

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Labor für Strahlenbiologie und experimentelle Radioonkologie

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Kai Rothkamm

## Analyse der Temozolomid-Sensitivität von humanen Glioblastomzellen in Abhängigkeit von Mismatch-Reparatur und Replikationsstress

Dissertation

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

vorgelegt von:

Justus Maximilian Müller-Goebel  
aus Würzburg, Bayern

Hamburg 2019

Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am 26.08.2019.

Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD. Dr. Malter Kriegs

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD. Dr. Chia-Jung Busch

# Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung.....	6
II.	Summary.....	8
1.	Einleitung.....	10
1.1	Das Glioblastom.....	10
1.1.1	Charakterisierung und Epidemiologie.....	10
1.1.2	Einteilung von Hirntumoren nach WHO ( <i>World Health Organisation</i> ).....	11
1.1.2.1	Molekulare Pathologie und prognostische Faktoren.....	12
1.2	Diagnostik.....	14
1.3	Therapie.....	15
1.3.1	Operative Therapie.....	15
1.3.2	Adjuvante Strahlentherapie.....	16
1.3.3	Adjuvante Chemotherapie.....	16
1.3.3.1	Wirkmechanismus von Temozolomid.....	18
1.3.4	Weitere Therapiemöglichkeiten.....	20
1.4	DNA-Schäden und DNA-Reparatur.....	21
1.4.1	Erkennung von DNA-Schäden und die Schadensantwort der Zelle.....	21
1.4.2	Reparatur der DNA-Schäden.....	23
1.4.2.1	Reparatur von Strangbrüchen.....	23
1.4.2.2	Reparatur von Basenschäden.....	25
1.4.2.3	Alkyltransferase O <sup>6</sup> -methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT).....	26
1.4.2.4	Mismatch Reparatur (MMR).....	26
1.4.2.4.1	O <sup>6</sup> -methyl-Guanin-Läsion.....	27
1.4.3	Replikationsstress.....	28
1.5	Ziel dieser Arbeit.....	31
2.	Material.....	32
2.1	Zelllinien.....	32
2.2	Antikörper.....	33
2.2.1	Primäre Antikörper.....	33
2.2.2	Sekundäre Antikörper.....	35
2.3	siRNA.....	36
2.4	Zellmedien und Reagenzien.....	36
2.5	Puffer und Lösungen.....	37
2.6	Chemikalien.....	38
2.7	Verbrauchsmittel.....	40
2.8	Geräte.....	42

2.9 Software.....	44
3. Methoden .....	46
3.1 Zellbiologische Methoden .....	46
3.1.1 Zellagerung und Zellkultivierung .....	46
3.1.2 Wachstumskurven .....	47
3.1.3 Herstellung von Ganzzelllysaten.....	47
3.1.4 Koloniebildungstest.....	48
3.1.4.1 Bestimmung des Zellüberlebens nach TMZ-Behandlung.....	48
3.1.4.2 Bestimmung des Zellüberlebens nach MSH6- <i>Knockdown</i> und TMZ-Behandlung .....	49
3.1.4.3 Färbung und Analyse des Koloniebildungstests.....	49
3.1.5 Transfektion mit siRNA .....	49
3.2 Proteinbiochemische Methoden .....	50
3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	50
3.2.3 <i>Western Blot</i> .....	51
3.3 Durchflusszytometrische Methoden .....	51
3.3.1 Analyse der Zellzyklusverteilung .....	52
3.4 Statistische Verfahren.....	52
4. Ergebnisse.....	53
4.1 Analyse der TMZ-Sensitivität von GBM-Zelllinien .....	53
4.1.1 MGMT-Expression in GBM-Zelllinien .....	53
4.1.2 TMZ-Sensitivität von MGMT-positiven und MGMT-negativen GBM-Zelllinien .....	54
4.1.3. Einfluss des MSH6- <i>Knockdown</i> auf die TMZ-Sensitivität.....	55
4.1.4 Einfluss von TMZ auf das klonogene Zellüberleben bei MGMT-negativen GBM-Zelllinien .....	56
4.2 Einfluss der Expression von MMR-Proteinen auf die TMZ-Sensitivität von GBM-Zelllinien ..	59
4.2.1 Analyse der basalen MMR-Proteinexpression in GBM-Zelllinien.....	59
4.2.2 Zusammenhang zwischen der MMR-Proteinexpression und der TMZ-Sensitivität.....	61
4.3 Einfluss von TMZ auf die Proliferation und die Zellzyklusverteilung von GBM-Zelllinien .....	63
4.3.1 Einfluss von TMZ auf das Proliferationsverhalten von GBM-Zelllinien .....	63
4.3.2 Einfluss von TMZ auf die Zellzyklusverteilung von GBM-Zelllinien .....	65
4.4 Einfluss der Expression von DDR- und Replikationsstressproteinen auf die TMZ-Sensitivität von GBM-Zelllinien .....	68
4.4.1 Analyse der Expression von DDR- und Replikationsstressproteinen in GBM-Zelllinien... 69	
4.4.2 Zusammenhang zwischen DDR- und Replikationsstress Proteinexpression und TMZ-Sensitivität.....	72
5. Diskussion.....	75
5.1 Analyse der TMZ-Sensitivität von humane GBM-Zelllinien .....	75

5.2. Einfluss der MMR-Proteinexpression auf die TMZ-Sensitivität in humanen GBM-Zelllinien.	77
5.3. Einfluss von TMZ auf die Proliferation und den Zellzyklus von humanen GBM-Zelllinien ....	82
5.4 Einfluss der Expression von Proteinen der DNA-Schadensantwort und der Replikations-Stressantwort auf die TMZ-Sensitivität.....	85
5.5 Ausblick.....	88
III. Abkürzungsverzeichnis.....	89
6. Literaturverzeichnis .....	95
6.1 Literaturquellen .....	95
6.2 Internetquellen.....	104
7. Danksagung.....	105
8. Lebenslauf.....	106
9. Eidesstattliche Versicherung.....	108

## I. Zusammenfassung

Das Glioblastom (GBM) ist der häufigste maligne Hirntumor im Erwachsenenalter und geht mit einer infausten Prognose einher. Die Lebenserwartung liegt nach Diagnosestellung unter leitliniengerechter Standardtherapie bei ca. 14 Monaten. Ein besseres Therapieansprechen und verlängertes Gesamtüberleben ist bei Patienten mit O<sup>6</sup>-methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Promoter methylierten Tumoren zu erwarten. Da nur wenige biologische Marker für das GBM bekannt sind, welche mit einem verbesserten Therapieansprechen und einem erhöhten Gesamtüberleben (OAS) assoziiert werden, gilt es weitere Marker zu identifizieren.

Es ist bekannt, dass die Wirkung von Temozolomid (TMZ) durch eine funktionelle *Mismatch-Reparatur* (MMR) vermittelt wird. Hierbei entstehen nach vergeblicher Fehlpaarung von Thymin gegenüber der methylierten Base O<sup>6</sup>-methyl-Guanin (O<sup>6</sup>-meG) in Abhängigkeit des darauffolgenden Replikationszyklus letale Doppelstrangbrüche (DSBs). Es ist jedoch noch nicht abschließend geklärt, welchen prädiktiven Wert die MMR-Proteinexpression in einem heterogenen Zellmodell im Ansprechen auf TMZ hat. Darüber hinaus zeigte sich in Vorarbeiten von Struve, dass in isogenetischen MGMT-negativen GBM-Zellen, die eine konstitutive Variante des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFRvIII) exprimieren, eine gesteigerte Sensitivität gegenüber TMZ im Vergleich zu EGFRvIII-negativen Zellen bestand. In den TMZ-sensitiven EGFRvIII-positiven Zellen konnte darüber hinaus ein erhöhter Replikationsstress detektiert werden.

Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit der Zusammenhang zwischen der MMR-Proteinexpression sowie der Expression der DNA-*damage response* (DDR)- und der Replikationsstressproteine in Bezug auf die TMZ-Sensitivität in einem heterogenen Zellmodell von zehn MGMT-negativen GBM-Zelllinien untersucht werden. Darüber hinaus sollte ermittelt werden, ob diese Faktoren als prädiktive Biomarker für das Ansprechen von TMZ etabliert werden können.

Trotz ausgeprägter inhibitorischer Effekte von TMZ auf die Proliferation, zeigte sich in den MGMT-negativen GBM-Zelllinien ein sehr heterogenes Ansprechen im klonogenen Zellüberleben nach TMZ-Behandlung. Die Proteinexpression der MMR-Proteine (MSH2, MSH6, MLH1 und PMS2) variierte stark in den untersuchten GBM-Zelllinien. Ein *Knockdown* des MMR-Protein MSH6 führte in der TMZ-sensitiven GBM-Zelllinie LN229 zur Resistenzsteigerung gegenüber TMZ, jedoch konnte keine statistisch relevante Korrelation zwischen der MMR-Proteinexpression und dem zellulären Überleben in dem betrachteten heterogenen Zellmodell nach Behandlung mit TMZ festgestellt werden. Eine signifikante

Korrelation der Expression wurde jedoch für die Dimerisierungspartner von MutS $\alpha$  (MSH2 und MSH6) und MutL $\alpha$  (MLH1 und PMS2) zueinander ermittelt. Die Detektion des Replikationsstresses in den GBM-Zellen erfolgte mittels *Western Blot*. Alle untersuchten Proteine standen in Zusammenhang mit Replikationsstress oder der resultierenden DDR. Es zeigte sich ebenfalls eine heterogene Expression der Replikationsstressproteine in dem betrachteten Zellmodell. Eine Korrelation mit der TMZ-Sensitivität bestand ausschließlich für den Aktivitätsindex von pATR/ATR.

Es konnte in dieser Arbeit keine statistisch relevante Korrelation in dem betrachteten heterogenen Zellmodell von MGMT-negativen GBM-Zelllinien zwischen der MMR-Proteinexpression und der Expression von DDR- und Replikationsstressproteinen in Bezug auf das Ansprechen von TMZ hergestellt werden. Die untersuchten Einflussfaktoren eignen sich folglich in diesem Zellmodell nicht als prädiktive Marker für ein suffizienteres Ansprechen von MGMT-negativen GBM-Zellen auf TMZ.

## II. Summary

Glioblastomas (GBM) are the most common malignant brain tumours in adults and are related to an unfavourable prognosis. In average, the survival after diagnosis under standard treatment is limited to approximately 14 months. A better prognosis is linked to the methylation of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-Methyltransferase (MGMT)-gene in patients' tumour. Currently there are only a limited number of biological markers available that predict response to therapy and are associated with a prolonged overall survival (OAS). Therefore, it is of high interest to identify additional marker in the nearest future.

It is known that the mismatch repair (MMR) is a key factor in the mechanism of action of Temozolomide (TMZ), which generates double strand breaks (DSBs) in the upcoming round of replication after futile mispairing of thymine on the opposite side of the methylated base O<sup>6</sup>-methyl-Guanin (O<sup>6</sup>-meG). But until now it remains unclear which predictive value the expression of MMR-protein compromises in the response to TMZ in a heterogeneous cell model. Furthermore, previous work of Struve had shown that isogenetic MGMT-negative GBM cells, which express the epidermal growth factor receptor (EGFR) deletion mutant EGFRvIII, also display an increased sensitivity towards TMZ, compared to EGFRvIII-negative cells. Furthermore, the EGFRvIII-positive cells presented increased replication stress compared to their EGFRvIII- counterpart.

In this context, the MMR-protein expression as well as the expression of replication stress protein and DNA-damage response (DDR) proteins were analysed in a heterogeneous cell model of ten MGMT-negative GBM cell lines towards their relation to TMZ-sensitivity. Furthermore, it was analysed if the expression of these proteins could predict TMZ response and serve therefore as biological markers for therapy response.

Although strong inhibitory effects of TMZ on proliferation were noticed, all MGMT-negative cell lines however displayed a heterogeneous response towards TMZ-treatment. Additionally, the expression of the relevant MMR-proteins (MSH2, MSH6, MLH1 and PMS2) showed a strong variability within all analysed cell lines. Although a knockdown of the MMR-protein MSH6 in one of the TMZ-sensitive cell lines (LN229) led to an increase in TMZ-resistance, no correlation was observed between the MMR-protein expression and TMZ sensitivity. Nevertheless, a significant correlation was observed, considering the protein expression of the dimerization partners of MutL $\alpha$  (MSH2 and MSH6) and MutL $\alpha$  (MLH1 and PMS2).

Replication stress was detected by western blot analysis. All investigated proteins were related to replication stress or the consecutive DDR. A diverse range of protein expression was



observed throughout all cell lines. Except the activity index of pATR/ATR, no significant coherence could be found regarding TMZ-sensitivity.

Altogether, this thesis was unable to provide any statistically relevant relation between MMR-protein expression or expression of DDR- and replication stress proteins regarding TMZ sensitivity in a heterogenic MGMT-negative cell model of ten human GBM cell lines. Therefore, the investigated factors cannot serve as predictive markers for TMZ response in this cell model.

