit einem Gummischaber abgekratzt und bei 300 g 5 min zentrifugiert. Das Pellet wird mit 10 ml kaltem PBS gewaschen und nach erneutem Zentrifugieren (5 min, 500 g) größenabhängig in 70-110  $\mu$ l P-RIPA gelöst und 30 min auf Eis gestellt. Hierbei kommt es zu einem Ausfällen der DNA und der RNA. Gleichzeitig wird durch die in P-RIPA enthaltenen Protease-Inhibitoren ein Abbau des Proteins verhindert. Bei den Ansätzen, bei denen die Proteinisolierung mittels Ultraschall durchgeführt wird, werden die Proben die ersten 7,5 Minuten im Ultraschallbad inkubiert, bevor sie für die verbleibenden 22,5 Minuten ebenfalls auf Eis gestellt werden. Das Lysat wird bei 4°C und 12.000 g 12 min zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet verworfen und aus dem Überstand die enthaltene Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay ermittelt. Dieser beruht darauf, dass der zugesetzte Farbstoff Brilliantblau G mit Proteinen einen blau gefärbten Komplex bildet, dessen Absorptionsmaximum von 465 zu 595 nm verschoben ist. Die Höhe der Absorption ist proportional zur vorhandenen Proteinmenge<sup>[163]</sup>. 500  $\mu$ l Bradford-Reagenz werden dazu mit 1  $\mu$ l Überstand und 500  $\mu$ l dest. Wasser gemischt (Doppelbestimmung) und die Absorption des Komplexes im Photometer bei 595 nm gegen Aqua dest. gemessen. Als Blindprobe dient eine Lösung aus 500  $\mu$ l Aqua dest. und 500  $\mu$ l Bradford-Reagenz. Für die Kalibrierkurve werden Lösungen mit 0 / 1,25 / 2,5 / 3,75 / 5 / 7,5 und 20  $\mu$ g/ml BSA angesetzt, anhand derer die Proteinkonzentration des Lysats berechnet wird.

Das Lysat wird im Verhältnis 3:1 mit Lämmli III-Puffer versetzt, bei 95°C 5 min denaturiert, 5 min auf Eis gestellt und bei -20°C eingefroren.

## Materialien und Methoden

Bradford-Reagenz	Brilliantblau G in Essigsäure/Methanol
Lämmli III-Puffer	30 % Glycerin, 5 % $\beta$ -Mercaptoethanol, 4 % SDS, 140 mM Tris-HCl (pH 7,0), 1 mM Na <sub>2</sub> EDTA (pH 7,4), 0,025 % Bromphenolblau
PBS	135 mM NaCl, 9 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2,7 mM KCl
P-RIPA	10 $\mu$ g/ml Aprotinin, 10 $\mu$ g/ml Leupeptin, 40 mM $\beta$ -Glycerolphosphat, 10 mM Benzamidin, 10 mM Na-Pyrophosphat, 1 mM NaF, 1 mM PMSF in RIPA-Lysispuffer
RIPA-Lysispuffer	154 mM NaCl, 50 mM Tris-OH, 6 mM Desoxycholsäure-Natrium, 1 mM Na <sub>2</sub> EDTA (pH 7,4), 1 % Nonidet P-40

### 7.5.1.2 Isolierung von Kernproteinen

Zur gezielten Untersuchung von Proteinen, die sich im Kern und seiner Membran befinden, ist die Standardmethode nicht geeignet. Vielmehr müssen zunächst die Zellkerne von den weiteren Zellbestandteilen separiert werden, bevor die Kernproteine isoliert werden können.

Die Isolierung der Zellkerne beruht auf der von Antalis et al. 1991 publizierten Methode <sup>[164]</sup>. Dabei wird das nach Abkratzen der Zellen erhaltene und mit PBS gewaschene Pellet in 400  $\mu$ l mit 0,05 % Nonidet P-40<sup>TM</sup> versetztem Lysispuffer suspendiert und 3 min bei 4°C und 500 g zentrifugiert. Das Pellet, welches nun nur noch aus Zellkernen besteht, wird in 2 ml Lysispuffer ohne Nonidet P-40<sup>TM</sup> gewaschen und die Suspension erneut zentrifugiert.

Um aus diesem Pellet die Kernproteine zu isolieren, wird auf die von Andrews et al. 1991 publizierte Methode <sup>[165]</sup> zurück gegriffen. Das Pellet wird dazu größenabhängig in 40-80  $\mu$ l Extraktionspuffer aufgenommen, 20 min auf Eis gestellt und 2 min bei 20.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthält nun die Kernproteine und wird im Weiteren wie bei der Standardmethode behandelt.

Lysispuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl <sub>2</sub>
Extraktionspuffer	420 mM NaCl, 20 mM, HEPES-KOH (pH 7,9), 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 500 $\mu$ M DTT, 200 $\mu$ M EDTA (pH 8,0), 200 $\mu$ M PMSF, 25 % Glycerin

## Materialien und Methoden

---

### 7.5.2 Western Blot

Der Western Blot dient dazu, die in einer Lösung befindlichen Proteine qualitativ und semi-quantitativ nachzuweisen. Sie werden dazu unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch getrennt, auf eine Membran übertragen und dort mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen.

#### 7.5.2.1 Elektrophorese

Die Trennung der Proteine Rad51, Rad52, Rad54 und Topo II $\alpha$  erfolgt auf einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamid-Gel bei 53 mA über eine Zeit von 90 min. Die Proteinlösungen werden zuvor mit PAGE-Puffer auf eine Konzentration von 20  $\mu$ g Protein/20  $\mu$ l eingestellt und 5 min bei 95°C denaturiert.

Die Proteine DNA-PK<sub>cs</sub>, Ku70 und Ku86 werden auf einem 3-8 %-igen Tris-Acetat-Gradientgel (NuPAGE™, Fa. Invitrogen) getrennt (80 min, 150 V). Die Proteinkonzentration beträgt bei dieser Trennung 10  $\mu$ g/10  $\mu$ l.

---

Elektrophoresepuffer	190 mM Glycin, 25 mM Tris-OH, 0,1 % SDS
PAGE-Puffer	10 % Glycerin, 5 % $\beta$ -Mercaptoethanol, 1 % SDS, 62 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,5 mM Na <sub>2</sub> EDTA (pH 7,2), 0,015 % Bromphenolblau
SDS-Polyacrylamid-Gel 10%	<u>Sammelgel</u> : 5 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lsg., 125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1 % SDS, 0,1 % Ammoniumpersulfat, 0,1 % TEMED <u>Trenngel</u> : 10 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lsg., 375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1 % SDS, 0,09 % Ammoniumpersulfat, 0,06 % TEMED

---

#### 7.5.2.2 Blotten

Die nach Abschnitt 7.5.2.1 erhaltenen Proteingele werden 3x5 min in Blotpuffer geschüttelt, um SDS-Reste zu entfernen. Danach erfolgt der Transfer der Proteine auf eine mit Methanol hydrophilisierte PVDF-Membran (Immobilon-P™, Fa. Millipore, Deutschland). Gel und Membran werden dazu in eine Blotting-Apparatur gespannt und unter Eiskühlung 90 min einer Stromstärke von 130 mA ausgesetzt. Nach Ablauf des Blottvorgangs wird die Membran 3x5 min in TBS gewaschen und auf Handtuchpapier getrocknet, um die Proteinbindung zu verstärken. Membranen, die mit Anti-Ziege-IgG als Zweitantikörper behandelt werden

## Materialien und Methoden

---

sollen, werden nicht auf Papier gelegt, da sonst der Hintergrund bei der Entwicklung zu stark wird.

---

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

---

### 7.5.2.3 Coomassie-Färbung

Um bei der semi-quantitativen Auswertung Fehler, die auf einem unterschiedlich starken Proteinauftrag beruhen, zu vermeiden, wird das Gel nach dem Blotten nach Coomassie gefärbt und fotografiert. Die Aufnahme dient somit als interne Kontrolle.

Das Gel wird zunächst 3x5 min in dest. Wasser gewaschen, bevor es für 30-60 min in der Färbelösung geschüttelt wird. Um den Hintergrund zu entfärben, wird das Gel anschließend 1-12 h in Entfärbelösung gegeben. Nach kurzem Waschen in Aqua dest. schließlich wird es mit der Gelkamera fotografiert.

---

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

---

### 7.5.2.4 Entwicklung

Die Detektion der Proteine erfolgt durch die Behandlung der nach Abschnitt 7.5.2.2 erhaltenen Membran mit einem spezifischen Antikörper, welcher wiederum mit einem Horseradish-Peroxidase-gekoppeltem Zweitantikörper gebunden wird. ECL Advance™-Detektionsreagenz wird durch diese Peroxidase umgesetzt und es kommt zur konzentrations-abhängigen Chemilumineszenz, welche in einer Dunkelkammer mit einer besonders sensitiven Kamera aufgenommen wird.