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Glioblastom

### 1.1.1 Charakterisierung und Epidemiologie

Das Glioblastom (GBM) ist der häufigste maligne Hirntumor im Erwachsenenalter (Brandes *et al.*, 2008) und zählt zu der Gruppe der Gliome (Gruppe der neuroepithelialen Tumoren). Das GBM hat eine sehr schlechte klinische Prognose. Die mittlere Überlebenszeit der Erkrankung, nach Diagnosestellung und unter leitliniengerechter Therapie liegt mit ca. 14 Monaten sehr niedrig und endet immer letal (Stupp *et al.*, 2005). Das GBM ist ein primärer hirneigener Tumor, der als WHO-Grad IV eingestuft wird (Louis *et al.*, 2016). Unter primären Hirntumoren versteht man benigne oder maligne Neubildungen, deren Ursprung in der Gehirnschubstanz selbst oder den sie umgebenden Meningen liegt. Primäre GBMs werden auch als GBM IDH (Isocitrat-Dehydrogenase) *wildtyp* bezeichnet und entstehen *de novo* zumeist aus entarteten Astrozyten. Sekundäre GBMs hingegen, welche ebenfalls zu den primären Hirntumoren gezählt werden, erhielten ihre Bezeichnung aufgrund einer Entwicklung aus einem diffusen- (WHO-Grad II) oder anaplastischen Astrozytom (WHO-Grad III) durch weitere Mutationen im zeitlichen Verlauf. Sekundäre GBMs, werden seit 2016 nach ihrem Molekularstatus als GBM IDH *mut* bezeichnet (Louis *et al.*, 2016). Sie machen nur einen geringen Prozentsatz von 5 % an der Gesamtzahl der GBMs aus (Ohgaki und Kleihues, 2005a). Beide Formen lassen sich sowohl molekularpathologisch als auch durch ihr Manifestationsalter voneinander unterscheiden (Ohgaki und Kleihues, 2013). GBMs sind zumeist supratentoriell lokalisiert, d.h. oberhalb des Segels, welches die Kleinhirnschädelgrube begrenzt, im fronto-temporalen Bereich des Gehirns (Wirsching *et al.*, 2016). Sie wachsen diffus und inhomogen in das umliegende Gewebe, was eine komplette Resektion unmöglich macht (Brandes *et al.*, 2008). Das mittlere Erkrankungsalter primärer GBM-Patienten liegt bei 62 Jahren (Ohgaki und Kleihues, 2013), prinzipiell ist jedoch eine Erkrankung in jedem Lebensalter möglich. Die Erkrankung manifestiert sich bei Männern häufiger als bei Frauen (Ohgaki und Kleihues, 2005a). Ausgenommen einer unmittelbaren Exposition durch ionisierende Strahlung, bspw. nach adjuvanter Strahlentherapie oder in seltenen Fällen durch eine prädisponierende erbliche Komponente, sind bis zum heutigen Zeitpunkt keine Risikofaktoren für die Entstehung von diesen Hirntumoren hinreichend belegt (Bondy *et al.*, 2008). Das Auftreten im Rahmen syndromaler Erkrankungen liegt bei unter 5 %, bspw. als Begleitleiden von Neurofibromatose

Typ I, II oder dem Turcot-Syndrom (Ohgaki und Kleihues, 2005b). Es gibt keine konkreten Frühsymptome, lediglich unspezifische Zeichen wie z.B. Kopfschmerzen, Wesensveränderungen, Hirndruckzeichen, epileptische Anfälle oder neu aufgetretene fokale Ausfälle lassen einen intrakraniellen Prozess erahnen (Alentorn *et al.*, 2016). Mit einer Inzidenz von 8,3/100.000 und einer Fallzahl von 6700 Erkrankten im Jahre 2014 in Deutschland (Zentrum für Krebsregisterdaten-RKI) gehören maligne Hirntumoren (ICD C71) dennoch zu den selteneren Tumorerkrankungen. Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es keine kausale Therapie für das GBM. Je nach molekularpathologischem Status des Tumors ist jedoch ein besseres Ansprechen auf die verfügbaren Therapieoptionen zu beobachten (Hegi *et al.*, 2005).

### 1.1.2 Einteilung von Hirntumoren nach WHO (*World Health Organisation*)

Die Einteilung von Hirntumoren erfolgt histomorphologisch und molekularpathologisch mittels WHO-Klassifikation (Louis *et al.*, 2016). Die Gradierung nach WHO ist für die jeweilige Tumorentität spezifisch und wird als WHO-Grad I bis WHO-Grad IV angegeben (s. Tab. 1). Entscheidend für die Gradierung ist die jeweilige Dignität des Tumors. Hierbei spielt das Wachstumsverhalten, die Abgrenzbarkeit, der Differenzierungsgrad, Zelltypen sowie der klinische Verlauf eine entscheidende Rolle (Louis *et al.*, 2007). Pilozytische Gliome, welche als WHO-Grad I klassifiziert sind, werden aufgrund ihrer histopathologischen Eigenschaften als benigne Tumoren eingestuft. Sie treten gehäuft im Kindesalter auf, wachsen nicht diffus infiltrativ (Forst *et al.*, 2014) und unterscheiden sich im Wesentlichen zu WHO II-IV Gliomen durch eine potentielle Kurierbarkeit mittels chirurgischer Resektion (Schackert *et al.*, 2006). Sie werden, ebenso wie WHO-Grad II Tumore als *low-grade-glioma* Tumore bezeichnet (Forst *et al.*, 2014). WHO-Grad III-IV Gliome werden als *high-grade-glioma* klassifiziert. Unterscheidungskriterien, und damit obligat für die Diagnose eines GBM (WHO IV), im Vergleich zu anaplastischen Astrozytomen (WHO III) sind neben Nekroseherden, mikrovaskuläre Proliferationen im Tumorgewebe (Wirsching *et al.*, 2016). Das *Grading* dient in Zusammenschau mit weiteren Faktoren, wie dem Karnofsky-Index und radiologischen Befunden, der Therapieentscheidungsfindung und Prognoseeinschätzung (Louis *et al.*, 2007). Bis 2016 wurden überwiegend histologische Malignitätskriterien zur Klassifikation von Hirntumoren genutzt. In der überarbeiteten 4. Auflage der Klassifikation von „Tumore des zentralen Nervensystems“ der WHO, fließen erstmals molekularpathologische Marker mit in die Tumorklassifikation und Namensgebung ein (Louis *et al.*, 2016). Hierbei werden für Gliome unter anderem der IDH I/II-Status, die 1p/19q-Kodeletion und der H3-K27M-Status

bestimmt. Ist eine molekularpathologische Einteilung aufgrund einer mangelhaften Probe oder eines uneindeutigen Ergebnisses nicht möglich, wird dies mit NOS (*not otherwise specified*) gekennzeichnet (Louis *et al.*, 2016). Mit der Einführung dieser Nomenklatur wurde die Beschreibung der GBMs aktualisiert und präzisiert. Das vorherige als *de novo* benannte GBM wird nun aufgrund der molekularpathologischen Diagnostik als GBM IDH *wildtype* bezeichnet. Das sekundäre GBM wird von der Bezeichnung GBM IDH *mut* abgelöst. Hinzu werden optional weitere Mutationen im Namen angegeben.

**Tab. 1: Histologische Gradierung von Gliomen nach WHO.**

WHO-Grad	Eigenschaften des Tumors
WHO-Grad I	benigne, scharf begrenzt, nicht infiltrativ wachsend langsameres Tumorwachstum gute Prognose, durch Resektion in >90 % heilbar
WHO-Grad II	benigne mit Tendenz zu maligner Entartung/Progredienz langsameres Tumorwachstum diffus infiltrativ wachsend mittlere Überlebenszeit: >5 Jahre
WHO-Grad III	maligne, diffus infiltrativ progredientes Wachstum schnelles Tumorwachstum mittlere Überlebenszeit: 2-3 Jahre
WHO-Grad IV	hoch maligne, diffus infiltrativ wachsend zentrale Gewebnekrosen, mikrovaskuläre Proliferation sehr schnelles Tumorwachstum schlechte Prognose, mittlere Überlebenszeit: 12-14 Monate

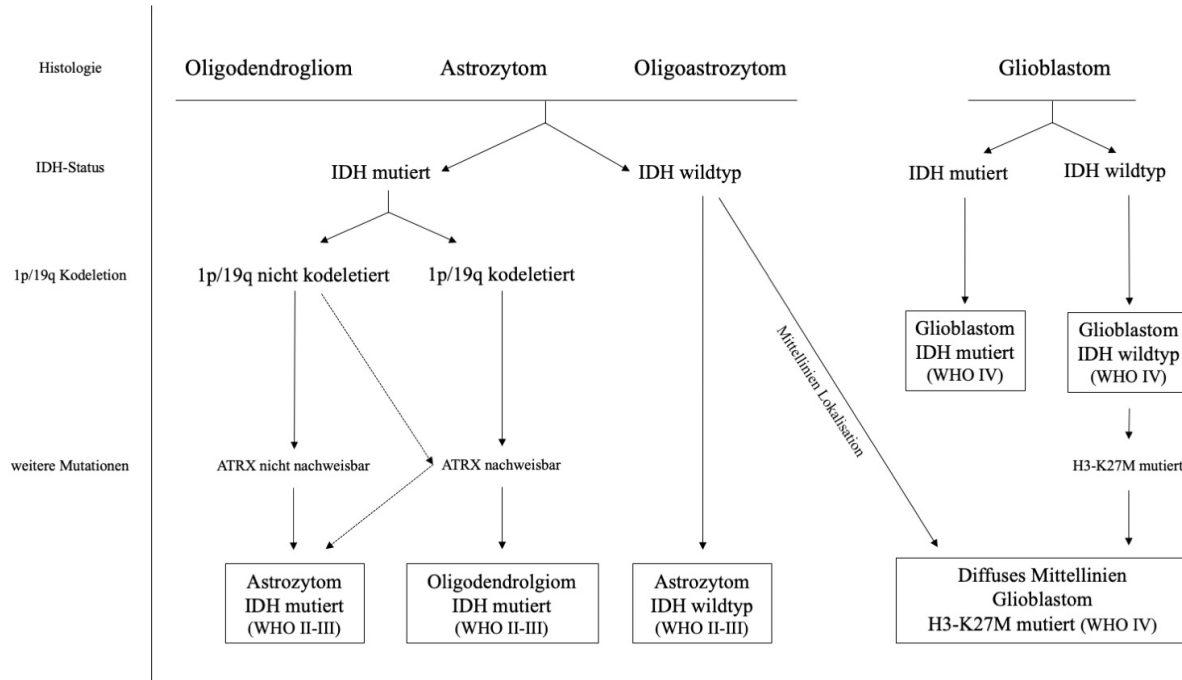
Modifiziert nach Kostron *et Rössler* 2006 und Louis *et al.* 2007.

#### 1.1.2.1 Molekulare Pathologie und prognostische Faktoren

Wie bereits in Abschnitt 1.1.2 erwähnt, nimmt die molekularpathologische Beurteilung zunehmend Einfluss auf die Unterteilung der Tumorentitäten und findet sich in der aktuellen, seit 2016 gültigen WHO-Klassifikation wieder (Louis *et al.*, 2016). Es ist von großer Bedeutung Biomarker zu identifizieren und diese zur verbesserten Therapieplanung einzusetzen. Jedoch

gibt es nur eine geringe Zahl an prognostischen Markern, welche mit einem besseren Überleben assoziiert werden und in der klinischen Praxis Anwendung finden. Die O<sup>6</sup>-methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) ist hierbei ein seit langem genutzter prognostischer Marker, welcher bei einem methylierten Promotorstatus mit einer besseren Prognose unter Standardtherapie assoziiert ist (Hegi *et al.*, 2005). Darüber hinaus spielen der IDH1/2-Status, die 1p/19q-Kodeletion und der H3-K27M-Status eine tragende Rolle. Abbildung 1 veranschaulicht die molekularpathologischen Marker und ordnet sie der jeweiligen Tumorentität zu. Die IDH ist ein Enzym des Citratzyklus. Es wird angenommen, dass eine Mutation der IDH1/2 zu Beginn der Tumorprogression auftritt (Watanabe *et al.*, 2009), gefolgt von weiteren Mutationen wie dem *loss of heterozygosity* (LOH) 1p/19q oder der *TP53* Mutation. Liegt eine *gain-of-function* Mutation vor, wird hierdurch der Metabolismus der Zelle durch vermehrte Produktion des 2-Hydroxy-Glutarat (2-HG) Onkometaboliten beeinflusst (Xu *et al.*, 2011). Ein Tumor wird als IDH *wildtyp* bezeichnet, wenn eine negative R132H IDH Immunhistochemie vorliegt und keine Mutationen im Codon 132 (IDH1) oder 172 (IDH2) mittels Sequenzierung detektiert wurden (Ohgaki und Kleihues, 2013). Eine Mutation im Codon 132 oder 172 ist mit einer besseren Prognose vergesellschaftet (Parsons *et al.*, 2008). Sie findet sich meist bei jungen Patienten mit einem WHO-Grad II-III Hirntumor bzw. Vorläufertumoren eines GBM (Nobusawa *et al.*, 2009). Primäre GBMs besitzen in weniger als 5 % eine IDH-Mutation. In GBM IDH *wildtype* treten vermehrt PTEN-Mutationen, ein LOH 10q-Status und eine *epidermal growth factor receptor* (EGFR)-Amplifikation auf (Nobusawa *et al.*, 2009). Eine EGFR-Amplifikation liegt bei 40-60 % der GBMs vor (Ohgaki und Kleihues, 2013). Die Kodeletion 1p/19q ist die Konsequenz einer unbalancierten Translokation (Jenkins *et al.*, 2006) und hat einen LOH zur Folge. Sie tritt meistens in Oligodendrogliomen in Kombination mit einer IDH-Mutation auf und gilt als prognostisch günstiger Marker für ein Ansprechen auf das PCV-Schema (Cairncross *et al.*, 2013). Sie wird mittels FISH (Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung) oder PCR (*polymerase-chain-reaction*) analysiert und ist *per definitionem* nicht mit einem WHO-Grad IV GBM vereinbar (Wirsching *et al.*, 2018). ATRX ist ein weiterer molekularpathologischer Marker, der fakultativ bei IDH mutierten Gliomen analysiert werden kann und zur weiteren Einteilung der Tumorentität beiträgt. Astrozytome besitzen zumeist einen IDH *mut* und einen ATRX *mut* Status. Die Mutation des Histon 3 ist charakteristisch für eine neu klassifizierte Entität, eines zumeist im Kindesalter auftretenden Glioms. Ungeachtet der Histologie, wird das mittelliniennah (Thalamus, Hirnstamm oder Rückenmark) lokalisierte Gliom als *diffuse-midline-glioma* bezeichnet und dem WHO-Grad IV zugeordnet (Louis *et al.*, 2016). H3-K27M beschreibt dabei die Mutation des Histon 3

codierenden Gens. Die Mutation ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Khuong-Quang *et al.*, 2012). Unterscheiden sich die histologischen Kriterien von den molekularpathologischen, dient stets die Molekular Diagnostik der Klassifikation des Tumors (Louis *et al.*, 2016).



**Abb. 1: Molekularpathologische Einteilung von Gliomen.** Modifiziert nach Louis *et al.* 2016 und DGHO Leitlinie 2017.

## 1.2 Diagnostik

Neben der Eigen- und Fremdanamnese des Patienten sowie klinischer Symptome, die auf einen Hirntumor hinweisen können, gilt bei dringendem Verdacht auf intrakranielle Prozesse vor allem die Bildgebung des Schädels mittels Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) in Kombination mit Kontrastmittel als Mittel der Wahl. Weitere bildgebende Verfahren (z.B. Aminosäuren-PET) können im Einzelfall nützlich sein (Weller *et al.*, 2017). Das GBM stellt sich im konventionellen Kontrastmittel-MRT durch eine typische girlandenförmige Kontrastmittelaufnahme dar (Weller *et al.*, 2006). Auf den Bildern lässt sich eine heterogene Aufhellung mit zentraler Nekrose und einem fokal umgebenden Ödem erkennen (Omuro, 2013), was auf die Tumor assoziierte Neovaskularisation sowie eine defekte Blut-Hirn-Schranke zurückzuführen ist (Weller *et al.*, 2006). Eine bessere Differenzierung von *low-* und *high-grade-glioma* gelingt mittels diffusionsgewichteter MRT (Hakyemez *et al.*, 2005). Die weitere nichtinvasive Diagnostik umfasst eine Elektroenzephalographie (EEG) und ein neuropsychologisches *Assessment*, welches vor allem

im Rahmen der Verlaufsbeurteilung eine wichtige Rolle spielt. Eine Liquorpunktion kann für den Fall infektiöser Differentialdiagnosen in Betracht gezogen werden (Leitlinie DGHO 2017). Obligat hingegen ist eine Probengewinnung. Diese erfolgt im Idealfall diagnostisch und therapeutisch zugleich, wobei intraoperativ das suspekte Gewebe makroskopisch reseziert wird. Ist der Tumor aufgrund seiner Lage schlecht zugänglich oder der Patient wegen seines Allgemeinzustandes nicht operabel, kann eine stereotaktische Biopsiegewinnung in Betracht gezogen werden. Diese dient der Diagnosesicherung durch histomorphologische und molekulardiagnostische Beurteilung und damit der Klassifikation und dem *Grading* nach WHO. Anhand der ausgewerteten Probe schließt sich, unter Einbeziehung des Alters und des Allgemeinzustandes des Patienten, die in Abbildung 2 gezeigte weiterführende Therapieplanung an (Weller *et al.*, 2017, 2009; Wirsching *et al.*, 2018).

### 1.3 Therapie

Die Therapie bei Hirntumoren besteht aus drei Grundpfeilern. Diese beinhalten die chirurgische Resektion des Tumorgewebes, die Bestrahlung des resezierten Tumorbettes und die systemische medikamentöse Therapie. In Einzelfällen oder bei Rezidiven ergeben sich durch experimentelle Ansätze im Rahmen von Studien weitere optionale Therapiemöglichkeiten.

#### 1.3.1 Operative Therapie

Vor der chirurgischen Intervention findet zumeist eine symptomatische Behandlung mit Dexamethason (DXM) zur antiödematösen Therapie statt (Omuro, 2013). Primär wird eine Resektion des suspekten Gewebes angestrebt. Eine makroskopisch, möglichst ausgedehnte Resektion des Tumorgewebes hat unter anderem eine Entlastung der komprimierten Gehirnstrukturen zur Folge, was zu einer Besserung der klinischen Symptome führt. Durch die Resektion des malignen Gewebes wird eine Verlängerung der Lebenserwartung sowie eine Reduktion des Steroidbedarfs angestrebt (Batash *et al.*, 2017). Sowohl *low-* als auch *high-grade* Gliome profitieren im Hinblick auf das Überleben von einer umfassenden Resektion (Y. M. Li *et al.*, 2016). Dabei wird der Zugewinn an Überlebenszeit bei *low-grade* Gliomen auf eine verzögerte Malignitätstransformation zurückgeführt (Sanai und Berger, 2008). Eine präoperative Gabe von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA), einer unter Blaulicht sichtbaren Aminosäure, die in Tumorzellen akkumuliert, kann zu einem suffizienteren Resektionsergebnis beitragen und sich vorteilhaft auf das postoperative progressionsfreie Überleben der Patienten

auswirken (Stummer *et al.*, 2006). Sollte eine Operation aufgrund der Lage oder Ausdehnung nicht sinnvoll sein, ist eine stereotaktische Biopsie zu präferieren. Eine entscheidende Rolle bei dieser Entscheidung spielen die Verfassung und das Alter der Patienten (Weller *et al.*, 2009). Das gewonnene Gewebe dient der Diagnostik und damit der Sicherung der Verdachtsdiagnose. Alle weiteren Therapieentscheidungen werden im Anschluss an die histomorphologische und molekulargenetische Diagnostik und in Abhängigkeit des WHO-Grades getroffen. Lediglich bei einem pilozytischen Astrozytom (WHO-Grad I) kann eine alleinige Resektion als kurativer Ansatz erfolgen (Forst *et al.*, 2014). Abbildung 2 zeigt stellvertretend für die Gliome die möglichen weiteren Therapieschritte nach operativer Intervention.

### 1.3.2 Adjuvante Strahlentherapie

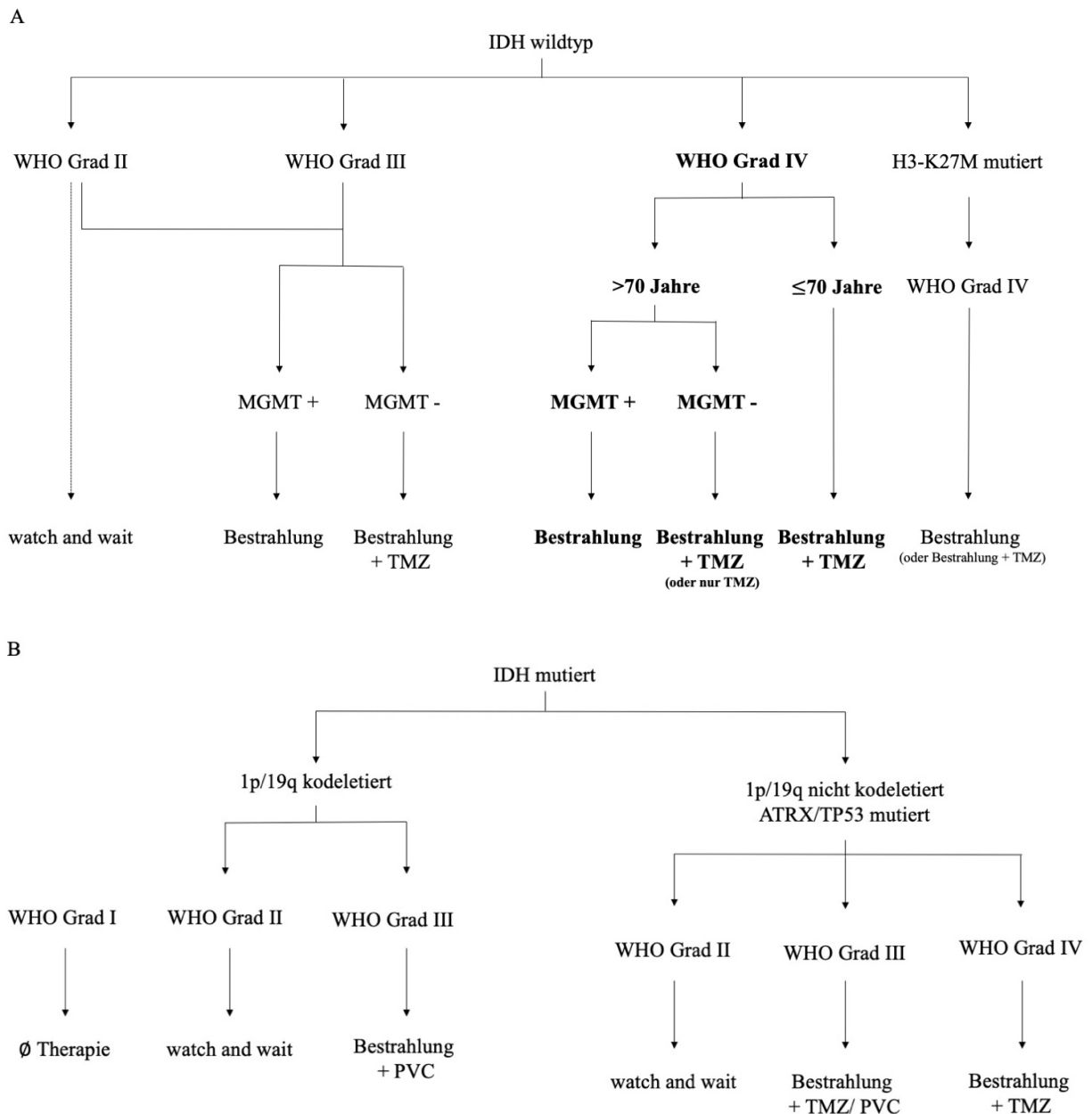
Bei *high-grade* Gliomen, wie dem GBM gilt eine Bestrahlung in Kombination mit einem Chemotherapeutikum im Anschluss an die Resektion als Standardverfahren (Stupp *et al.*, 2005). Es wird eine Gesamtdosis von 60 Gy in fraktionierten Einheiten á 2 Gy über einen Zeitraum von 6 Wochen appliziert. Hierbei erfolgt keine Ganzhirnbestrahlung, sondern eine selektive Bestrahlung des Tumorbettes zur lokalen Tumorkontrolle unter Einschluss einer 2-3 cm breiten Randzone (Hess *et al.*, 1994). Für Patienten über 70 Jahren, besonders im Falle eines Tumors mit unmethylierter MGMT-Promotorregion wird eine Applikation der Strahlendosis in hypofraktionierter Form erwogen. Hierbei liegt die Gesamtdosis bei 34 Gy und wird in 2 Wochen zu je 3,4 Gy pro Sitzung appliziert (Malmström *et al.*, 2012; Perry *et al.*, 2017). Ein verzögerter Therapiebeginn der Radiochemotherapie nach erfolgreicher chirurgischer Intervention beeinflusste das Überleben der Patienten nicht positiv (Louvel *et al.*, 2016).

### 1.3.3 Adjuvante Chemotherapie

In Kombination mit der Bestrahlung erfolgt eine adjuvante Chemotherapie. Es zeigte sich ein signifikanter Überlebensvorteil von 2,5 Monaten (14,6 Monaten zu 12,1 Monaten) bei der Kombinationstherapie gegenüber der alleinigen Strahlentherapie (Stupp *et al.*, 2005). Auch das Langzeitüberleben nach 5 Jahren lag bei Patienten mit einer kombinierten Therapie mit 9,8 % höher als bei alleiniger Bestrahlung (1,9 %) (Stupp *et al.*, 2009). Als Chemotherapeutikum der Wahl hat sich Temozolomid (TMZ) etabliert. Während der Bestrahlung wird es simultan in einer Dosis von 75 mg/m<sup>2</sup> an 7 Tagen der Woche oral eingenommen. Eine Monotherapie nach Beendigung der Bestrahlung liegt mit 150-200 mg/m<sup>2</sup> höher und umfasst 6 weitere Zyklen



(Stupp *et al.*, 2005). Ein Zyklus dauert 28 Tage, wobei an 5 Tagen eine TMZ-Behandlung erfolgt. Insbesondere Patienten mit einem MGMT-negativen GBM haben eine signifikant bessere Überlebensprognose (Hegi *et al.*, 2005). Dies ist auf die verstärkte zytotoxische Wirkung von TMZ zurückzuführen wenn MGMT nicht exprimiert wird (Hegi *et al.*, 2005). Ein *dose-dense* Schema mit häufigerer Gabe von TMZ bei geringeren Dosen zeigte keinen positiven Effekt auf das Überleben der Patienten (Gilbert *et al.*, 2013).



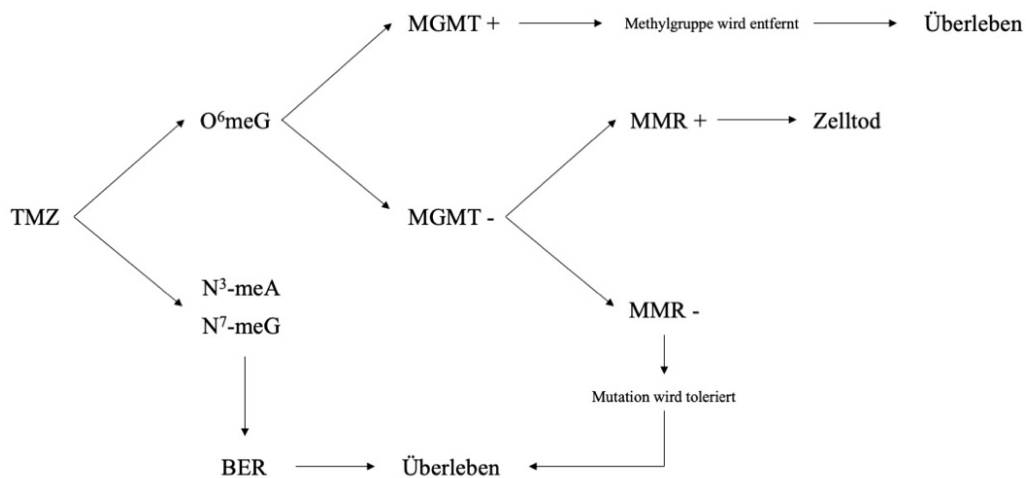
**Abb.2: Postoperatives Therapieschema bei Gliomen.** Modifiziert nach Weller *et al.* 2017 (EANO Leitlinien) und DGHO Leitlinie 2017. (A) Zeigt das Therapieschema für IDH-Wildtyp Gliome. (B) Zeigt das Therapieschema für IDH mutierte Gliome.

Weitere Substanzen finden vor allem bei Therapieresistenz oder in der Rezidivtherapie (z.B. Bevacizumab) Anwendung. Eine randomisierte Phase-III-Studie (CeTeG/NOA-09-Studie),

konnte bspw. bei Kombination von CCNU (Lomustin) mit TMZ in MGMT-negativen GBMs im Vergleich zur Standardtherapie, einen Überlebensvorteil der Patienten zeigen (Herrlinger *et al.*, 2019). Bei der Behandlung von WHO-Grad II und WHO-Grad III Gliomen kommen zusätzlich andere Chemotherapeutika wie bspw. Nitrosoharnstoffderivate (BCNU = Carmustin, ACNU = Nimustin, CCNU) oder das PCV-Schema (Procarbazin, CCNU, Vincristin) zum Einsatz (Weller *et al.*, 2017).