Die Entwicklung erfordert mehrere Wasch- und Inkubationsschritte. Zunächst wird die Membran anhand des Markers auf den interessierenden Größenbereich zugeschnitten. Soll eine PVDF-Membran entwickelt werden, muss diese zunächst 1 min in Methanol hydrophilisiert werden, bevor 3x5 min in TBS und 1x10 min in TBS-Tween gewaschen wird. Um die nicht mit Protein besetzten Bereiche der Membran zu blockieren und so den Hintergrund zu verringern, wird sie bei 4°C über Nacht in Blocking-Lösung



## Materialien und Methoden

gegeben. Anschließend wird die Membran 1 h in Primärantikörper-Lösung inkubiert. Überschüssige Antikörperlösung wird mit 3x15 min TBS-Tween entfernt. Danach wird 1 h mit Sekundärantikörper-Lösung behandelt, deren Überschuss wiederum mit 3x15 min TBS-Tween entfernt wird. Zur Detektion pipettiert man schließlich 0,5-1 ml ECL Advance™-Reagenz auf die Membran und fotografiert sie unter Lichtausschluss mit der Gelkamera (UVItec™ Imaging System).

Die Proteine wurden mit folgenden Antikörperverdünnungen entwickelt:

DNA-PK <sub>cs</sub>	Anti-DNA-PK <sub>cs</sub> -IgG 1:1000 Anti-Kaninchen-IgG 1:10.000
Ku70 + Ku86	Anti-Ku70-IgG 1:2000 + Anti-Ku86-IgG 1:600 Anti-Maus-IgG 1:6000
Rad51	Anti-Rad51-IgG 1:200 Anti-Kaninchen-IgG 1:10.000

Rad52	Anti-Rad52-IgG 1:100 Anti-Ziege-IgG 1:10.000
Rad54	Anti-Rad54-IgG 1:600 Anti-Kaninchen-IgG 1:10.000
Topo II $\alpha$	Anti-TopoII $\alpha$ -IgG 1:100 Anti-Ziege-IgG 1:10.000

TBS	200 mM NaCl, 50 mM Tris-OH, pH 7,4
TBS-Tween	0,1 % Tween 20™ in TBS
Blocking-Lösung	5 % Milchkpulver, 0,02 % Natriumazid in TBS-Tween
Primärantikörper-Lösung	5 % Milchkpulver, 0,02 % Natriumazid, Primärantikörper 1:100, 1 :200, 1 :600, 1:1000 oder 1 :2000 in TBS-Tween
Sekundärantikörper-Lösung	5 % Milchkpulver, Sekundärantikörper 1:6000 oder 1:10.000 in TBS-Tween

### 7.5.3 Slot Blot

Der Unterschied zwischen Slot Blot und Western Blot besteht darin, dass das Proteingemisch beim Slot Blot nicht erst elektrophoretisch entsprechend seiner Größe getrennt, sondern direkt auf die Membran aufgetragen und entwickelt wird. Daraus ergibt sich der Vorteil, dass es nicht zu Proteinverlusten während der Elektrophorese und der Übertragung auf die Membran kommen kann. Die Methode kann daher mit geringeren Proteinmengen durchgeführt werden als der Western Blot und ist dennoch

präzise. Voraussetzung ist allerdings, dass der jeweilige Antikörper bei der Entwicklung des Western Blots nur eine spezifische Bande für das Protein gezeigt hat. In Vorversuchen hat sich zudem gezeigt, dass beim Slot Blot mit PVDF-Membran keine scharf begrenzten Proteinbanden entstehen, daher wird mit Nitrocellulose-Membran gearbeitet.

Diese wird zur Befeuchtung 5 min in TBS gewaschen und anschließend in die Slot Blot-Apparatur eingespannt. Nach Anlegen eines Vakuums werden die Proteinproben quantitativ in die Probenauftragschlitze (Slots) pipettiert. Als Spüllösung für Probengefäße und Slots werden insgesamt 40 µl TBS verwendet (1:3). Das Vakuum wird so lange aufrechterhalten, bis die gesamte Flüssigkeit durch die Membran gesaugt wurde. Anschließend wird die Membran, die nun an den Positionen der Slots das Protein gebunden trägt, kurz in TBS gespült und auf Papier getrocknet. Die Entwicklung der Slot Blot-Membranen läuft analog dem Western Blot ab (Abschnitt 7.5.2).

---

TBS	200 mM NaCl, 50 mM Tris-OH, pH 7,4
-----	------------------------------------

---

### 7.6 Transfektion mit siRNA

Unter siRNA versteht man doppelsträngige RNA mit einer Länge von 21-23 Basenpaaren, die sich aus einem Stück Sense- und Antisensestrang der zu targetierenden mRNA zusammensetzt<sup>[166]</sup>. Der Einsatz von siRNA ermöglicht es, die Expression eines bestimmten Gens spezifisch zu unterbinden<sup>[167]</sup>. Nach Transfektion der siRNA ins Zytoplasma der Zelle bildet sich dort mit zellulären Proteinen ein RNA-Protein-Komplex, der den Namen RISC (RNA-induced silencing complex) trägt<sup>[168]</sup>. Dieser Komplex vermittelt über das Protein Argonaute2, auch Slicer genannt<sup>[169, 170]</sup>, die Trennung des siRNA-Doppelstrangs und ermöglicht so, dass der entstehende Protein-gebundene Einzelstrang an die homologe Sequenz der targetierten mRNA binden kann. Die nun doppelsträngige mRNA wird im Folgenden von der Nuklease gespalten<sup>[171]</sup>. Die Zelle erkennt die entstehenden mRNA-Stücke als fehlerhaft und baut diese ab. Somit kommt es nicht zur Translation, was eine spezifische Ausschaltung der Expression des Gens, von der die mRNA transkribiert wurde, bedeutet.

## Materialien und Methoden

---

Die Transfektion wird in 24 well-Platten durchgeführt. Je well werden  $7,5 \times 10^4$  HT-29-Zellen in 200  $\mu$ l Medium ausplattiert und zeitgleich transfiziert. Dazu werden 200 nM siRNA in 100  $\mu$ l EC-R-Puffer gelöst und mit 9  $\mu$ l RNAiFect™-Transfektionsreagenz 15 min inkubiert, so dass die siRNA mit dem Transfektionsreagenz Komplexe bilden kann. Anschließend werden die Komplexe tropfenweise zu den ausplattierten Zellen gegeben. Wie Vorversuche zeigten, bewirkt eine Transfektionsdauer von 48 h (Ku70) bzw. 72 h (Rad51) die größte Proteinabnahme (Abschnitt 3.1.8). Als Negativkontrolle wird eine siRNA mit nicht-targetierender Sequenz (Control-siRNAa, Fa. Santa Cruz, Kalifornien, USA) eingesetzt; die Transfektionsdauer beträgt 48 h. Der Erfolg der Transfektion wurde durch Isolation und Slot Blot des entsprechenden Proteins überprüft. Dabei wurden die Zellen abweichend vom Protokoll zur Proteinisolierung (Abschnitt 7.5.1) nach dem Abkratzen nur mit 1 ml PBS gewaschen und größenabhängig in 25-60  $\mu$ l P-RIPA lysiert.

Der Erfolg der Methode hängt neben der Transfektionsdauer in erster Linie von der Sequenz der siRNA ab. Diese wurde nicht selbst sequenziert, sondern von Fa. Santa Cruz (Kalifornien, USA) erworben.

Bei Versuchen, in denen die transfizierten Zellen mit ETO oder DOX behandelt werden, erfolgt die Zugabe des Zytostatikums entsprechend 1 bzw. 24 h vor Ablauf der Transfektion.

Um das Reparaturverhalten der Zellen mittels des Comet-Assays zu beobachten, werden die Zellen am Ende der Transfektion mit Trypsin-EDTA abgelöst und in je 200  $\mu$ l Medium auf sieben neue wells verteilt, die anschließend zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert werden. So wird garantiert, dass die zu vergleichenden Zellen die gleiche Menge an Reparaturproteinen besitzen.

### 7.7 Zytotoxizitätstests

#### 7.7.1 Colony Formation Assay

Der Colony Formation Assay beruht auf der von Zhu et al. publizierten Methode <sup>[172]</sup> und wurde für unsere Zwecke wie folgt optimiert:

$2,5 \times 10^5$  HT-29-Zellen werden in 3 ml Medium ausplattiert (60 mm-Dish), 24 h inkubiert und mit den Untersuchungssubstanzen behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen mit Trypsin-EDTA 0,25 % abgelöst, die Reaktion mit Medium gestoppt und die Lösung zentrifugiert (5 min, 300 g). Das Pellet wird in Medium suspendiert, die Zellzahl unter dem Mikroskop bestimmt und die Zellsuspension bei Bedarf weiter mit Medium verdünnt. Für den Assay werden schließlich in einer 6 well-Platte je 100 Zellen pro Ansatz in 2 ml Medium ausplattiert (Doppelbestimmung) und 14 Tage inkubiert. Nach sieben Tagen erfolgt ein Mediumwechsel.

Zur Auswertung werden die Zellen nach Giemsa gefärbt (Abschnitt 6.2.1 Lichtmikroskopie). Die Zahl der gebildeten Kolonien pro Platte wird bestimmt und der Mittelwert der beiden Ansätze gebildet.

Da die Ascites-1-Zellen nicht adhärent wachsen, muss der Assay für sie etwas modifiziert werden:  $1 \times 10^5$  Zellen werden in 1,5 ml Medium ausplattiert (6 well-Platte), behandelt und ausgezählt. Anschließend werden ebenfalls 100 Zellen in 2 ml Medium ausgesät. Das Medium wird jedoch mit 20 % Agarose versetzt, um die Zellen zu immobilisieren und ein Koloniewachstum zu ermöglichen.

Nach 14 Tagen werden die Ansätze über Nacht mit 10 µg/ml Ho33258 in PBS gefärbt und, mit einer Anregungswellenlänge von 365 nm bestrahlt, fotografiert und die Koloniezahl bestimmt.

---

PBS	135 mM NaCl, 9 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2,7 mM KCl
Trypsin-EDTA-Lösung	0,25 % Trypsin + 0,1 % EDTA in 0,9 % NaCl

---

### 7.7.2 Alamar Blue™-Assay

Resazurin, der Farbstoff des Alamar Blue™-Assays, ist ein Redox-Indikator, dessen Fluoreszenz und Farbe sich in Abhängigkeit von der durch Zellwachstum bedingten Reduktion des Zellkulturmediums ändern. Er wird dabei von der blauen, nicht-fluoreszierenden Form zur roten, fluoreszierenden Form reduziert <sup>[126]</sup>.

Der Assay wird als Dreifachbestimmung in der 96 well-Platte (U-Form) durchgeführt. Pro well werden dazu  $1,25 \times 10^3$  HT-29-Zellen in 250  $\mu$ l Medium ausplattiert und 72 h inkubiert, bevor die Zugabe der Testsubstanzen erfolgt. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 1 bzw. 24 h für die Substanzen wird das Medium gegen frisches getauscht und die Zellen für weitere 48 h inkubiert. Dann wird bei allen Ansätzen das Medium abgenommen und durch frisches, mit 10 % Alamar Blue™ versetztes Medium ersetzt. Nach 3 h, in denen die Reduktion des Farbstoffs erfolgt, wird der Überstand im Fluorimeter mit Licht der Wellenlänge 540 nm angeregt und die Fluoreszenz bei 590 nm gemessen. Als Kontrollen werden unbehandelte Zellen mit Medium und 10 % Alamar Blue™ gemessen, sowie Medium mit 10 % Alamar Blue™ allein. Da DOX eine Eigenfluoreszenz besitzt, wird hier als Kontrolle Medium mit den im Test verwendeten DOX-Konzentrationen verwendet. Zur Auswertung wird die bereinigte Fluoreszenz gegen die Konzentration der Testsubstanz aufgetragen.

### 7.7.3 Bestimmung der Zahl abgelöster Zellen

Hierbei wird das auf der Platte befindliche Medium bei der Ernte nicht verworfen, sondern 5 min bei 500 g zentrifugiert. Das Pellet wird größenabhängig in 20-200  $\mu$ l PBS aufgenommen. 10  $\mu$ l der so erhaltenen Zellsuspension werden in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und unter dem Mikroskop ausgezählt (10-fache Vergrößerung, Doppelbestimmung).

### 7.8 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Abkürzung FACS bedeutet „Fluorescence Activated Cell Sorter“ und ist von der Funktionsweise her ein Durchflusszytometer. Durchflusszytometrie kann allgemein als eine Technik bezeichnet werden, bei der man jene physikalischen Signale misst, die man erhält, wenn Partikel in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Lichtstrahl geleitet werden. Dabei kann jede Zelle einzeln bezüglich mehrerer Parameter gleichzeitig untersucht werden. Voraussetzung für die Arbeit mit dem FACS ist, dass die Zellen in Suspension vorliegen. In dieser werden sie zuerst mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und dann über eine Kapillare in das Durchflusszytometer gesaugt, wo sie in einer isotonen Lösung so aufbereitet werden, dass sie hintereinander durch eine Fliesskammer strömen. Dort werden sie an einem Laserstrahl vorbeigeleitet, dessen auftreffendes Licht in unterschiedliche Richtungen abgelenkt wird. Nach vorn gestreutes Laserlicht bezeichnet man als „Forward Scatter“ (FSC). Dieses Signal liefert eine Auskunft über die Größe der Zelle. Im rechten Winkel abgelenktes Licht ist der so genannte „Side Scatter“ (SSC), ein Maß für die Oberflächenbeschaffenheit bzw. Granularität. Der dritte gemessene Parameter ist die Fluoreszenz. Durch das Laserlicht werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes auf ein höheres Energieniveau gehoben. Da dies ein instabiler Zustand ist, wird beim Zurückkehren der Elektronen in den ursprünglichen Zustand Energie und somit Licht frei. Dieses emittierte Licht ist energieärmer als das Anregungslicht und hat eine größere Wellenlänge. Streu- und Fluoreszenzlicht werden in einem getrennten System zu Photodetektoren gelenkt. Diese wandeln die Lichtblitze in Impulse um, welche schließlich im Computer gespeichert werden.

#### 7.8.1 Annexin V-Färbung

Bereits in der frühen Phase der Apoptose kommt es zu Veränderungen an der Zelloberfläche, wie der Translokation von Phosphatidylserin von der Innenseite der Plasmamembran auf die Außenseite. Diese Exposition des Phosphatidylserins dient als Markierung der apoptotischen Zellen, die daraufhin von Makrophagen spezifisch erkannt und phagozytiert werden <sup>[117]</sup>. Die Exposition des Phosphatidylserins kann zudem analytisch genutzt werden, um gesunde Zellen von apoptotischen und nekrotischen zu

## Materialien und Methoden

---

unterscheiden. Dies geschieht mit dem Annexin V-Fluos™-Kit von Fa. Roche (Mannheim, Deutschland). Dazu werden  $2,5 \times 10^5$  HT-29 in 3 ml Medium ausplattiert (60 mm-Dish), 24 h inkubiert und mit den Untersuchungssubstanzen behandelt. Bei den Ascites-1-Zellen werden  $1 \times 10^5$  Zellen in 1,5 ml Medium ausplattiert (6 well-Platte). Nach Ablösen der HT-29-Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung und Zentrifugieren in mit 10 % FBS versetztem PBS (5 min, 300 g), wird das Pellet zunächst in 1 ml kaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 500 g). Die Ascites-1-Zellen werden ohne Trypsinierung zentrifugiert und gewaschen. Dann wird das Pellet mit 100 µl Markierungspuffer 10-15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Markierungspuffer enthält Annexin V-FITC, ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität zu Phosphatidylserin<sup>[118]</sup>, welches an den Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelt ist. Da nekrotische Zellen aufgrund der Membranschädigung Annexin V ins Innere aufnehmen und somit ebenfalls ein FITC-Signal geben, enthält der Puffer zudem Propidiumiodid, das nur von nekrotischen Zellen aufgenommen werden kann. Nach Verdünnen der Probe mit 400 µl Inkubationspuffer und Analyse von 30.000 Zellen am FACS erhält man somit drei Kategorien an Zellen: Gesunde Zellen binden weder Annexin V, noch nehmen sie Propidiumiodid auf. Apoptotische Zellen zeigen zwar ein Annexin V-FITC-Signal, jedoch keine Anfärbung durch Propidiumiodid, wohingegen nekrotische Zellen sowohl Annexin V-FITC- als auch Propidiumiodid-positiv sind. Die Einstellungen für FSC und SSC werden so gewählt, dass Zelltrümmer und -aggregate von der Analyse ausgeschlossen werden. Zudem wird ein Überlappen der verschiedenen Spektren durch geeignete Kompensation verhindert.

Bei mit DOX behandelten Zellen ist die Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen nicht möglich, da die Eigenfluoreszenz des DOX mit 585 nm eine ähnliche Wellenlänge aufweist wie Propidiumiodid (620 nm).