#### 1.3.3.1 Wirkmechanismus von Temozolomid

TMZ, deutscher Handelsname Temodal<sup>®</sup>, ist ein alkylierendes Chemotherapeutikum, welches als *Prodrug* oral eingenommen wird und nach Autoaktivierung bei physiologischem pH-Wert als Monomethyl-triazenoimidazol-carboxamid (MTIC) wirkt (Patel *et al.*, 2003). Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaft kann es die Blut-Hirn-Schranke problemlos passieren und rasch in den Zellen des ZNS wirken. Durch Methylierung von DNA-Basen entstehen, wie in Abbildung 3 gezeigt unter anderem O<sup>6</sup>-methyl-Guanin (O<sup>6</sup>-meG), N<sup>7</sup>-methyl-Guanin (N<sup>7</sup>-meG) und N<sup>3</sup>-methyl-Adenin (N<sup>3</sup>-meA) (Newlands *et al.*, 1997). Diese Läsionen können durch intrazelluläre Reparaturmechanismen behoben werden. Passiert dies nicht, persistiert der DNA-Schaden und kann zu Mutationen in der Zelle oder zum Zelltod, bspw. durch Doppelstrangbrüche (DSBs), führen (Zhang *et al.*, 2012). Die Wirkung von TMZ steht demzufolge im Zusammenhang mit den DNA-Reparaturmechanismen der Zelle. Hierbei spielt die BER (*base excision repair*), bei N<sup>7</sup>-meG- und N<sup>3</sup>-meA-Läsion und MGMT bei der direkten Reparatur der O<sup>6</sup>-meG-Läsion eine entscheidende Rolle (Zhang *et al.*, 2012). Obwohl die O<sup>6</sup>-meG-Läsion nur 5 % der entstandenen Läsionen ausmacht, wird die zytotoxische Wirkung von TMZ primär über diese Läsion verursacht (Denny *et al.*, 1994). Daher ist die Wirkung von TMZ unmittelbar in Zusammenhang mit dem MGMT-Status zu bringen (Hegi *et al.*, 2008). Wird MGMT exprimiert wird die Methylgruppe an der Base entfernt. Interveniert MGMT nicht, im Falle einer *gesilenceten* Promotorregion wird die *Mismatch*-Reparatur (MMR) aktiviert (Karran, 2001). Diese detektiert die O<sup>6</sup>-meG-Läsion und versucht den Fehler durch Korrektur der Basenpaarung durch Insertion von Thymin zu beheben. Da es jedoch keine korrespondierende Base zu O<sup>6</sup>-meG gibt, resultiert die vergebliche Fehlpaarung in einem ssDNA-Bereich, welcher im darauffolgenden Replikationszyklus zu einem DSB des betroffenen DNA-Strangs führen kann (Rye *et al.*, 2008).



**Abb.3: Wirkmechanismus von TMZ.** Modifiziert nach Zhang *et al.* 2012. TMZ ist ein alkylierendes Chemotherapeutikum, das Methylgruppen an die Basen der DNA anheftet. Diese werden durch eine funktionelle MMR prozessiert und resultieren replikationsabhängig in DSBs welche zum Zelltod führen können.

Auf die genaue Funktionsweise der MMR und die Prozessierung der O<sup>6</sup>-meG-Läsion wird in Abschnitt 1.4.2.4.1 detaillierter eingegangen. Dennoch ist ein sehr variables Ansprechen auf TMZ bei Patienten zu erkennen. Es werden DNA-Reparaturanpassungen der Zelle als mögliche Ursache für eine modifizierte Resistenzlage unter Therapie in Betracht gezogen (Cahill *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010). Darüber hinaus zeigte sich ein Einfluss von TMZ auf die MGMT-Expression in einigen MGMT-unmethylierten Zelllinien, was eine Resistenzhöhung zur Folge hatte (Kitange *et al.*, 2009). Daher ist eine prädiktive Aussage über das Therapieansprechen unter TMZ-Behandlung eine weiterhin bestehende Herausforderung.

Die Nebenwirkungen von TMZ sind im Vergleich zu anderen Chemotherapeutika moderat. Neben Arzneimittellexanthemen wurden eine Myelosuppression bei einer geringen Anzahl von Patienten beobachtet (Athassiou *et al.*, 2005). Aufgrund von vereinzelt auftretenden Thrombozytopenien und Leukozytopenien werden in regelmäßigen Abständen Blutkontrollen vorgenommen (Hegi *et al.*, 2008). Weitere häufigere Nebenwirkungen, wie Übelkeit und Müdigkeit sind allgemeiner Art (van den Bent *et al.*, 2003). Wie die meisten Chemotherapeutika hat auch TMZ eine teratogene Wirkung, weshalb von einer Nutzung bei schwangeren und stillenden Frauen abgeraten wird (Adlard, 2000).

#### 1.3.4 Weitere Therapiemöglichkeiten

Neben den zuvor genannten *first-line* Therapieoptionen ist zudem die supportive Therapie entscheidend für das Patientenwohl. Hierbei finden neben Antiemetika, Antikoagulanzen und Glukokortikoiden auch Antikonvulsiva zur Symptomkontrolle eine breite Anwendung (Marras *et al.*, 2000; Stupp *et al.*, 2013). Die primär prophylaktische Gabe von Antikonvulsiva bei GBM-Patienten nach Tumorresektion, zeigte jedoch keine Reduktion von epileptischen Anfällen und wird daher zum aktuellen Zeitpunkt nicht empfohlen (Glantz *et al.*, 2000; Weller *et al.*, 2012). Rechtzeitig sollte auch eine palliativmedizinische Betreuung erwogen werden. Aufgrund der raschen Progression der Erkrankung, ist im Durchschnitt nach 7 bis 10 Monaten bei allen Patienten eine individualisierte Therapieeskalation indiziert (Omuro, 2013). Ein verlängertes progressionsfreies Überleben für 3 bis 4 Monaten lässt sich bspw. in Studien unter Einsatz monoklonaler *vascular endothelial growth factor* (VEGF)-Antikörper (Bevacizumab) erreichen. Eine Reduktion des Steroidbedarfs sowie eine verbesserte Lebensqualität, erfasst mittels Karnofsky-Index, konnten ebenfalls nachgewiesen werden (Chinot *et al.*, 2014). Da Bevacizumab jedoch das Gesamtüberleben nicht nachweislich verbessert, ist es zum aktuellen Zeitpunkt nicht zur Primärtherapie in Europa zugelassen (Chinot *et al.*, 2014; Gilbert *et al.*, 2014). Bevacizumab findet vor allem Anwendung in der Rezidivtherapie von GBMs (Reifenberger *et al.*, 2016). Einen weiteren neuen, möglicherweise Erfolg versprechenden, Therapieansatz bietet die *tumor-treating field* (TTF)-Therapie. Sie wird als Erhaltungstherapie in Kombination mit TMZ adjuvant nach initialer Strahlenchemotherapie angewandt. Hierbei wird ein elektrisches Wechselfeld (200 kHz) mit niedriger Intensität für mindestens 18 h pro Tag dem Patienten mittels externer Elektroden am Schädel angelegt. Dies soll eine Störung der Zellteilung in den Tumorzellen bewirken und Apoptose vermitteln. Patienten mit dieser Kombinationstherapie wiesen ein längeres progressionsfreies Überleben von 2,7 Monaten auf, das Gesamtüberleben konnte um 4,9 Monate gesteigert werden (Stupp *et al.*, 2017). Neben diesen Optionen kann darüber hinaus auch eine erneute Operation weiterhin als Therapieeskalation, nach radiologischer Rezidivlokalisierung in Betracht gezogen werden (Suchorska *et al.*, 2016). Andere Therapiestrategien, bspw. mittels Immuncheckpoint Hemmung oder Vakzinierungsversuchen, müssen sich noch in klinischen Studien beweisen (Reardon *et al.*, 2017). Einen einheitlichen Standard bei mangelhaftem Ansprechen auf die Initialtherapie oder im Rahmen einer Rezidivtherapie gibt es aktuell noch nicht (Weller *et al.*, 2017).

## 1.4 DNA-Schäden und DNA-Reparatur

Zellen sind konstant Stress ausgesetzt und ständig damit beschäftigt, Schäden am Erbgut zu reparieren, die sowohl durch endogene oder exogene Einflüsse verursacht werden können. Zu exogenen Stressoren zählen bspw. UV- oder ionisierende Strahlung oder auch Chemotherapeutika. Diese wirken unterschiedlich, im Falle von Cisplatin werden bspw. *interstrand-crosslinks* innerhalb der DNA, welche in 47-50 % Guanin:Guanin Verbindungen sind, ausgebildet (Roos und Kaina, 2013). Die Schadenswirkung von TMZ durch Alkylierung von Basen wurde in Abschnitt 1.3.3.1 bereits genauer betrachtet. Die Folge von ionisierender Strahlung (IR) sind DSBs der DNA (Ohnishi *et al.*, 2009), UV-Strahlung hingegen verursacht unter anderem Thymindimere (Sinha und Häder, 2002). Strahlung kann darüber hinaus auch zu einem erhöhten *reactive oxygen species* (ROS)-Level in der Zelle führen. ROS entstehen jedoch nicht nur durch exogene Faktoren, sondern können ebenfalls als Resultat metabolischer Prozesse in der Zelle anfallen und zu einem erhöhten Schadenslevel führen (Klaunig *et al.*, 2010). Weitere spontane Mutationen wie Hydroxylierungen und Desaminierungen der Basenstruktur tragen darüber hinaus zu endogenen Schäden an der DNA bei (Schärer, 2003). Diese Schäden müssen durch zelleigene Mechanismen repariert werden, um die genomische Integrität der Zelle zu wahren und die Zelle vor Mutationen am Erbmaterial und einer Onkogenese zu schützen (Hanahan und Weinberg, 2011). Zunächst muss jedoch der verursachte Schaden erkannt und in einem weiteren Schritt über eine Signalkaskade der Zelle gemeldet werden. Erst dann kommt es zu einem Zellzyklusarrest in dem die Zelle entscheidet ob der Schaden behoben werden soll oder ein programmierter Zelltod eingeleitet wird. Hierfür stehen der Zelle verschiedene Wege und Mittel zur Verfügung. (Hosoya und Miyagawa, 2014; Roos und Kaina, 2013)

### 1.4.1 Erkennung von DNA-Schäden und die Schadensantwort der Zelle

Resultieren DSBs nach einem Schadensereignis, bspw. durch IR (Laura Annovazzi *et al.*, 2017) führen diese zu einer unmittelbaren Anlagerung des MRN-Komplex (Mre11, Rad50 und NBS1) an die freiliegenden DNA-Enden. Als nächster Schritt wird ATM (*ataxia-teleangectasia mutated*) rekrutiert. Durch Autophosphorylierung wird dieses aktiviert. (Hosoya und Miyagawa, 2014). Das Protein ATM ist als Monomer aktiv und koordiniert ebenfalls durch Phosphorylierungsprozesse weitere Proteine der Schadensantwort. Zu diesen gehören Proteine der Zellzyklusregulation, der DNA-Reparatur und ggf. der Apoptose (Roos und Kaina, 2013).

Unter anderem ist das Histon 2AX (H2AX) ein Substrat von ATM, welches nach Phosphorylierung die Schadensantwort und den Zugangsweg zum Chromatin moduliert (Roos und Kaina, 2013).  $\gamma$ H2AX-Foci (Ser139) werden daher, neben 53BP1 als Marker für DSBs verwendet und können mittels Immunfluoreszenz detektiert werden.  $\gamma$ H2AX ist jedoch nicht ausschließliches Resultat eines DSB vermittelt durch ATM, sondern kann auch durch ATR (*ATM-and-Rat3-related*) oder DNA-PKcs phosphoryliert werden (Sedelnikova *et al.*, 2003). Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen  $\gamma$ H2AX-Foci und den induzierten DSBs nach IR (Sedelnikova *et al.*, 2002). Im weiteren Verlauf der Signalkaskade werden unter anderem *Checkpoint*-Kinasen aktiviert, welchen die Regulation des Zellzyklus unterliegt (Kastan und Bartek, 2004). Im Falle eines DSB wird vor allem Chk2 aktiviert. Es arretiert den Zellzyklus durch Phosphorylierung und Initiation des Abbaus von CDC25A. Dies wiederum verhindert die Aktivierung von *cyclin dependent kinase 2* (CDK2) und damit den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase oder das Fortschreiten in der S-Phase (Frosina, 2011). Darüber hinaus kann die Verzögerung an diesem Punkt des Zellzyklus auch durch p53-Phosphorylierung (Ser15) durch ATM mit konsekutiver p21-Aktivierung geschehen (Bolderson *et al.*, 2009). Auch Reparaturproteine wie BRCA1 können für die Initiierung der DNA-Reparatur an DSBs rekrutiert werden (Gaillard *et al.*, 2015).

Tritt ein Einzelstrangbruch (SSB) bspw. durch eine Behinderung während des Replikationsprozesses (*stalled replication fork*) auf, wird ähnlich dem Prinzip des DSB zunächst ein Erkennungsprotein, das *replication protein A* (RPA) zu den freien DNA-Enden gebunden (Kastan und Bartek, 2004). Es folgt eine Rekrutierung von ATR, welches funktional und strukturell dem ATM ähnlich ist (Blackford und Jackson, 2017). Durch Autophosphorylierung wird auch dieses aktiviert und reguliert den weiteren Verlauf der Schadensantwort (Bolderson *et al.*, 2009). Wie zuvor erwähnt kann auch H2AX Substrat des ATR sein. Schlüsselprotein der Zellzyklusregulation bei SSBs ist die *Checkpoint*-Kinase Chk1, welche den Zellzyklus durch Phosphorylierung von CDC25C und konsekutiver Inhibition von *cyclin dependent kinase 1* (CDK1) den Übergang der G2- zur M-Phase verzögert (Frosina, 2011). ATR und Chk1 sind typische Proteine, die im Zuge von Replikationsstress aktiviert werden (s. Abschnitt 1.4.3).