Für die kombinierte Untersuchung von Zelltod und Zellzyklus über acht Tage werden pro Tag  $1 \times 10^5$  HT-29 in 1 ml McCoy's ausplattiert (6 well-Platte) und wie beschrieben behandelt. Nach Ablösen der Zellen wird das Pellet in 1 ml PBS gewaschen; je 500 µl der Suspension werden für die

## Materialien und Methoden

Annexin V-Färbung und die Zellzyklusanalyse verwendet. Die Volumina der Reagenzien werden entsprechend halbiert.

Inkubationspuffer	140 mM NaCl, 10 mM HEPES-NaOH (pH 7,4), 5 mM CaCl <sub>2</sub>
Markierungspuffer	20 µl/ml Annexin V-FLUOS™, 1 µg/ml Propidiumiodid in Inkubationspuffer
PBS	135 mM NaCl, 9 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2,7 mM KCl
Trypsin-EDTA-Lösung	0,25 % Trypsin + 0,1 % EDTA in 0,9 % NaCl

### 7.8.2 Bestimmung des intrazellulären DOX-Gehalts

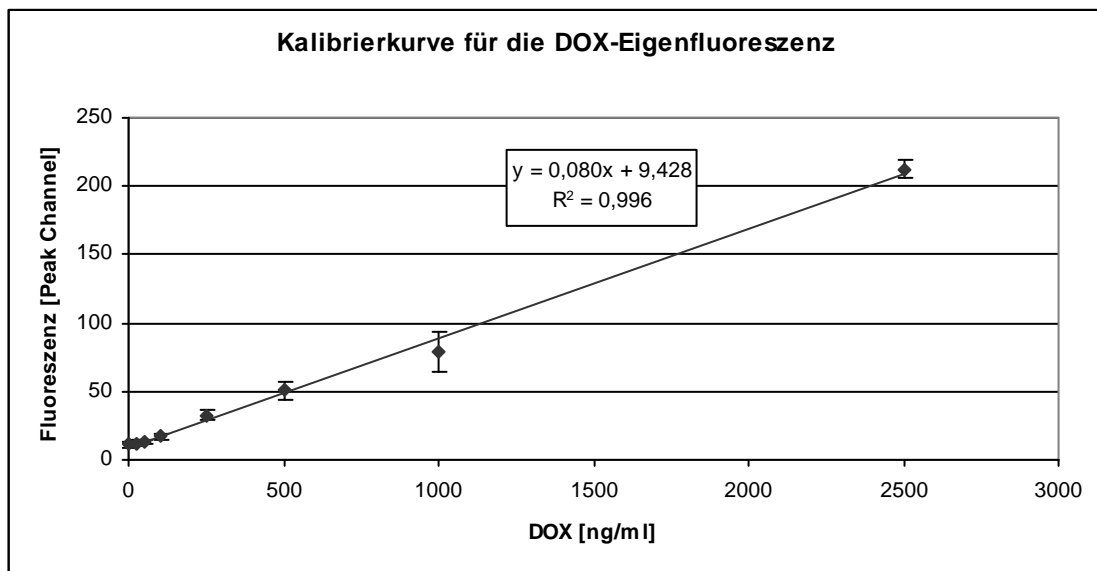
DOX zeigt eine ausgeprägte Eigenfluoreszenz. Diese kann genutzt werden, um den intrazellulären Gehalt DOX-behandelter Zellen zu bestimmen. Die Durchführung ist angelehnt an die von Tapiero et al.<sup>[173]</sup> und Dunkern et al.<sup>[100]</sup> beschriebenen Methoden. Jegliche Waschschrte mit PBS werden jedoch weggelassen, um ein Auswaschen von DOX zu vermeiden.

Je Ansatz werden  $2,5 \times 10^5$  HT-29- oder Ascites-1-Zellen in 3 ml Medium ausplattiert (60 mm-Dish), 24 h inkubiert und mit DOX behandelt. Am Ende der Inkubation werden die HT-29-Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung von der Platte abgelöst und in kaltem, mit 10 % FBS versetztem PBS zentrifugiert (5 min, 300 g, 4°C). Die Ascites-1-Zellen werden ohne Trypsinierung zentrifugiert. Das Pellet wird in 300 µl kaltem PBS resuspendiert und zur Auflösung von Zellklumpen gevortext. Anschließend werden die Proben im Dunklen auf Eis gestellt und je Ansatz 30.000 Zellen zügig am FACS vermessen, um einen Efflux von DOX aus der Zelle zu vermeiden.

Die Ermittlung des intrazellulären DOX-Gehalts der HT-29-Zellen erfolgt anhand der zuvor erstellten Kalibrierkurve, für die  $2,5 \times 10^5$  Zellen 1 h mit McCoy's-Medium, versetzt mit 0, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 und 2500 ng DOX/ml, inkubiert (5 % CO<sub>2</sub>, 37°C) und wie beschrieben gemessen wurden. Zur Erstellung der Kalibrierkurve wird die Fluoreszenz, die die meisten Zellen aufweisen (Peak channel), gegen die DOX-Konzentration des Mediums aufgetragen (Abbildung 6.2).

PBS	135 mM NaCl, 9 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2,7 mM KCl
Trypsin-EDTA-Lösung	0,25 % Trypsin + 0,1 % EDTA in 0,9 % NaCl





**Abbildung 6.2:** Kalibrierkurve für die Messung der intrazellulären DOX-Eigenfluoreszenz (HT-29). Das Diagramm zeigt den Mittelwert aus drei Ansätzen mit Standardabweichung.

### 7.8.3 Zellzyklusanalyse

$2,5 \times 10^5$  HT-29-Zellen werden in 3 ml Medium ausplattiert (60 mm-Dish), 24 h inkubiert und mit den Untersuchungssubstanzen behandelt. Am Ende der Inkubationszeit werden die Zellen mit Trypsin-EDTA 0,25 % abgelöst, die Reaktion mit PBS, versetzt mit 10 % FBS, gestoppt und die Lösung zentrifugiert (5 min, 300 g). Das Pellet wird mit 1 ml kaltem PBS gewaschen und zur Auflösung von Zellklumpen gevortext. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet in 100  $\mu$ l kaltem PBS resuspendiert und mit 900  $\mu$ l Ethanol 70 % 1 h auf Eis oder bei 4°C über Nacht fixiert, um die Zellmembran für Propidiumiodid permeabel zu machen. Danach wird wieder zentrifugiert. Um die Trennung von subdiploiden Zellen und Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase zu verbessern, wird das Pellet nach Resuspendieren in 1 ml PBS mit 600  $\mu$ l PC-Puffer versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wird ein letztes Mal zentrifugiert, das Pellet in 300  $\mu$ l einer Lösung von 250  $\mu$ g/ml RNase A und 10  $\mu$ g/ml Propidiumiodid in PBS resuspendiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Da das Propidiumiodid in die DNA der Zellen interkaliert, ist die Höhe des Propidiumiodid-Signals ein Maß für die in der Zelle enthaltene DNA-Menge. So können die Zellen nach

## Materialien und Methoden

---

durchflusszytometrischer Vermessung eingeteilt werden in solche mit einfacher DNA-Menge = Zellen der G<sub>1</sub>-Phase, Zellen zwischen ein- und zweifacher DNA-Menge = S-Phase-Zellen, Zellen mit zweifacher DNA-Menge = G<sub>2</sub>/M-Phase und Zellen mit einer DNA-Menge kleiner eins = apoptotische Zellen. Die Messung der Proben erfolgt mit dem Becton Dickinson FACScalibur. Je Ansatz werden 30.000 Zellen gemessen. Die Einstellungen für FSC und SSC werden so gewählt, dass Zelltrümmer und -aggregate von der Analyse ausgeschlossen werden.

Für die kombinierte Untersuchung von Zelltod und Zellzyklus über acht Tage werden pro Tag  $1 \times 10^5$  HT-29 in 1 ml McCoy's ausplattiert (6 well-Platte) und wie beschrieben behandelt. Nach Ablösen der Zellen wird das Pellet in 1 ml PBS gewaschen; je 500 µl der Suspension werden für die Annexin V-Färbung und die Zellzyklusanalyse verwendet. Die Volumina der Reagenzien werden entsprechend halbiert.

---

PBS	135 mM NaCl, 9 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2,7 mM KCl
PC-Puffer	192 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 4 mM Citronensäure, pH 7,8
Trypsin-EDTA-Lösung	0,25 % Trypsin + 0,1 % EDTA in 0,9 % NaCl

---

### 7.9 Statistische Auswertung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Werte sind, sofern nicht anders aufgeführt, als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels F-Test und Student-t-Test ( $p \leq 0,05$ ).