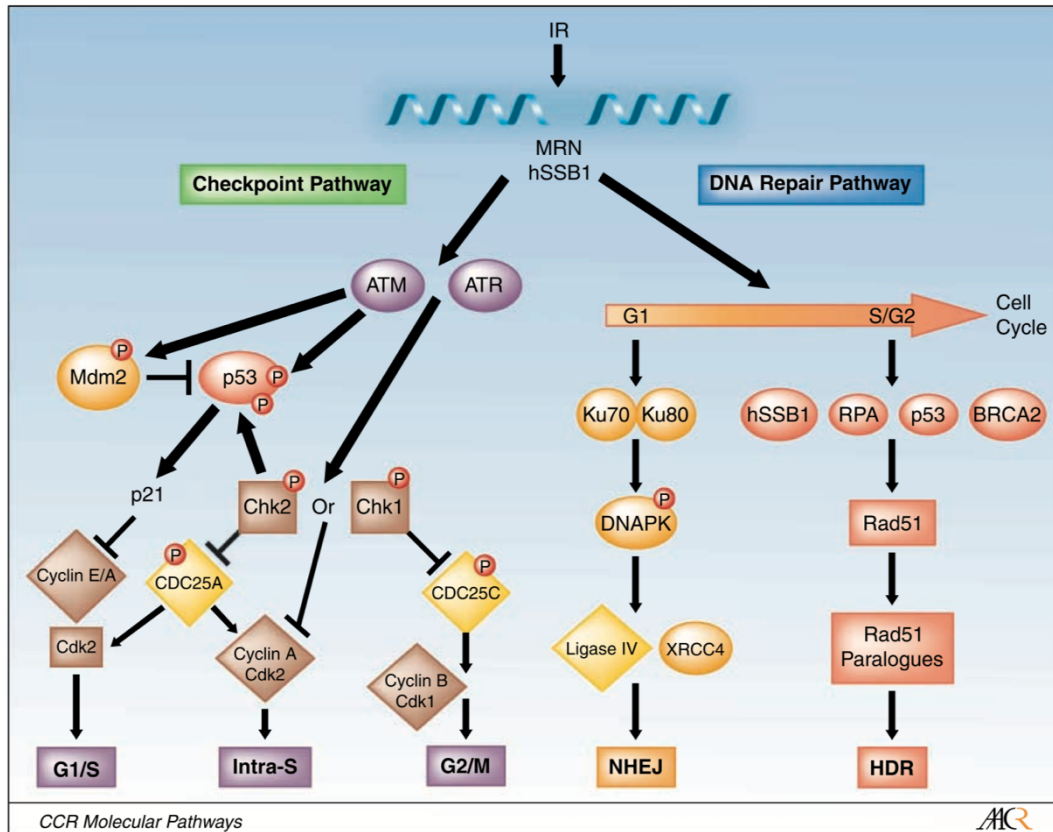


Abb. 4: Übersicht der DNA-damage-response (DDR) und Checkpoint-Aktivierung (Bolderson *et al.*, 2009).

#### 1.4.2 Reparatur der DNA-Schäden

Als Konsequenz der unter Abschnitt 1.4 genannten Einflüsse und Schadensereignisse auf die Zelle kommt es zur Aktivierung der DNA-damage response (DDR) und Einleitung eines Zellzyklusarrests. Dies kann je nach DNA-Schadensereignis eine Aktivierung verschiedener Reparaturmechanismen zur Folge haben. Die Reparaturwege verfolgen jedoch alle das gleiche Ziel, nämlich die genomische Integrität der Zelle zu wahren und diese somit am Leben zu halten. Es werden von den Reparaturmechanismen im Allgemeinen Strangbrüche und Basenschäden unterschieden.

##### 1.4.2.1 Reparatur von Strangbrüchen

Ist ein DSB Ursache für einen Zellzyklusarrest und ist eine Entscheidung für einen Reparaturversuch der Zelle gefallen, wird im weiteren Verlauf die DNA-Reparatur durch Rekrutierung von spezifischen Reparaturproteinen initiiert. Es gibt zwei Hauptreparaturmechanismen bei DSBs. Zum einen die homologe Rekombination (HR), welche

ausschließlich in der späten S-Phase oder der G2-Phase stattfindet (Bolderson *et al.*, 2009). Zum anderen das *non-homologous end joining* (NHEJ), welches vor allem in der G1 und G0 Phase DNA-Schäden repariert (Hartlerode und Scully, 2009). Die entscheidenden Unterschiede der beiden Mechanismen liegen im Zeitpunkt der Reparatur sowie dem Verlust an genetischem Material während der Reparatur. In der Mehrheit der Fälle werden die DSBs mittels NHEJ behoben (Shibata und Jeggo, 2014). Da dieser Reparaturmechanismus ohne homologe Erbgutvorlage die freiliegenden Enden des Strangbruchs verbindet, ist es möglich, dass genetische Informationen verloren gehen. Dieser Reparaturmechanismus gilt als fehleranfälliger als die HR (Laura Annovazzi *et al.*, 2017). Bei einer Reparatur mittels NHEJ bindet zunächst das Ku70/80 Heterodimer an die Schadensstelle und rekrutiert danach die katalytische Untereinheit DNA-PKcs. Diese bilden durch Autophosphorylierung den aktiven DNA-PK Komplex (van Gent und van der Burg, 2007), welcher ebenfalls ein Mitglied der PIKK-Familie ist (Blackford und Jackson, 2017). Im folgenden Schritt werden die Strangbruchenden, wenn nötig, durch das Protein Artemis zu 5'-phosphorylierten Enden prozessiert. Dies geschieht unter Verlust von Nukleotiden. Artemis besitzt sowohl Endo- als auch Exonukleaseaktivität und interagiert mit dem DNA-PKcs Komplex, bindet an diesen jedoch nicht (Hartlerode und Scully, 2009). Es folgt die Ergänzung der entstandenen Lücke durch Polymeraseaktivität und die Ligation mittels XL-L4 Komplex (XRCC4, DNA-Ligase-4 und XLF) (Cottarel *et al.*, 2013). Alternativ kann, wenn sich die Zelle in der S-Phase befindet und ein homologes Schwesterchromatid vorhanden ist, eine fehlerfreie HR zur Reparatur des DSB initiiert werden. Bei diesem komplexeren Reparaturmechanismus wird initial die Schadensantwort via MRN-Komplex und ATM am Ort der Läsion wie unter Abschnitt 1.4.1 beschrieben eingeleitet (Ohnishi *et al.*, 2009). Zur Reparatur mittels HR bedarf es einer Prozessierung der DNA-Enden zu überhängenden 3' Einzelstrangenden. Dies dient der Anlagerung an die passende Sequenz auf dem homologen Chromatid (Tham *et al.*, 2016). Als nächstes bindet RPA zu den freien DNA-Enden um diese zu schützen. Die Anlagerung von Rad51 an die Einzelstrangenden und damit die Ablösung von RPA wird durch BRCA2 vermittelt (Shibata und Jeggo, 2014). Die angelagerten Rad51 Proteine bilden Nukleoproteinfilamente und ermöglichen damit die Stranginvasion und die Homologiesuche auf dem Schwesterchromatid. Ist der relevante Bereich gefunden, bildet sich eine Verdrängungsschleife (D-Loop) durch Rad51 und Rad54 aus (Heyer *et al.*, 2010). In der Folge wird der einfallende Strang am 3'-Ende durch die Polymerase verlängert. Hierbei kann sich eine so genannte doppelte Holliday-*Junction* bilden (Hartlerode und Scully, 2009). Nach Beendigung der Synthese, kann es je nach Art der Auflösung der doppelten Holliday-*Junction*



zu einem *Crossover* von Genmaterial kommen. Ein *Crossover* ist jedoch häufiger mit einer Reparatur während der Meiose assoziiert (Heyer *et al.*, 2010). Als weitere, alternative Reparaturmechanismen stehen darüber hinaus der Zelle noch das *single-strand annealing* (SSA) und PARP1 vermittelte *alternative-NHEJ* (Alt-NHEJ) zur Verfügung (Ohnishi *et al.*, 2009; Tham *et al.*, 2016).

#### 1.4.2.2 Reparatur von Basenschäden

Neben Strangbrüchen der DNA kann es auch zu Schäden an den Basen der DNA kommen. Diese treten spontan, im Rahmen enzymatischer Prozesse in der Zelle oder durch externe Einflüsse auf. Der Zelle stehen hierfür im Wesentlichen 4 Reparaturmechanismen zur Verfügung (BER, NER, Alkyltransferasen und MMR). Die BER (*base excision repair*) dient der Entfernung von alkylierten, oxidierten oder desaminierten einzelnen Basen, ohne struktureller Veränderung der DNA-Helix (Krokan und Bjoras, 2013). Hierzu zählt bspw. die N<sup>3</sup>-meA- und N<sup>7</sup>-meG-Läsion nach TMZ-Behandlung (Zhang *et al.*, 2012). Eine läsionsspezifische DNA-Glykosidase erkennt den entstandenen Schaden an der Base und entfernt diesen bevor es replikationsabhängig zu einem DNA-Strangbruch kommt. Hierzu werden neben Endonukleasen und Polymerasen zusätzlich Ligasen benötigt, um den Schaden vollständig zu korrigieren. Es besteht die Möglichkeit nur eine Base (*short-patch*) oder einen Abschnitt von 2-10 Nukleotiden (*long-patch*) des betroffenen DNA-Strangs zu resezieren (Krokan *et al.*, 2000).

Die NER (*nucleotid excision repair*) findet Anwendung bei sogenannten *bulky-lesion* die eine gestörte Helixstruktur zur Folge haben. Klassische Läsionen sind hierbei durch UV-Strahlung verursachte Pyrimidindimere (Wood, 1997). Es werden zwei Formen des Reparaturmechanismus unterschieden: *global genome repair* (GGR) und *transcription-coupled repair* (TCR). Der Unterschied liegt in der Lokalisation der Läsion (transkriptionsaktiver oder transkriptionsinaktiver DNA-Abschnitt respektive) und des sich dadurch unterscheidenden Erkennungsmechanismus (Scharer, 2013). Die TCR wird durch einen Transkriptionsblock aufgrund des *bulky adducts* aktiviert, wohingegen die GGR einen Proteinkomplex (XPC/hRad23B/CETN2) zur Initiation der Schadensantwort benötigt (Spivak, 2015). Die umfassende Exzision von 30 Nukleotiden, Polymeraseaktivität und Ligation sind hingegen in beiden Formen gleich (Leibeling *et al.*, 2006). Aufgrund der relevanten Bedeutung für die Fragestellung dieser Arbeit, werden die MMR im Abschnitt 1.4.2.4 und die Alkyltransferasen in den folgenden Abschnitten 1.4.2.3 ausführlicher erläutert.

#### 1.4.2.3 Alkyltransferase O<sup>6</sup>-methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)

Wie bereits in Abschnitt 1.3.3.1 erläutert, stellt der MGMT-Status eine entscheidende Einflussgröße in der Wirksamkeit alkylierender Chemotherapeutika dar. MGMT ist ein Suizid-Enzym, welches durch Übertragung einer Methylgruppe (CH<sub>3</sub>) auf die eigene freie Cystein 145 Bindungsstelle sich selbst inaktiviert und im Falle von TMZ die O<sup>6</sup>meG-Läsion an der Base entfernt. MGMT wird den Alkyltransferasen zugerechnet und hier exemplarisch für die Gruppe der direkten DNA-Reparaturenzyme aufgeführt. Das MGMT-Gen ist auf Chromosom 10q26 lokalisiert (Pegg, 2000). Im Falle einer unmethylierten Promotorregion, wird MGMT transkribiert und translatiert. In 45 % aller GBMs findet sich ein methylierter MGMT-Promotor (Hegi *et al.*, 2005). Liegt jedoch MGMT als Protein intrazellulär vor, ist die Wirksamkeit, des durch TMZ induzierten DNA-Schadens vermindert (Hegi *et al.*, 2005) und es resultieren weniger TMZ vermittelte DNA-Strangbrüche in der Zelle. Somit kommt dem MGMT-Status eine wichtige prognostische Bedeutung zu (Dunn *et al.*, 2009; Esteller *et al.*, 2000; Hegi *et al.*, 2005). Patienten deren Tumor kein MGMT exprimiert, haben eine signifikant längere Überlebenszeit im Vergleich zu Patienten mit einem MGMT-positiven GBM-Tumor (Hegi *et al.*, 2005). Aufgrund des variablen Ansprechens auf das Chemotherapeutikum dient der MGMT-Status als Therapieentscheidungshilfe. Dies betrifft vor allem Patienten über dem 70. Lebensjahr. Hier wird im Falle eines MGMT-positiven Tumors keine Chemotherapie durchgeführt. Bei jüngeren Patienten beeinflusst diese Differenzierung laut aktuellen Empfehlungen das Standardtherapieschema nicht (Weller *et al.*, 2017). Der MGMT-Status wird mittels methylierungsspezifischer *PCR* oder *Pyrosequencing* aus der gewonnenen Tumorprobe ermittelt (Dunn *et al.*, 2009; Thon *et al.*, 2013).

#### 1.4.2.4 Mismatch Reparatur (MMR)

Die MMR ist ein DNA-Reparaturmechanismus welcher vor allem Fehlpaarungen von Basen und Insertions- bzw. Deletionsloops (IDL) behebt. Zumeist sind diese Läsionen von der *proof-reading* Funktion der DNA-Polymerase während der Replikation übersehen worden (Karran, 2001). Es wurden dabei falsche Basen gegenüber des Matrizenstrangs (*template strands*) im Tochterstrang durch die Polymerase eingebaut. Jedoch können auch UV-Strahlung und 8-Oxoguanin, bei erhöhtem oxidativem Stress der Zelle, dafür verantwortlich sein, dass die MMR aktiviert wird (Z. Li *et al.*, 2016). Zur Detektion der Fehlpaarungen benötigt die Zelle Erkennungsproteine. MSH2 und MSH6 bilden hierzu das MutS $\alpha$ -Heterodimer, welches sich

am Ort der Fehlpaarung durch Hybridisierung bildet und die sogenannte  $\beta$ -clamp formt. MSH2 kann ebenfalls mit MSH3 einen Dimer bilden (MutS $\beta$ ), welcher zumeist bei der Reparatur von IDLs Verwendung findet (Zhang *et al.*, 2012). Nach erfolgreicher Bindung an die Fehlpaarung werden MLH1 und PMS2, als MutL $\alpha$  rekrutiert und koordinieren den weiteren Ablauf der Reparatur. MLH1 kann ebenfalls weitere MutL-Komplex Verbindungen, bspw. mit MSH3 und PMS1 eingehen, welche jedoch eine untergeordnete Rolle spielen (Kunkel und Erie, 2005). PMS2 wird im MutL $\alpha$ -Komplex eine Endonuklease-Aktivität zugeschrieben, die den Tochterstrang mit der fehlgepaarten Base einschneidet (Peña-Diaz und Jiricny, 2012). Die Exzision der Base erfolgt durch enzymatische Aktivität der Exonuklease 1 (EXO1). PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) stabilisiert die DNA und katalysiert den Vorgang. Die entstandene Resektionslücke in der DNA wird durch die Polymerase aufgefüllt und mittels DNA-Ligase geschlossen (Liu *et al.*, 2017). Haben Zellen eine funktionell eingeschränkte oder fehlende MMR, kann dies zu einer Mikrosatelliteninstabilität und Spontanmutationen der DNA führen, was das Risiko für die Entstehung von Krebs erhöht. Ein klinisches Beispiel hierfür ist das hereditäre Kolonkarzinom (HNPCC, Lynch-Syndrom) (Hsieh, 2001).

#### 1.4.2.4.1 O<sup>6</sup>-methyl-Guanin-Läsion

Die MMR wird nicht nur bei Basenfehlpaarungen, durch Replikationsfehler wie unter Abschnitt 1.4.2.4 beschrieben, sondern auch durch alkylierende Chemotherapeutika, bspw. TMZ aktiviert (s. Abschnitt 1.3.3.1). Eine O<sup>6</sup>meG-Läsion, wie sie durch TMZ-Behandlung entsteht, hat hierbei nicht den unmittelbaren Zelltod zur Folge, sondern wird prozessiert (Roos *et al.*, 2004). Die Methylgruppe am Matrizenstrang (*template strand*) führt im Rahmen der Replikation durch den Einbau von Thymin oder Cytosin als Basenpaar zu einem O<sup>6</sup>meG:T oder O<sup>6</sup>meG:C *non-Watson-Crick-Mismatch* (Z. Li *et al.*, 2016). Diese Fehlpaarung wird durch die MMR während der ersten Replikation erkannt. Hierbei wird die falsche Base Thymin oder Cytosin auf dem Tochterstrang entfernt. Dies geschieht, da die MMR nur den Tochterstrang reparieren kann, nicht jedoch den *template strand* mit der methylierten Base. Da es jedoch zu O<sup>6</sup>meG keine korrespondierende Base nach *Watson-Crick* gibt, wird erneut Thymin oder Cytosin eingebaut und der Fehler bleibt weiterhin bestehen (Roos und Kaina, 2013). Es resultiert ein ununterbrochener ineffektiver Reparaturkreislauf (*futile cycle*) und es kommt zu persistierenden *single stranded gaps* während der Replikation. Diese können via DDR zu einem ATR vermittelten Zellzyklusarrest und Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen führen. Alternativ kann es aufgrund der entstandenen Lücken während der folgenden

Replikationszyklen zu DSBs kommen, welche, wiederum *Checkpoint* vermittelt, die Apoptose einleiten können (Z. Li *et al.*, 2016). Die Schadensantwort der Zelle mittels *DDR-Signaling* wurde in Kapitel 1.4.1 bereits erläutert. Darüber hinaus wird diskutiert, dass eine direkte Kommunikation zwischen MMR-Proteinen und der DDR einen Zellzyklusarrest oder die Apoptose ohne vorausgehende Prozessierung einleiten kann (Liu *et al.*, 2010). Die Zytotoxizität des alkylierenden Chemotherapeutikums TMZ steht folglich in unmittelbarem Zusammenhang mit der Aktivität der MMR (Stojic *et al.*, 2004). Es zeigte sich, dass MMR-defiziente Zellen eine Resistenz besitzen und O<sup>6</sup>meG-Läsionen tolerierten, jedoch eine hohe Anzahl an A:T und G:C Punktmutationen aufweisen (Roos und Kaina, 2013).

### 1.4.3 Replikationsstress

Die Replikation dient der akkuraten Duplikation der DNA der Zelle während der S-Phase. Eine sorgfältige und fehlerfreie Ausführung ist wichtig, da sich anderenfalls Fehler im Genom einschleichen und zu Mutationen führen können (Kitao *et al.*, 2018). Wird dieser sensible Vorgang behindert, kann es zu einer Verlangsamung oder zum Erliegen der Replikation kommen. Dies resultiert in einem erhöhten Replikationsstresslevel der Zelle, hemmt die Fertigstellung der Duplikation und kann zum Zusammenbruch der Replikationsgabel führen (Gaillard *et al.*, 2015). Replikationsstress kann intrinsisch durch Läsionen der DNA, einer gehemmten Polymerase oder einem Mangel an Nukleotiden hervorgerufen werden (Kitao *et al.*, 2018). Extrinsische Faktoren stellen UV-Strahlung oder chemotherapeutische Substanzen dar (Zeman und Cimprich, 2014), welche ebenfalls einen hemmenden Einfluss auf die Prolongation und Termination der Replikation haben. Eine häufige Konsequenz bei Störungen der Replikation ist eine blockierte Replikationsgabel (*stalled replication fork*). Um die fehlerfreie Fertigstellung der Replikation und die Wahrung der genomischen Integrität der Zelle zu gewährleisten, kommt es nach Schadenserkennung zur Aktivierung der DDR (Z. Li *et al.*, 2016). Aufgrund von freiliegenden ssDNA (*single stranded DNA*), welche meistens bei *stalled replication fork* (Branzei und Foiani, 2009) entstehen wird eine ATR vermittelte *Checkpoint*-Kaskade via Chk1 aktiviert (Roos und Kaina, 2013). Chk1, als einer der wichtigsten Regulatoren des Zellzyklus von ATR, wird nur exemplarisch für die vielen Substrate von ATR genannt. Darüber hinaus sorgt ATR auch selbst am Ort des Schadens für eine Stabilisierung der Replikationsgabel und Wiederaufnahme der Replikation (Cimprich und Cortez, 2008; Toledo *et al.*, 2013). Die initiierte Kaskade führt, wie aus Abbildung 5 zu erkennen, zur Phosphorylierung weiterer Zielproteine. Es werden vermehrt ruhende

Replikationsursprungspunkte (*ori*) in der näheren Umgebung der Replikationsgabel aktiviert, welche die Fortsetzung der Replikation zeitnah ermöglichen, *late-firing oris* werden hingegen unterdrückt (Gaillard *et al.*, 2015; Luciani, 2004). Darüber hinaus kann durch die Signalkaskade eine DNA-Reparatur oder ein Zellzyklusarrest eingeleitet werden. Dies führt ebenfalls zu einem Neustart des Replikationsprozesses und hat somit zumeist eine erfolgreiche Wahrung der genomischen Integrität zur Folge (Branzei und Foiani, 2009). Abbildung 5 zeigt unter anderem eine mögliche Aktivierung von ATM nach Schadenserkennung an der Replikationsgabel. Wurde eine Replikationsgabel nicht erfolgreich wieder in Gang gesetzt, kann diese kollabieren und in einem DSB resultieren. Hier entscheidet die Zelle, ATM vermittelt über das weitere Schicksal des DSB an der kollabierten Replikationsgabel (Cimprich und Cortez, 2008; Zeman und Cimprich, 2014). Eine detailliertere Beschreibung der Schadensantwort der Zelle findet sich unter Abschnitt 1.4.1. ATR und ATM spielen somit eine entscheidende Schlüsselrolle bei der Mediation der Schadensantwort und dessen Koordination und gehören beide zu der Familie der PIKK (PI3K *like kinases*) (Z. Li *et al.*, 2016). Neben der Detektion von DDR- und Replikationsstressproteinen (ATR, ATM, Chk1, Chk2, RPA, H2AX) kann das Replikationsstresslevel ebenfalls mittels *fiber assay* quantifiziert werden. Relevante Ereignisse, welche für ein erhöhtes Stresslevel sprechen, sind eine verlangsamte Elongation, eine erhöhte Termination und eine veränderte Initiation von Replikationsursprüngen (*ori-firing*), welche durch Immunfluoreszenz markierte Nukleotide für die quantitative Auswertung sichtbar gemacht werden können (Bianco *et al.*, 2012). In dieser Arbeit wurde die Replikationsstressanalyse und Schadensantwort der Zelle ausschließlich mittels Detektion der Proteine ATM, pATM, ATR, pATR, Chk1, pChk1, Chk2, pChk2, H2AX,  $\gamma$ H2AX im *Western Blot* vorgenommen. Der Fokus der Betrachtung lag auf den Proteinen ATR, pATR sowie Chk1 und pChk1, welche im engeren Sinne den Replikationsstressproteinen zugeordnet und vor allem im Rahmen einer *stalled replication fork* aktiviert werden.

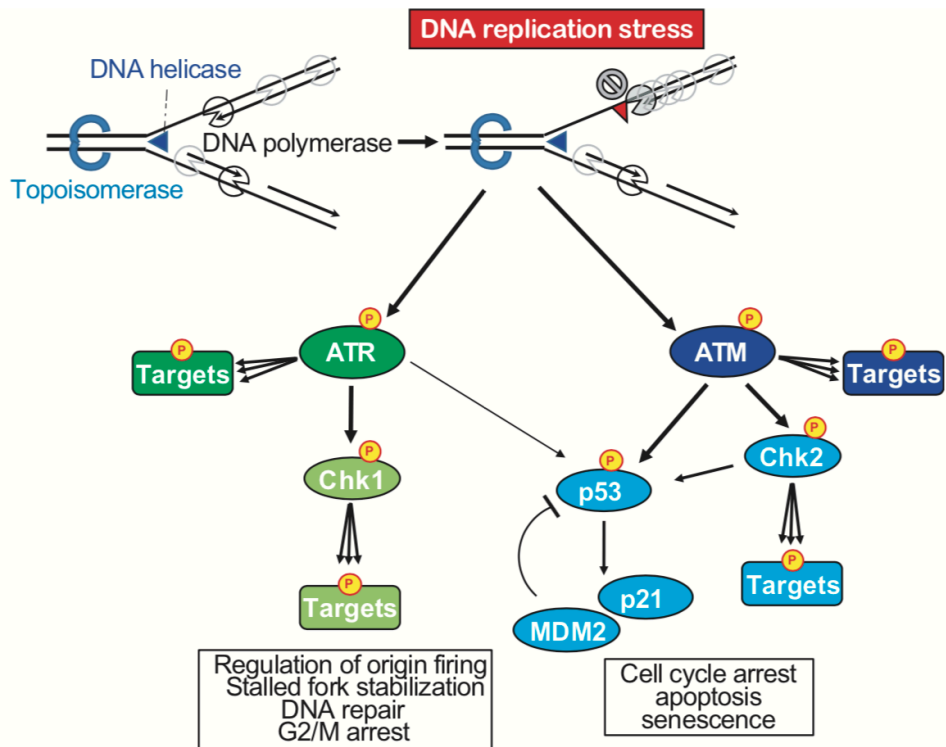


Abb. 5: Übersicht der Replikationsstressantwort und Signalwegen (Kitao *et al.*, 2018).

## 1.5 Ziel dieser Arbeit

Bei der Behandlung des GBM gibt es aktuell nur eine überschaubare Anzahl an klinisch etablierten und zugelassenen Therapieregimen, welche seit Jahren nur marginalen Neuerungen unterliegen. Ebenso hat sich die ohnehin schon geringe Überlebenszeit der Patienten, die an einem solchen Tumor leiden nicht wesentlich verbessert (Stupp *et al.*, 2005). Nach wie vor wird die Kombinationstherapie aus TMZ und Bestrahlung in der Mehrheit der Fälle als Standard leitliniengerecht angewandt (Weller *et al.*, 2017). Somit ist es, neben der Weiterentwicklung von pharmakologischen Substanzen, auch sinnvoll, den Fokus der Forschung auf Möglichkeiten zu richten, um die vorhandenen Mittel gezielter und effektiver einzusetzen und somit den Betroffenen eine individualisierte Therapie zu ermöglichen. Dies gelingt bspw. durch die Identifikation von Biomarkern. MGMT hat sich hier bereits in der Leitlinie seit längerem eingefunden, wird aber aufgrund der mangelnden Auswahl an therapeutischen Substanzen nur therapieentscheidend bei polymorbiden Patienten über dem 70. Lebensjahr berücksichtigt. Seit 2016 wird von der WHO ein vermehrter Fokus auf die Integration weiterer molekularpathologischer Marker bei der Klassifikation von Hirntumoren gelegt und somit ein wichtiger Schritt in Richtung der individualisierten Medizin eingeschlagen. Wie bereits aus Vorarbeiten bekannt, ist für die Wirksamkeit von TMZ eine funktionelle MMR nötig (Zhang *et al.*, 2012). Ebenso wurde an isogenetischen MGMT-negativen humanen GBM-Zellen, die eine konstitutive Variante des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFRvIII) exprimieren, eine erhöhte TMZ-Sensitivität bei vermehrter MMR Expression festgestellt. Darüber hinaus wiesen die TMZ-sensitiveren EGFRvIII-positiven Zellen einen erhöhten Replikationsstress auf (Struve, 2015). Daher stellt sich die Frage ob und ggf. wie diese Erkenntnisse in einem heterogenen Zellmodell von MGMT-negativen GBM-Zelllinien in Zusammenhang zu bringen sind und als prädiktive Marker für das Ansprechen auf TMZ geeignet sind. Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob die MMR-Proteinexpression mit der TMZ-Sensitivität korreliert und ob die, mittels *Western Blot* detektierte Expression der DDR- und Replikationsstressproteine mit der TMZ-Sensitivität assoziiert werden kann.

## 2. Material

### 2.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden die humane GBM-Zelllinien Cas1, BS153vIII-, DKMGvIII-, U87, U251, LN229, G96, G120, G130, G140 und G142 verwendet. Der angegebene MGMT-Status wurde mittels *Western Blot* Analyse und MGMT-spezifischem Antikörper analysiert.