**7.10 Gefahrstoffverzeichnis**

<b>Stoffname</b>	<b>Gefahrensymbol</b>	<b>R- und S-Sätze</b>
Acrylamid-/Bisacrylamid- 0Lösung	T	R 45-46-23/24/25-48 S 36/37/39-45-60
Ammoniumpersulfat	Xn, O	R 8-22-36/37/38-42/43
Benzamidinhydrochlorid	Xi	R 36/37/38 S 26-37/39
Bradford-Reagenz	C	R 34-20/21/22-68/20/21/22 S 26-36/37/39-45
Calciumchlorid	Xi	R 36 S 22-24
Citronensäure	Xi	R 36 S 26
Desoxycholsäure-Natrium	Xn	R 22 S 22
Dinatrium-EDTA	Xn	R 22 S 2-46
Dithiothreitol	Xn	R 22-36/38 S 22-36/37/39
DMSO	Xi	R 36/38 S 26
Doxorubicinhydrochlorid	T	R 45-46 S 22-28.1-36/37-45-53
EDTA	Xi	R 36-52/53 S 61
Essigsäure 100 %	C	R 10-35 S 23-26-45
Ethanol 96 %	F	R 11 S 7-16
Etoposid	T	R 22-45 S 26-36/37/39-45
Flüssigstickstoff	-	S 9-23-26

## Materialien und Methoden

Giemsa Färbelösung	F, T	R 11-23/24/25-39/23/24/25 S 7-16-36/37-45
β-Glycerolphosphat	Xi	R 36/37/38 S 26-37/39
Ho33258	Xn	R 36/37/38-68 S 22-26-36
Isopropanol	Xi, F	R 11-36-67 S 7-16-24/25-26
Kaliumhydroxid	C	R 22-35 S 26-36/37/39-45
Magnesiumchlorid	Xi	R 36/37 S 26-39
β-Mercaptoethanol	F, Xn, N	R 11-20-50/53 S 16-25-60-61
Methanol	F, T	R 11-23/24/25-39/23/24/25 S 7-16-36/37-45
Natriumazid	T <sup>+</sup>	R 28-32-50/53 S 28-45-60-61
Natriumfluorid	T	R 25-32-36/38 S 22-36-45
Natriumhydroxid	C	R 35 S 26-37/39-45
Nonidet-P40	Xi	R 37-41 S 26-39
Penicillin G	Xn	R 42/43 S 36
PMSF	Xn	R 20/22-36/37/38-29 S 36/37/39
Propidiumiodid	Xi	R 36/37/38 S 26
Resazurin	Xn	R 22-36/37/38 S 26-36/37/39
Salzsäure 37 %	C	R 34-37 S 26-36/37/39-45

## Materialien und Methoden

SDS	Xn	R 22-36/38 S 2-46
Streptomycinsulfat	T	R 61-22 S 45-36/37/39-22
TEMED	C, F	R 11-20/22-34
Tris	Xi	R 36/38 S 26
Triton X-100	Xn	R 22-41 S 26-36-23
Trypanblau-Lösung 0,4 %	T	R 45 S 53-45
Trypsin	Xn	R 42 S 22
Wasserstoffperoxid 30 %	Xn	R 22-41 S 26-39

### 8 Literaturverzeichnis

1. Krebs in Deutschland: Häufigkeiten und Trends. Broschüre des Robert-Koch-Instituts, 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. **2006**
2. Deutsche Krebsgesellschaft eV. *Interdisziplinäre Leitlinien 1999*. München: Zuckschwerdt Verlag, **1999**
3. <http://dtp.nci.nih.gov>
4. Rosignoli P, Fabiani R, De Bartolomeo A, et al. Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. *Carcinogenesis* **2001**;22:1675-1680
5. Fu H, Shi Y, Mo S. Effect of short-chain fatty acids on the proliferation and differentiation of the human colonic adenocarcinoma cell line Caco-2. *Chin J Dig Dis* **2004**;5:115-117
6. Grantab R, Sivananthan S, Tannock I. The penetration of anticancer drugs through tumor tissue as a function of cellular adhesion and packing density of tumor cells. *Cancer Res* **2006**;66:1033-1039
7. Dimanche-Boitrel M-T, Pelletier H, Genne P, et al. Confluence-dependent resistance in human colon cancer cells: Role of reduced drug accumulation and low intrinsic chemosensitivity of resting cells. *Int J Cancer* **1992**;50:677-682
8. Wang J, Chang Y, Chern Y, Chi C. Study of in vitro and in vivo effects of 1,6-Bis[4-(4-amino-3-hydroxyphenoxy)phenyl]diamantane (DPD), a novel cytostatic and differentiation inducing agent, on human colon cancer cells. *Br J Cancer* **2003**;89:1995-2003
9. Fogh J, Trempe G. In: Fogh J, ed. *Human tumor cells in vitro*. New York: Plenum Press, **1975**:115-141
10. Rodrigues N, Rowan A, Smith M, et al. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* **1990**;87:7555-7559
11. Greenblatt M, Bennett W, Hollstein M, Harris C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* **1994**;54:4855-4878

## Literaturverzeichnis

---

12. *Pschyrembel Medizinisches Wörterbuch, Sonderausgabe Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. Hamburg: Nikol Verlagsgesellschaft mbH, **1994**
13. Link K, Hepp G, Staib L, Butzer U, Bohm W, Beger H. Intraperitoneal regional chemotherapy with mitoxantrone. *Cancer Treat Res* **1996**;81:31-40
14. Link K, Roitman M, Holtsappel M, et al. Intraperitoneal chemotherapy with mitoxantrone in malignant ascites. *Surg Oncol Clin N Am* **2003**;12:865-872
15. Link K. Leitlinien der supportiven Therapie: Maligner Ascites. In. Tumorzentrum Ulm, **2000**
16. Holczinger L, Turi G, Olah E, Gal F. The role of heterogeneity of tumour cell populations in biological activity and sensitivity to chemotherapeutics. *Acta Morphol Acad Sci Hung* **1976**;24:351-357
17. Ujhazy V, Siracky J. Heterogeneity of tumour cells. *Antibiot Chemother* **1980**;28:120-122
18. Liu L. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem* **1989**;58:351-375
19. Li T-K, Liu L. Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2001**;41:53-77
20. Wang J. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* **1996**;65:635-692
21. Drake F, Zimmerman J, McCabe F, et al. Purification of topoisomerase II from amsacrine-resistant P388 leukemia cells. Evidence for two forms of the enzyme. *J Biol Chem* **1987**;262:16739-16747
22. Miller K, Liu L, Englund P. A homogeneous type II DNA topoisomerase from HeLa cell nuclei. *J Biol Chem* **1981**;256:9334-9339
23. Heck M, Earnshaw W. Topoisomerase II: A specific marker for cell proliferation. *J Cell Biol* **1986**;103:2569-2581
24. Woessner R, Mattern M, Mirabelli C, Johnson R, Drake F. Proliferation- and cell cycle-dependent differences in expression of the 170 kilodalton and 180 kilodalton forms of topoisomerase II in NIH-3T3 cells. *Cell Growth Differ* **1991**;2:209-214

## Literaturverzeichnis

---

25. Hsiang Y, Wu H, Liu L. Proliferation-dependent regulation of DNA topoisomerase II in cultured human cells. *Cancer Res* **1988**;48:3230-3235
26. Champoux J. DNA topoisomerases: Structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* **2001**;70:369-413
27. Walker J, Nitiss J. DNA topoisomerase II as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Invest* **2002**;20:570-589
28. Berger J, Gamblin S, Harrison S, Wang J. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature* **1996**;379:225-232, Erratum in *Nature* 380 (6570) 6179
29. Berger J, Wang J. Recent developments in DNA topoisomerase II structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol* **1996**;6:84-90
30. Lown J. Anthracycline and anthraquinone anticancer agents: Current status and recent developments. *Pharmacol Ther* **1993**;60:185-214
31. Hande K. Etoposide: Four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer* **1998**;34:1514-1521
32. Gewirtz D. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics Adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* **1999**;57:727-741
33. Jain M, Barthwal S, Barthwal R, Govil G. Restrained molecular dynamics studies on complex of adriamycin with DNA hexamer sequence d-CGATCG. *Arch Biochem Biophys* **2005**;439:12-24
34. Capranico G, Binaschi M, Borgnetto M, Zunino F, Palumbo M. A protein-mediated mechanism for the DNA sequence-specific action of topoisomerase II poisons. *TiPS* **1997**;18:323-329
35. Binaschi M, Capranico G, Dal Bo L, Zunino F. Relationship between lethal effects and topoisomerase II-mediated double-stranded DNA breaks produced by anthracyclines with different sequence specificity. *Mol Pharmacol* **1997**;51:1053-1059
36. Zunino F, Capranico G. DNA topoisomerase II as the primary target of anti-tumor anthracyclines. *Anticancer Drug Des* **1990**;5:307-317
37. D'Arpa P, Beardmore C, Liu L. Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase poisons. *Cancer Res* **1990**;50:6919-6924



## Literaturverzeichnis

---

38. Dorr R. Cytoprotective agents for anthracyclines. *Semin Oncol* **1996**;23:23-34
39. Chen G, Yang L, Rowe T, Halligan B, Tewey K, Liu L. Nonintercalative antitumor drugs interfere with the breakage reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *J Biol Chem* **1984**;259 No.21:13560-13566
40. Zeller W, zur Hausen H. *Onkologie: Grundlagen, Diagnostik, Therapie, Entwicklungen*. Landsberg: ecomed Medizin, **2005**
41. Harris P, Gross J. Preliminary pharmacokinetic model for adriamycin (NSC-123127). *Cancer Chemother Rep* **1975**;59:819-825
42. Greene R, Collins J, Jenkins J, Speyer J, Myers C. Plasma pharmacokinetics of adriamycin and adriamycinol: Implications for the design of in vitro experiments and treatment protocols. *Cancer Res* **1983**;43:3417-3421
43. Speth P, van Hoesel Q, Haanen C. Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. *Clin Pharmacokinet* **1988**;15:15-31
44. Reich S, Steinberg F, Bachur N, Riggs jr C, Goebel R, Berman M. Mathematical model for adriamycin (doxorubicin) pharmacokinetics. *Cancer Chemother Pharmacol* **1979**;3:125-131
45. Lazo J, Schwartz P. Rapid distribution of adriamycin in the ascitic and pleural fluid of women with ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol* **1985**;21:65-72
46. Bachur N. Cytoplasmic aldo-keto-reductase: A class of drug-metabolizing enzymes. *Science* **1976**;193:595-597
47. Bachur N, Steele M, Meriwether W, Hildebrand R. Cellular pharmacodynamics of several anthrocycline antibiotics. *J Med Chem* **1976**;19:651-654
48. Takanashi S, Bachur N. Adriamycin metabolism in man. Evidence from urinary metabolites. *Drug Metab Dispos* **1976**;4:79-87
49. Chabot G, Armand J-P, Terret C, et al. Etoposide bioavailability after oral administration of the prodrug etoposide phosphate in cancer patients during a phase I study. *J Clin Oncol* **1996**;14:2020-2030
50. Clark P. Clinical pharmacology and schedule dependency of the podophyllotoxin derivatives. *Semin Oncol* **1992**;19:20-27

## Literaturverzeichnis

---

51. Clark P, Slevin M. The clinical pharmacology of etoposide and teniposide. *Clin Pharmacokinet* **1987**;12:223-252
52. Fachinformation Adrimedac, Fa. Medac, Hamburg
53. Eksborg S, Strandler H-S, Edsmyr F, Näslund I, Tahvanainen P. Pharmacokinetic study of IV infusions of adriamycin. *Eur J Clin Pharmacol* **1985**;28:205-212
54. Giaccone G, Linn S, Welink J, et al. A dose-finding and pharmacokinetic study of reversal of multidrug resistance with SDZ PSC 833 in combination with doxorubicin in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* **1997**;3:2005-2015
55. Mross K, Mayer U, Hamm K, Burk K, Hossfeld D. Pharmacokinetics and metabolism of iodo-doxorubicin and doxorubicin in humans. *Eur J Clin Pharmacol* **1990**;39:507-513
56. Speth P, Linssen P, Termond E, Boezeman J, Wessels H, Haanen C. In vivo and in vitro pharmacokinetic differences between four structurally closely related anthracyclines in hematopoietic cell subtypes in humans. *Drug Metab Dispos* **1989**;17:98-105
57. Fachinformation Vepesid J, Fa. Bristol-Myers Squibb, München
58. Green J, Tarpey A, Warenus H. Pharmacokinetic study of high dose etoposide infusion in patients with small cell lung cancer. *Acta Oncol* **1988**;27:819-822
59. Holthuis J, Postmus P, Van Oort W, et al. Pharmacokinetics of high dose etoposide (VP 16-213). *Eur J Cancer Clin Oncol* **1986**;22:1149-1155
60. Fachinformation Vepesid K, Fa. Bristol-Myers Squibb, München
61. Gregianin L, Brunetto A, Di Leone L, Dalla Costa T, Santos P, Schwartsmann G. Clinical and pharmacokinetic study of fractionated doses of oral etoposide in pediatric patients with advanced malignancies. *Med Sci Monit* **2002**;8:70-77
62. Millward M, Newell D, Yuen K, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of prolonged oral etoposide in women with metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **1995**;37:161-167

## Literaturverzeichnis

---

63. Sprinz E, Caldas A, Mans D, et al. Fractionated doses of oral etoposide in the treatment of patients with AIDS-related Kaposi sarcoma. *Am J Clin Oncol* **2001**;24:177-184
64. Allen L, Tejada F, Okonmah A, Nordqvist S. Combination chemotherapy of the epipodophyllotoxin derivatives, teniposide and etoposide: A pharmacodynamic rationale ? *Cancer Chemother Pharmacol* **1982**;7:151-156
65. van Tellingen O, Kuck M, Vlasveld L, Rodenhuis S, Nooijen W, Beijen J. Unchanged pharmacokinetics of etoposide given by intra-arterial hepatic infusion as compared with i.v. infusion. *Cancer Chemother Pharmacol* **1996**;38:387-390
66. Aydiner A, Koyuncu H, Tas F, Topuz E, Disci R. Crossover clinical study comparing the pharmacokinetics of etoposide (75 mg) administered as 25-mg capsules three times a day versus once a day. *Int J Clin Pharm Res* **2000**;XX:21-30
67. Harvey V, Slevin M, Smythe M, Johnston A, Wrigley P. Variable bioavailability following repeated oral doses of etoposide. *Eur J Cancer Clin Oncol* **1985**;21:1315-1319
68. van der Gaast A, Vlastuin M, Kok T, Splinter T. What is the optimal dose and duration of treatment with etoposide ? II. Comparative pharmacokinetic study of three schedules: 1x100 mg, 2x50 mg, and 4x25 mg of oral etoposide daily for 21 days. *Semin Oncol* **1992**;19:8-12
69. Knochenhauer Liliemark E, Liliemark J, Petterson B, Gruber A, Björkholm M, Peterson C. In vivo accumulation of etoposide in peripheral leukemic cells in patients treated for acute myeloblastic leukemia; relation to plasma concentrations and protein binding. *Leukemia and Lymphoma* **1993**;10:323-328
70. Rich T, Allen R, Wyllie A. Defying death after DNA damage. *Nature* **2000**;407:777-783
71. Karran P. DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev* **2000**;10:144-150
72. Khanna K, Jackson S. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* **2001**;27:247-254

## Literaturverzeichnis

---

73. Iliakis G, Wang H, Perrault A, et al. Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res* **2004**;104:14-20
74. Hopfner K-P, Putnam C, Tainer J. DNA double-strand break repair from head to tail. *Curr Opin Struct Biol* **2002**;12:115-122
75. Doherty A, Jackson S. DNA repair: How Ku makes ends meet. *Curr Biol* **2001**;11:R920-R924
76. Walker J, Corpina R, Goldberg J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* **2001**;412:607-614
77. Smith G, Jackson S. The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev* **1999**;13:916-934
78. Ramsden D, Gellert M. Ku protein stimulates DNA end joining by mammalian DNA ligases: a direct role for Ku in repair of DNA double-strand breaks. *EMBO J* **1998**;17:609-614
79. Wang H, Zeng Z-C, Bui T, et al. Efficient rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in vertebrate cells deficient in genes of the RAD52 epistasis group. *Oncogene* **2001**;20:2212-2224
80. Wang H, Zeng Z-C, Perrault A, Cheng X, Qin W, Iliakis G. Genetic evidence for the involvement of DNA ligase IV in the DNA-PK-dependent pathway of non-homologous end joining in mammalian cells. *Nucl Acids Res* **2001**;29:1653-1660
81. Perrault R, Wang H, Wang M, Rosidi B, Iliakis G. Backup pathways of NHEJ are suppressed by DNA-PK. *J Cell Biochem* **2004**;92:781-794
82. Wang H, Rosidi B, Perrault R, et al. DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Res* **2005**;65:4020-4030
83. Daboussi F, Dumay A, Delacôte F, Lopez B. DNA double-strand break repair signalling: The case of RAD51 post-translational regulation. *Cell Signal* **2002**;14:969-975
84. Flygare J, Benson F, Hellgren D. Expression of the human RAD51 gene during the cell cycle in primary human peripheral blood lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* **1996**;1312:231-236