---

<b>Zelllinie</b>	<b>MGMT-Status</b>	<b>Herkunft</b>
BS153vIII-	negativ <sup>^</sup>	Dr. Struve, UKE
Cas1	negativ <sup>^</sup>	Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro (#HTL97009), Dr. Florio
DKMGvIII-	negativ <sup>^</sup>	Dr. Struve, UKE
G120	negativ <sup>^</sup>	Labor für Hirntumorbiologie, UKE
G130	negativ <sup>^</sup>	Labor für Hirntumorbiologie, UKE
G140	negativ <sup>^</sup>	Labor für Hirntumorbiologie, UKE
G142	negativ <sup>^</sup>	Labor für Hirntumorbiologie, UKE
G96	positiv <sup>^</sup>	Labor für Hirntumorbiologie, UKE
LN229	negativ <sup>^</sup>	Prof. Borgmann, UKE
U251	negativ <sup>^</sup>	Ponten <i>et al.</i> , 1968
U87	negativ <sup>^</sup>	Ponten <i>et al.</i> , 1968

---

<sup>^</sup> eigene Analysen: Labor für Strahlenbiologie und experimentelle Radioonkologie



## 2.2 Antikörper

### 2.2.1 Primäre Antikörper

---

<b>Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Klonalität</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
ATM	Kaninchen	monoklonal	1:1000	Cell signaling Technology <sup>®</sup> , Denvers USA, #2873
ATR	Ziege	polyklonal	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA, #sc-1887
Chk1	Maus	monoklonal	1:1000	Cell signaling Technology <sup>®</sup> , Denvers USA, #2360
Chk2	Maus	monoklonal	1:1000	BD Biosciences, New Jersey USA, #611570
GAPDH	Maus	monoklonal	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA, #sc-32233
H2AX	Kaninchen	monoklonal	1:1000	Cell signaling Technology <sup>®</sup> , Denvers USA, #7631

---

---

MGMT	Maus	monoklonal	1:1000	BD Biosciences, New Jersey USA, #557045
MLH1	Maus	monoklonal	1:1000	Cell signaling Technology <sup>®</sup> , Denvers USA, #3515
MSH2	Maus	monoklonal	1:1000	Cell signaling Technology <sup>®</sup> , Denvers USA, #2850
MSH3	Maus	monoklonal	1:1000	BD Biosciences, New Jersey USA, #611390
MSH6	Maus	monoklonal	1:1000	BD Biosciences, New Jersey USA, #610919
pATM (Ser1981)	Maus	monoklonal	1:1000	Cell signaling Technology <sup>®</sup> , Denvers USA, #4526
pATR (Ser428)	Kaninchen	monoklonal	1:1000	Cell signaling Technology <sup>®</sup> , Denvers USA, #2853
pChk1 (Ser345)	Kaninchen	polyklonal	1:1000	US Biologicals Salem, USA, #4200-05

---

pChk2 (Thr68)	Kanninchen	polyklonal	1:1000	Cell signaling Technology <sup>®</sup> , Denvers USA, #2661
PMS2	Maus	monoklonal	1:1000	BD Biosciences, New Jersey USA, #556415
β-Aktin	Maus	monoklonal	1:20000	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Steinheim, Deutschland, #A-2228
γH2AX (Ser139)	Maus	monoklonal	1:2000	Merck Millipore, Burlington, USA, #05-636

### 2.2.2 Sekundäre Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Klonalität</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
IRDye <sup>®</sup> 680RD <i>goat anti-rabbit</i>	Kaninchen	polyklonal	1:7500	LI-CORE <sup>®</sup> Biosciences, Lincoln, USA, #925-68071
IRDye <sup>®</sup> 680RD <i>goat anti-mouse</i>	Maus	polyklonal	1:7500	LI-CORE <sup>®</sup> Biosciences, Lincoln, USA, #925-68070
IRDye <sup>®</sup> 680RD <i>donkey anti-goat</i>	Ziege	polyklonal	1:7500	LI-CORE <sup>®</sup> Biosciences,

				Lincoln, USA, #925-68074
IRDye® 800CW <i>goat ant- rabbit</i>	Kaninchen	polyklonal	1:7500	LI-CORE® Biosciences, Lincoln, USA, #925-32211
IRDye® 800CW <i>goat anti-mouse</i>	Maus	polyklonal	1:7500	LI-CORE® Biosciences, Lincoln, USA, #925-32210

### 2.3 siRNA

<b>siRNA</b>	<b>Hersteller</b>
ON-TARGET plus Cyclophilin B Control-siRNA	Dharmacon™, Inc., Lafayette, USA #SO-2436533G
Silencer™ Pre-Designed siRNA MSH6	Thermo Fisher™ Scientific, Waltham, USA #AM16708

### 2.4 Zellmedien und Reagenzien

<b>Kennzeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
0,05 % Trypsin-EDTA	Life Technologies, Carlsbad, USA #25300-054
AmnioMax™	Life Technologies, Carlsbad, USA #17001-074
AmnioMax™-C100-Supplement	Life Technologies, Carlsbad, USA #12556-023

<i>Dulbecco's Modified Eagel Medium</i> (DMEM)	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Steinheim, Deutschland #D6429
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland #S0615
Natriumpyruvat	Life Technologies, Carlsbad, USA #11360-039
Opti-Mem <sup>®</sup>	Life Technologies, Carlsbad, USA #11058-021
<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> (RPMI)	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Steinheim, Deutschland #R8758

## 2.5 Puffer und Lösungen

<b>Kennzeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
10 x TBS	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl (pH 7,5)
10 x TBS-T	TBS 0,05 % Tween <sup>®</sup> 20
10 x Tris-Glycin(TG)-Puffer	1,92 M Glycin 250 mM Tris Base
Blockierlösung ( <i>Western Blot</i> )	1 x TBS-T 10 % BSA-Pulver
Einfriedmedium	90 % FKS 10 % DMSO
Ethanol	70 %

---

Färbelösung (FACS)	0,1 % Triton X-100 10 µL/10 ml RNase Propidiumiodid
Färbelösung (Koloniebildungstest)	0,1 % Kristallviolett in bidest. H <sub>2</sub> O
Laufpuffer ( <i>Western Blot</i> )	1:10 TG-Puffer 1:100 SDS bidest. H <sub>2</sub> O
PBS-T	0,1 % Tween <sup>®</sup> 20 PBS
PBS, pH 7,4	137 mM NaCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O 2,7 mM KCL
Transferpuffer ( <i>Western Blot</i> )	1:10 TG-Puffer 1:5 Methanol

---

## 2.6 Chemikalien

---

<b>Kennzeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
BD FACSTM Clean	BD Biosciences, New Jersey, USA #340345
BD FACSTM Flow	BD Biosciences, New Jersey, USA #342003
BD FACSTM Flow	BD Biosciences, New Jersey, USA #340346
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Steinheim, Deutschland

---

---

	#A7030
Coulter-Isoton™ II Lösung	BeckmannCoulter™ GmbH, Krefeld, Deutschland #8448011
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland #D2650
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland #106586
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland #100983
Glycin	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland #3783
HiPerFect Transfektionsreagenz	Quiagen, Venlo, Niederlande #301705
Kaliumchlorid (KCL)	Merck, Darmstadt, Deutschland #104936
Kristallviolett	Merck, Darmstadt, Deutschland #115940
MagicMark™ XP Western Protein Standard	Thermo Fisher™ Scientific, Waltham, USA #LC5602
Methanol	J. T. Baker, Pleasant Prairie, USA #8045
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland #D2650
Propidiumiodid (PI)	Merck, Darmstadt, Deutschland #537059

---

---

Ribonuklease A (RNase)	Serva, Heidelberg, Deutschland #34388
SeeBlue <sup>®</sup> Plus2 Pre-stained Protein Standard	Life Technologies, Carlsbad, USA #LC5925
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Steinheim, Deutschland #L4509
Temozolomide (TMZ; gelöst in DMSO)	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Steinheim, Deutschland #T2577-25MG
Tris-Base	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Steinheim, Deutschland #T1503
Triton X-100	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Steinheim, Deutschland #T8787
Tris HCl	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Steinheim, Deutschland #T3253
Tween <sup>®</sup> 20	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Steinheim, Deutschland #P1379
UltraPure <sup>™</sup> <i>Distiled Water</i>	Life Technologies, Carlsbad, USA #10977

---

## 2.7 Verbrauchsmittel

---

<b>Kennzeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Filterpapier Criterion <sup>™</sup> Blotter	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland #170-4085

---



---

Handschuhe, Nitril, Gr. L	Ansell, Yarra Ciry, Australien #700114
Kulturflasche T-175	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland #83.3912
Kulturflasche T-25	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland #83.3910
Kulturflasche T-75	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland #83.3911
Odyssey <sup>®</sup> Nitrozellulose Membran	LI-COR <sup>®</sup> Biosciences, Lincoln, USA #926-31092
Pipettenspitze; 10 µL	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich #771257
Pipettenspitze; 200 µL	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich #737257
Pipettenspitze; 1250 µL	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich #750257
Reagiergefäß; 15 ml	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich #188271
Röhre; 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland #62.559.001
Safeguard <sup>™</sup> Filter Pipettenspitzen; 200 µL	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Detuschland #81-1040
Safeguard <sup>™</sup> Filter Pipettenspitzen; 1000 µL	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Detuschland #81-1050
Safeguard <sup>™</sup> Filter Pipettenspitzen; 100 µL	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Detuschland #81-1012

---

Safeguard™ Filter Pipettenspitzen; 10 µL	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland #81-1011
Serologische Pipette; 1 ml; steril	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland #86.1251.001
Serologische Pipette; 10 ml; steril	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland #86.1254.001
Serologische Pipette; 2 ml; steril	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland #86.1252.001
Serologische Pipette; 25 ml; steril	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland #86.1685.001
Serologische Pipette; 5 ml; steril	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland #86.1253.001
Serologische Pipette; 50 ml; steril	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland #86.1689.001
Zellkulturplatte 6-well	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland #72.690.001
Criterion™ Tris-HCL Gel, 4-15 %	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland #345-0028
Reagiergefäß; 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland #72.690.001
Transferpipette; 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland #86.1171.001

## 2.8 Geräte

<b>Gerätenamen</b>	<b>Herstellern</b>
Autoklav (Evo® 45)	Meditech, Norderstedt, Deutschland

---

Brutschrank (BB 16 CU) (MCO-20AIC)	Heraeus <sup>®</sup> , Hanau, Deutschland
Blot-Kammer (Criterion <sup>™</sup> Precast)	SANYO Electric Co., Ltd., Osaka, Japan
Zellzahlzähler (Coulter Counter Z1 <sup>™</sup> )	Bio-Rad, München, Deutschland
Durchflusszytometer (BD FACScanCanto <sup>™</sup> )	BeckmannCoulter <sup>™</sup> , Krefeld, Deutschland
Eismaschine (FM-120DE-50)	BD Biosciences, New Jersey, USA
Elektrophoresekammer (Criterion <sup>™</sup> Cell)	Hoshizaki, Amsterdam, Niederlande
Heizblock (Thermostat 5320)	Bio-Rad, München, Deutschland
Kolbenhubpipetten (0,5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer (Ikamag <sup>™</sup> Ret)	IKA <sup>™</sup> Labortechnik, Staufen, Deutschland
Mikroskop (Axio Observer Z1)	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland
Schüttler (Polymax 1040) (Mini-Shaker- Modell Kühner)	Carl Roth <sup>®</sup> , Karlsruhe, Deutschland Braun, Melsungen, Deutschland

---

---

(Typ KM 2 - 6113)	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Sterile Werkbank (Herasafe <sup>®</sup> )	Heraeus <sup>®</sup> , Hanau, Deutschland
Vakuumpumpe (Oerlikon Leybold Vacuum)	Leybold GmbH, Pfäffikon, Schweiz
Vortexer (Vortex-Genie <sup>®</sup> 2)	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waagen (P1200, AE160)	Mettler Toledo, Giesen, Deutschland
Wärmeschrank (Modell 400)	Memmert, Schwabach, Deutschland
Wasserbad (WD19/D3)	Thermo Haake GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifugen (Labofuge <sup>®</sup> 400R) (Megafuge <sup>®</sup> 1.0) (Microfuge <sup>®</sup> R)	Heraeus <sup>®</sup> , Hanau, Deutschland  BeckmanCoulter <sup>™</sup> , Krefeld, Deutschland

---

## 2.9 Software

---

<b>Programm</b>	<b>Hersteller</b>
BD FACSDiva <sup>™</sup> 6.1.2	BD Biosciences, New Jersey, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software Inc, San Diego, USA

---

---

Image Studio™ Software

LI-COR® Biosciences, Lincoln, USA

ModFit LT™ Software

Verity Software House, Topsham, England

---

### 3. Methoden

#### 3.1 Zellbiologische Methoden

##### 3.1.1 Zelllagerung und Zellkultivierung

Alle Zellen wurden eingefroren in Einfriermedium (10 % DMSO und 90 % FKS) und in flüssigem Stickstoff bei -196 °C bis zu ihrer Verwendung gelagert. Das Auftauen, die Überführung in das jeweilige Kultiviermedium und das Passagieren wurde unter sterilen Bedingungen an einer Laborbank durchgeführt. Alle verwendeten Zelllinien waren adhärent wachsend und humaner Abstammung. Die Kultivierung der Zelllinien (U87, LN229, Cas1, U251, BS153vIII-, G96, G120, G130, G140, G142) erfolgt in DME-Medium (DMEM) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 100 % Luftfeuchtigkeit mit einem 10 %igen Zusatz von aktivem fetalem Kälberserum (FKS) und 1:100 Natriumpyruvat, die Zelllinie DKMGvIII- wurde in RPMI-Medium mit inaktiviertem FKS ebenfalls bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 100 % Luftfeuchtigkeit gehalten (s. Tab. 2). Eine Inaktivierung des FKS erfolgte mittels 30-minütiger Inkubation in einem 56 °C warmen Wasserbad. Alle 3-6 Tage wurden die Zellen, je nach Wachstumsgeschwindigkeit passagiert. Hierzu wurde zunächst unter sterilen Bedingungen das vorhandene Medium abgesaugt. PBS-Puffer wurde auf die Zellkultur zum Spülen aufgebracht um anschließend den Zellrasen, nach Zugabe von 1-2 ml Trypsin und 5-10-minütiger Inkubation bei 37 °C vom Flaschenboden zu lösen. Zuletzt wurde die Zellsuspension mit dem entsprechenden Zellmedium resuspendiert (s. Tab. 2) und für weitere Versuche ausgelegt oder erneut kultiviert. Alle verwendeten Lösungen und Puffer wurden vorab mittels bidestiliertem Wasser hergestellt und vor der Nutzung an der sterilen Laborbank autoklaviert. Zellzahlbestimmungen erfolgten in isotoner Lösung des Herstellers (Coulter-Isoton™ II Lösung) an einem Zellzähler der Firma BeckmanCoulter™ (Coulter Counter Z1™).