## Literaturverzeichnis

---

85. Haaf T, Golub E, Reddy G, Readdin C, Ward D. Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *PNAS* **1995**;92:2298-2302
86. Liu Y, Maizels N. Coordinated response of mammalian Rad51 and Rad52 to DNA damage. *EMBO Rep* **2000**;1:85-90
87. Tsuzuki T, Fujii Y, Sakumi K, et al. Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *PNAS* **1996**;93:6236-6240
88. Essers J, Hendriks R, Swagemakers S, et al. Disruption of mouse RAD54 reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination. *Cell* **1997**;89:195-204
89. Rijkers T, Van Den Ouweland J, Morolli B, et al. Targeted inactivation of mouse RAD52 reduces homologous recombination but not resistance to ionizing radiation. *Mol Cell Biol* **1998**;18:6423-6429
90. Baumann P, West S. Role of human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends Biochem Sci* **1998**;23:247-251
91. Van Dyck E, Stasiak A, Stasiak A, West S. Binding of double strand breaks in DNA by human Rad52 protein. *Nature* **1999**;398:728-731
92. Zgheib O, Huyen Y, DiTullio jr. R, et al. ATM signaling and 53BP1. *Radiother Oncol* **2005**;76:119-122
93. Bakkenist C, Kastan M. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **2003**;421:499-506
94. Li W, Hesabi B, Babbo A, et al. Regulation of double-strand break-induced mammalian homologous recombination by UBL1, a RAD51-interacting protein. *Nucl Acid Res* **2000**;28:1145-1153
95. Flygare J, Armstrong R, Wennborg A, Orsan S, Hellgren D. Proteolytic cleavage of HsRad51 during apoptosis. *FEBS Lett* **1998**;427:247-251
96. Israels L, Israels E. Apoptosis. *Oncologist* **1999**;4:332-339
97. Coultas L, Strasser A. The molecular control of DNA damage-induced cell death. *Apoptosis* **2000**;5:491-507

## Literaturverzeichnis

---

98. Götz C, Montenarh M. Das Wachstumssuppressorprotein p53 - Von der Grundlagenforschung bis zur klinischen Anwendung. In: *magazin forschung*: Universitaet des Saarlandes, **1998**:43-48
99. Kao G, McKenna W, Yen T. Detection of repair activity during the DNA damage-induced G2 delay in human cancer cells. *Oncogene* **2001**;20:3486-3496
100. Dunkern T, Wedemeyer I, Baumgärtner M, Fritz G, Kaina B. Resistance of p53 knockout cells to doxorubicin is related to reduced formation of DNA strand breaks rather than impaired apoptotic signaling. *DNA Repair* **2003**;2:49-60
101. Hansen L, Lundin C, Spang-Thomsen M, Petersen L, Helleday T. The role of Rad51 in etoposide (VP-16) resistance in small cell lung cancer. *Int J Cancer* **2003**;105:472-479
102. Blasiak J, Widera K, Pertynski T. Hyperthermia can differentially modulate the repair of doxorubicin-damaged DNA in normal and cancer cells. *Acta Biochim Pol* **2003**;50:191-195
103. Dartsch D. Mechanisms of toxicity - Programmed cell death (apoptosis). In: *Toxicology*, **1999**:245-255 (Chapter 211)
104. Kerr J, Wyllie A, Currie A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **1972**;26:239-257
105. Wyllie A, Kerr J, Currie A. Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* **1980**;68:251-306
106. Wyllie A. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* **1997**;53:451-465
107. Nielsen D. Mechanisms and functional aspects of multidrug resistance in Ehrlich ascites tumour cells. *Dan Med Bull* **2004**;51:393-414
108. Kitazono M, Sumizawa T, Takebayashi Y, et al. Multidrug resistance and the lung resistance-related protein in human colon carcinoma SW-620 cells. *J Natl Cancer Inst* **1999**;91:1647-1653
109. Long B, Musial S, Brattain M. DNA breakage in human lung carcinoma cells and nuclei that are naturally sensitive or resistant to etoposide and teniposide. *Cancer Res* **1986**;46:3809-3816
110. Adachi N, Suzuki H, Iizumi S, Koyama H. Hypersensitivity of nonhomologous DNA end-joining mutants to VP-16 and ICRF-193:

- Implications for the repair of topoisomerase II-mediated DNA damage. *J Biol Chem* **2003**;278:35897-35902
111. Ayene I, Ford L, Koch C. Ku protein targeting by Ku70 small interfering RNA enhances human cancer cell response to topoisomerase II inhibitor and  $\gamma$  radiation. *Mol Cancer Ther* **2005**;4:529-536
112. Kim S, Kim D, Han J, et al. Ku autoantigen affects the susceptibility to anticancer drugs. *Cancer Res* **1999**;59:4012-4017
113. Shen H, Schultz M, Kruh G, Tew K. Increased expression of DNA-dependent protein kinase confers resistance to adriamycin. *Biochim Biophys Acta* **1998**;1381:131-138
114. Berger N, Chatterjee S, Schmotzer J, Helms S. Etoposide (VP-16-213)-induced gene alterations: Potential contribution to cell death. *PNAS* **1991**;88:8740-8743
115. Lim M, Liu L, Jacobson-Kram D, Williams J. Induction of sister chromatid exchanges by inhibitors of topoisomerases. *Cell Biol Toxicol* **1986**;2:485-494
116. Pommier Y, Zwelling L, Kao-Shan C-S, Whang-Peng J, Bradley M. Correlations between intercalator-induced DNA strand breaks and sister chromatid exchanges, mutations and cytotoxicity in chinese hamster cells. *Cancer Res* **1985**;45:3143-3149
117. Fadok V, Voelker D, Campbell P, Cohen J, Bratton D, Henson P. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* **1992**;148:2207-2216
118. van Heerde W, de Groot P, Reutelingsperger C. The complexity of the phospholipid binding protein annexin V. *Thromb Haem* **1995**;73:172-179
119. Durant S, Karran P. Vanillins - a novel family of DNA-PK inhibitors. *Nucleic Acids Res* **2003**;31:5501-5512
120. Raderschall E, Stout K, Freier S, Suckow V, Schweiger S, Haaf T. Elevated levels of Rad51 recombination protein in tumor cells<sup>1</sup>. *Cancer Res* **2002**;62:219-225
121. Ajmani A, Satoh M, Reap E, Cohen P, Reeves W. Absence of autoantigen Ku in mature human neutrophils and human

- promyelocytic leukemia line (HL-60) cells and lymphocytes undergoing apoptosis. *J Exp Med* **1995**;181:2049-2058
122. Blaise R, Alapetite C, Masdehors P, et al. High levels of chromosome aberrations correlate with impaired *in vitro* radiation-induced apoptosis and DNA repair in human B-chronic lymphocytic leukaemia cells. *Int J Radiat Biol* **2002**;78:671-679
123. Capranico G, De Isabella P, Penco S, Tinelli S, Zunino F. Role of DNA breakage in cytotoxicity of doxorubicin, 9-deoxydoxorubicin, and 4-demethyl-6-deoxydoxorubicin in murine leukemia P388 cells. *Cancer Res* **1989**;49:2022-2027
124. Salmena L, Lam V, McPherson J, Goldenberg G. Role of proteasomal degradation in the cell cycle-dependent regulation of DNA topoisomerase II $\alpha$  expression. *Biochem Pharmacol* **2001**;61:795-802
125. Chatterjee S, Trivedi D, Petzold S, Berger N. Mechanism of epipodophyllotoxin-induced cell death in poly(adenosine diphosphate-ribose) synthesis-deficient V79 Chinese hamster cell lines. *Cancer Res* **1990**;50:2713-2718
126. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* **2000**;267:5421-5426
127. Erb R, Ehlers M. Resazurin reducing time as an indicator of bovine semen capacity. *J Dairy Sci* **1950**;33:853-864
128. Vichi P, Tritton T. Stimulation of growth in human and murine cells by adriamycin. *Cancer Res* **1989**;49:2679-2682
129. Bertolatus J. Stimulation of glomerular epithelial cell growth by doxorubicin. *J Lab Clin Med* **1994**;124:827-836
130. Lau A, Li M, Xie R, He Q-Y, Chiu J-F. Opposed arsenite-induced signaling pathways promote cell proliferation or apoptosis in cultured lung cells. *Carcinogenesis* **2004**;25:21-28
131. Yu R, Shtil A, Tan T, Roninson I, Kong A. Adriamycin activates c-jun N-terminal kinase in human leukemia cells: a relevance to apoptosis. *Cancer Lett* **1996**;107:73-81
132. Osborn M, Chambers T. Role of the stress-activated/c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal protein kinase pathway in the cellular response to adriamycin



- and other chemotherapeutic drugs. *J Biol Chem* **1996**;271:30950-30955
133. Lundin C, Schultz N, Arnaudeau C, Mohindra A, Hansen L, Helleday T. RAD51 is involved in repair of damage associated with DNA replication in mammalian cells. *J Mol Biol* **2003**;328:521-535
134. Gieseler F, Bauer E, Nuessler V, Clark M, Valsamas S. Molecular effects of topoisomerase II inhibitors in AML cell lines: correlation of apoptosis with topoisomerase II activity but not with DNA damage. *Leukemia* **1999**;13:1859-1863
135. Petru E, Sevin B, Haas J, Ramos R, Perras J. A correlation of cell cycle perturbations with chemosensitivity in human ovarian cancer cells exposed to cytotoxic drugs *in vitro*. *Gynecol Oncol* **1995**;58:48-57
136. Zhu H, Smith C, Ansah C, Gooderham N. Responses of genes involved in cell cycle control to diverse DNA damaging chemicals in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Cancer Cell Int* **2005**;5
137. Theard D, Coisy M, Ducommun B, Concannon P, Darbon J. Etoposide and adriamycin but not genistein can activate the checkpoint kinase Chk2 independently of ATM/ATR. *Biochem Biophys Res Commun* **2001**;289:1199-1204
138. Kurosu T, Takahashi Y, Fukuda T, Koyama T, Miki T, Miura O. p38 MAP kinase plays a role in G2 checkpoint activation and inhibits apoptosis of human B cell lymphoma cells treated with etoposide. *Apoptosis* **2005**;10:1111-1120
139. Sak A, Stueben G, Groneberg M, Böcker W, Stuschke M. Targeting of Rad51-dependent homologous recombination: implications for the radiation sensitivity of human lung cancer cell lines. *Br J Cancer* **2005**;92:1089-1097
140. Huang Y, Nakada S, Ishiko T, et al. Role for caspase-mediated cleavage of Rad51 in induction of apoptosis by DNA damage. *Mol Cell Biol* **1999**;19:2986-2997
141. Flygare J, Hellgren D, Wennborg A. Caspase-3 mediated cleavage of HsRad51 at an unconventional site. *Eur J Biochem* **2000**;267:5977-5982

## Literaturverzeichnis

---

142. Henning W, Stürzbecher H-W. Homologous recombination and cell cycle checkpoints: Rad51 in tumour progression and therapy resistance. *Toxicology* **2003**;193:91-109
143. Flygare J, Falt S, Ottervald J, et al. Effects of HsRad51 overexpression on cell proliferation, cell cycle progression, and apoptosis. *Exp Cell Res* **2001**;268:61-69
144. Richardson C, Stark J, Ommundsen M, Jasin M. Rad51 overexpression promotes alternative double-strand break repair pathways and genome instability. *Oncogene* **2004**;23:546-553
145. Raderschall E, Bazarov A, Cao J, et al. Formation of higher-order nuclear Rad51 structures is functionally linked to p21 expression and protection from DNA degradation during apoptosis. *J Cell Sci* **2002**;115:153-164
146. Goedecke W, Eijpe M, Offenbergh H, van Aalderen M, Heyting C. Mre11 and Ku70 interact in somatic cells, but are differentially expressed in early meiosis. *Nat Genet* **1999**;23:194-198
147. Pastwa E, Blasiak J. Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochim Pol* **2003**;50:891-908
148. Jin S, Inoue S, Weaver D. Differential etoposide sensitivity of cells deficient in the Ku and DNA-PKcs components of the DNA-dependent protein kinase. *Carcinogenesis* **1998**;19:965-971
149. Dartsch D, Gieseler F. Repair of idarubicin-induced DNA damage - does it grant resistance? *eingereicht*
150. Adachi N, Iizumi S, So S, Koyama H. Genetic evidence for involvement of two distinct nonhomologous end-joining pathways in repair of topoisomerase II-mediated DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**;318:856-861
151. Deriano L, Guipaud O, Merle-Beral H, et al. Human chronic lymphocytic leukemia B cells can escape DNA damage-induced apoptosis through the nonhomologous end-joining DNA repair pathway. *Blood* **2005**;105:4776-4783
152. Sak A, Stuschke M, Wurm R, et al. Selective inactivation of DNA-dependent protein kinase with antisense oligodesoxynucleotides: Consequences for the rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks and radiosensitivity of human cancer cell lines. *Cancer Res* **2002**;62:6621-6624

## Literaturverzeichnis

---

153. Peng Y, Zhang Q, Nagasawa H, Okayasu R, Liber H, Bedford J. Silencing expression of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase by small interfering RNA sensitizes human cells for radiation-induced chromosome damage, cell killing and mutation. *Cancer Res* **2002**;62:6400-6404
154. Lio Y-C, Schild D, Brenneman M, Redpath J, Chen D. Human Rad51C deficiency destabilizes XRCC3, impairs recombination, and radiosensitizes S/G<sub>2</sub>-phase cells. *J Biol Chem* **2004**;279:42313-42320
155. Sonoda E, Sasaki M, Morrison C, Yamaguchi-Iwai Y, Takata M, Takeda S. Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells. *Mol Cell Biol* **1999**;19:5166-5169
156. Rapp A, Greulich K. After double-strand break induction by UV-A homologous recombination and nonhomologous end joining cooperate at the same DSB if both systems are available. *J Cell Sci* **2004**;117:4935-4945
157. Fachinformation Adrimedac, Fa. Medac, Hamburg und Fachinformation Vepesid J, Fa. Bristol-Myers Squibb, München
158. Sullivan D, Ross W. Resistance to inhibitors of DNA topoisomerases. *Cancer Treat Res* **1991**;57:57-99
159. Miller C, Kassem H, Pepper S, Hey Y, Ward T, Margison G. Mycoplasma infection significantly alters microarray gene expression profiles. *Biotechniques* **2003**;35:812-814
160. Singh N, McCoy M, Tice R, Schneider E. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* **1988**;175:184-191
161. Kobayashi H, Sugiyama C, Morikawa Y, Hayashi M, Sofuni T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun* **1995**;3:103-115
162. Tice R, Vasquez M. Protocol for the application of the pH>13 alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. In: Integrated Laboratory Systems (ILS), **1999**
163. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **1976**;72:248-254

## Literaturverzeichnis

---

164. Antalis T, Godbolt D. Isolation of intact nuclei from hematopoietic cell types. *Nucl Acid Res* **1991**;19:4301
165. Andrews N, Faller D. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucl Acid Res* **1991**;19:2499
166. Elbashir S, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **2001**;15:188-200
167. Harborth J, Elbashir S, Bechert K, Tuschl T, Weber K. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* **2001**;114:4557-4565
168. Hammond S, Bernstein E, Beach D, Hannon G. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **2000**;404:293-296
169. Liu J, Carmell M, Rivas F, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **2004**;305:1437-1441
170. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* **2004**;15:185-197
171. Zamore P, Tuschl T, Sharp P, Bartel D. RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **2000**;101:25-33
172. Zhu G, Gilchrist R, Borley N, et al. Reduction of TSG101 protein has a negative impact on tumor cell growth. *Int J Cancer* **2004**;109:541-547
173. Tapiero H, Fourcade A, Vaigot P, Farhi J. Comparative uptake of adriamycin and daunorubicin in sensitive and resistant Friend leukemia cells measured by flow cytometry. *Cytometry* **1982**;2:298-302

### Lebenslauf

#### Persönliche Daten

Name Ilona Schonn  
Geburtsdatum 02.08.1977  
Geburtsort Hamburg

#### Schulausbildung

1984 – 1988 Grundschule In der alten Forst, Hamburg  
1988 – 1997 Alexander von Humboldt-Gymnasium,  
Hamburg

#### Studium

1997 – 2001 Studium der Pharmazie an der Universität  
Hamburg  
Nov 2001 – Apr 2002 Pharmaziepraktikum in der Medio-Apotheke,  
Hamburg  
Mai 2002 – Okt 2002 Pharmaziepraktikum bei der Merck KGaA,  
Darmstadt, Abteilung für Qualitätskontrolle  
Dezember 2002 Approbation als Apothekerin

#### Promotion

2003 – 2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Universität  
Hamburg, Institut für Pharmazie, Betreuung des  
Praktikums „Qualitative Analyse der anorga-  
nischen Arznei-, Hilfs- und Schadstoffe“  
Anfertigung einer Dissertation unter der Leitung  
von Frau Dr. Dorothee Dartsch

#### Vorträge

Oktober 2005 Die Reparatur Topoisomerase II $\alpha$ -Inhibitor-  
induzierter DNA-Doppelstrangbrüche und ihre  
Bedeutung für die Therapie, Jahrestagung der  
Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft,  
Mainz