**Tab. 2: Kulturmedien der verwendeten humanen GBM-Zelllinien.**

<b>Zelllinie</b>	<b>Medium</b>
DKMGvIII-	RMPI + 10 % inaktives FKS
Cas1, U87, U251, LN229, BS153vIII-, G96, G120, G130, G140, G142	DMEM + 10 % aktives FKS + 1:100 Pyruvat

### 3.1.2 Wachstumskurven

Zur Analyse der Zellzyklusverteilung, zur Ermittlung des Zellwachstums und um den Einfluss des Chemotherapeutikums TMZ auf die Proliferation der humanen GBM-Zelllinien zu analysieren, wurden für den Zeitraum von 8 Tagen  $1,0 \times 10^5$  Zellen in  $25 \text{ cm}^2$  Zellkultur (T25), sowie eine T25-Kulturflasche für Tag 1 ausgelegt. Die Zellzahl an Tag 0 wurde durch die initial ausgelegte Zellzahl von  $1,0 \times 10^5$  Zellen definiert. Für jeden Tag war eine T25-Flasche mit TMZ und mit DMSO behandelten Zellen als Kontrolle vorgesehen. Nach einer Anwuchsphase von 24 h wurden die Zellen mit  $20 \text{ }\mu\text{M}$  TMZ und der entsprechend DMSO-Verdünnung behandelt. Zu diesem Zeitpunkt wurde die erste Zellkultur geerntet, ausgezählt und als Tag 2 definiert. Weitere 24 h nach Behandlung wurde Tag 3 wie unter Abschnitt 3.1.1 erläutert, geerntet und die Zellzahl bestimmt. Nach gleichem Schema wurden die verbleibenden T25-Kulturflaschen in den Folgetagen verarbeitet. Die gewonnenen Zellen in Suspension wurden daraufhin für die Zellzyklusanalyse mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS) vorbereitet. Hierzu wurden diese in einem 15 ml Falconröhrchen für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und mit 1 ml PBS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde unter kontinuierlichem vortexen in 4 ml 70 % Ethanol getropft und fixiert. Die Lagerung bis zur Auswertung erfolgte bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.1.3 Herstellung von Ganzzelllysaten

Die Herstellung von Ganzzelllysaten erfolgte im Anschluss an die unter 3.1.1 beschriebene Zellkultivierung. Hierfür wurden  $2 \times 10^5$  Zellen pro well in 6-well-Platten ausgelegt. Zudem wurde eine weitere 6-well-Platte als Zählkontrolle ausgelegt. Die Platten wurden je nach Bedarf für einen zuvor definierten Zeitraum, von 24 h, 48 h oder 72 h bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre und 100 % Luftfeuchtigkeit gelagert. Zum definierten Zeitpunkt wurden die 6-well-Platten aus dem Brutschrank entnommen. Zunächst wurde das alte Medium abgesaugt und der Zellrasen mit 2 ml PBS-Puffer gewaschen. Danach wurde bei der Zählkontrolle pro well 0,5 ml Trypsin zum Lösen der adhären Zellen hinzugegeben und für 5-10 min bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Mittels 2 ml des jeweiligen Mediums (s. Tab. 2) wurden die geernteten Zellen mit dem Medium aufgenommen. Zur Zellzahlbestimmung wurden  $200 \text{ }\mu\text{L}$  aus der Zellsuspension in  $9,8 \text{ ml}$  isotonen Zählflüssigkeit (Coulter-Isoton™ II Lösung) überführt und mittels Zellzähler (BeckmanCoulter™, Coulter Counter Z1™) ausgewertet. Die Zelllinie mit der geringsten Zellzahl wurden in  $150 \text{ }\mu\text{L}$  SDS (*sodium dodecyl sulfat*)-Lysepuffer aufgenommen, alle

weiteren Lysepuffermengen wurden rechnerisch an die Zellzahl angepasst. Mittels Zellschaber wurde das Lysat von der 6-well-Platte gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellysate für 10 s mit Ultraschall behandelt und für weitere 5-10 min bei 95 °C erhitzt. Die Proben wurden unmittelbar verwendet oder bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

### 3.1.4 Koloniebildungstest

Mittels Koloniebildungstest, wurde das dosisabhängige klonogene Überleben der Zelllinien nach Behandlung mit TMZ ermittelt.

#### 3.1.4.1 Bestimmung des Zellüberlebens nach TMZ-Behandlung

Zur Bestimmung des Zellüberlebens nach TMZ-Behandlung, wurde zunächst eine definierte Zellzahl in 6-well-Platten für 24 h zum Anwachsen in dem jeweiligen Medium (s. Tab. 2) ausgelegt. Hierzu wurden 250 Zellen für die Zelllinien BS153vIII- und DKMGvIII- und 350 Zellen für die Zelllinien U87, LN229, U251, Cas1, G96, G120, G130, G140, G142 ausgelegt. Die Zellzahl-Bestimmung erfolgte mittels Zellzähler (BeckmanCoulter™, Coulter Counter Z1™). Es wurde pro Zelllinie zusätzlich eine Platte, die mit dem Lösungsmittel DMSO von TMZ behandelt wurde als Kontrolle ausgelegt. Nach 24 h erfolgte die Behandlung der Zellen mit TMZ, sowie die der Kontrollplatte mit der entsprechenden DMSO-Verdünnung. Die verwendeten TMZ-Konzentrationen lagen bei 5 µM, 10 µM und 20 µM. Das Aliquot des TMZ-Reagenz wurde zwischen den Behandlungen bei -20 °C gelagert, DMSO lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Nach weiteren 24 h unter TMZ-Einfluss wurde bei allen Zellen, einschließlich der DMSO-Kontrollgruppe ein Mediumwechsel vorgenommen. Zur besseren Ausbildung von Kolonien wurden für die Zelllinien Cas1, DKMGvIII-, BS153vIII-, U87, G120 das Nährmedium AmnioMax genutzt. AmnioMax wurde mit AmnioMax-C100-Supplement und 10 % FKS vorab angesetzt. In regelmäßigen Abständen wurde anhand der DMSO-Kontrolle die Koloniebildung überprüft und in Folge fixiert, gefärbt und ausgewertet (s. Abschnitt 3.1.4.3).



#### 3.1.4.2 Bestimmung des Zellüberlebens nach MSH6-*Knockdown* und TMZ-Behandlung

Es wurden die unter Abschnitt 3.1.5 beschriebenen siRNA transfizierten Zellen sowie deren siCyclo Kontrollgruppe auf 6-*well*-Platten ausgelegt. Für die Zelllinie LN229 wurden pro *well*, wie in Abschnitt 3.1.4.1 beschrieben 350 Zellen verwendet. Die verbliebenen Zellen wurden in ein Falconröhrchen überführt und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mittels zelladaptierter SDS-Lysepuffermenge resuspendiert und wie unter Abschnitt 3.1.3 erläutert mittels Ultraschall behandelt und erhitzt. Die gewonnenen Lysate wurden zur Proteinanalyse mittels *Western Blot* (s. Abschnitt 3.2.3) verwendet. Das gleiche Vorgehen galt für die Kontrollgruppen. Die 6-*well*-Platten wurden für 24 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Darauf folgte die Behandlung mittels TMZ in verschiedenen Konzentrationen. Nach weiteren 24 h Inkubation unter oben genannten Bedingungen wurde ein Mediumwechsel vollzogen. Die Fixierung, Färbung und Auswertung erfolgte analog zu Abschnitt 3.1.4.3.

#### 3.1.4.3 Färbung und Analyse des Koloniebildungstests

Nach Absaugen des Restmediums der 6-*well*-Platten wurden die gebildeten Kolonien zunächst mittels 2 ml 70 %igem Ethanol pro *well* für 5 min fixiert. Das verwendete Ethanol wurde nach genanntem Zeitraum verworfen. Nach einer kurzen Trocknungsperiode wurden 2 ml Kristallviolett-Farbstoff pro *well* für 5-10 min hinzugegeben. Der Farbstoff wurde entfernt und Farbstoffreste mittels Leitungswasser abgespült. Nach erfolgter Trocknung konnten die Kolonien ausgezählt werden. Hierbei wurden Kolonien mit mehr als 50 gruppierten Zellen als Kolonie gewertet. Zur Ermittlung der Anwachsrate (*plating efficiency*) wurde der Quotient der ausgezählten Kolonien durch die Anzahl der ausgelegten Zellen gebildet. Die Berechnung der Überlebensrate erfolgte durch Normierung der behandelten Zellen auf die Anwachsrate der unbehandelten Kontrollgruppe.

#### 3.1.5 Transfektion mit siRNA

Zur Supprimierung des Proteins MSH6 wurde in die TMZ-sensitive GBM-Zelllinie LN229 eine proteinspezifische siRNA mittels Lipofection eingebracht. Als Referenz diente eine Cyclophilin B-Kontroll siRNA (siCyclo), sowie eine ausschließlich mit Transfektionsmedium behandelte Probe. Es wurden  $1,5 \times 10^5$  Zellen pro *well* auf einer 6-*well*-Platte in 1,4 ml DME-

Medium ausgelegt und für den Zeitraum von 30 min bei 37 °C inkubiert. In der Zwischenzeit wurde der Transfektionsansatz vorbereitet, welcher 100 µL pro *well* betrug. Die verwendete RNA wurde in RNase/DNase freiem Wasser zu einer Stammlösung von 10 µM gelöst. Die enthaltene Konzentration an siRNA pro Transfektionsansatz lag bei 20 nM pro 100 µL. Der Transfektionsansatz setzte sich aus 15 µL Transfektionsmedium HiPerfect, 3 µL siRNA (bei einer Stammlösung von 10 nM) und 82 µL OptimemMedium pro *well* zusammen. Das Gesamtvolumen pro *well* belief sich nach Zugabe des Transfektionsansatzes auf 1,5 ml. Nach 5 h Inkubation bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 100 % Luftfeuchtigkeit wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Die Zellen wurden hiernach für Koloniebildungstests (s. Abschnitt 3.1.4.2) oder *Western Blots* (s. Abschnitt 3.2.3) weiterverwendet.

## 3.2 Proteinbiochemische Methoden

### 3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht es Proteine anhand ihrer molekularen Größe aufzutrennen. Durch das SDS wird die Ladung der Proteine überlagert, um sie ladungsunabhängig in einem angelegten Spannungsfeld in Abhängigkeit der molekularen Größe aufzutrennen. Hierbei wandern kleine Proteine schneller und in einer vorgegebenen Zeit weiter durch die Polyacrylamid-Membran als große Proteine. Zur späteren Beurteilung der aufgetragenen Proteingröße dient eine Markerbande. Zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die unter Abschnitt 3.1.3 hergestellten Ganzzelllysate verwendet. Zunächst wurden die bei 4 °C gelagerten Lysate mittels Vortex für 5 s homogenisiert und für weitere 5 min bei 95 °C erneut erhitzt. Es wurden Criterion™ Cell (Bio-Rad) Elektrophoresekammern mit Criterion™ Tris-HCL Gradientengel (4-15 %) für die Gelelektrophorese genutzt und mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt. Pro Tasche wurden 20 µL Lysat mittels Pipette aufgetragen. Als Größenstandard wurde in mindestens eine der Taschen 5 µL SeeBlue® Plus 2 Pre-stained Protein Standard oder 5 µL MagicMark XP Western Protein Standard gegeben. Die Blotkammer wurde auf Eis gelegt und initial für 10 min bei 120 V an ein Spannungsgerät angeschlossen. Darauf folgten 60 min unter 190 V. Zur Sicherheit wurde ein sich anschließendes Auslaufprogramm auf 4 h mit 20 V eingestellt. Nach verstrichener Zeit konnte, wie in Abschnitt 3.2.3 genauer beschrieben mit der proteinspezifischen *Western Blot* Analyse fortgefahren werden.

### 3.2.3 Western Blot

Die proteinspezifische Analyse der mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine erfolgte durch deren Übertragung auf eine Odyssey<sup>®</sup> Nitrozellulose Membran (LI-COR<sup>®</sup>) in einer Criterion<sup>™</sup> Precast (Bio-Rad) Blotkammern. Die Membran wurde kurz in destilliertem Wasser und für 10 min in Transferpuffer aktiviert. Die Blotkammer wurde nach Herstellerangaben zusammengebaut und mit Transferpuffer aufgefüllt. Der Transfer erfolgte zumeist über Nacht jedoch mindestens für 4 h bei 4 °C und 50 V. Nach 4 h wurde eine Restspannung von 20 V für die verbleibende Zeit bis zur weiteren Verwendung angelegt. Darauf folgte unter konstantem Schwenken eine einstündige Blockierung der Nitrozellulosemembran mittels Bovines Serumalbumin (BSA). Im weiteren Verlauf wurden die relevanten Antikörper im Verhältnis der Herstellerangaben in 5 % BSA/TBS-T (Bovines Serumalbumin/*tris-buffered saline* mit Tween<sup>®</sup> 20) mit 1:1000 NaAcid angesetzt und über Nacht, oder für mindestens eine Stunde unter kontinuierlicher Schwenkbewegung bei 4 °C inkubiert. Daran schlossen sich 3 je 10-minütige Waschvorgänge mit TBS-T auf einer Schüttelplatte an. Nach erfolgter Waschung wurde der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper ebenfalls in 5 % BSA/TBS-T im Verhältnis 1:7500 angesetzt. Es war darauf zu achten, die korrespondierende Spezies des primären Antikörpers (Maus/Kaninchen) zu verwenden. Es standen rote (IRDye<sup>®</sup> 680RD) und grüne (IRDye<sup>®</sup> 800CW) Fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper zur Verfügung. Die Membran wurde für 45-60 min unter kontinuierlichem Schwenken mit diesem inkubiert. Es schlossen sich erneut 3 je 10-minütige Waschvorgänge mit TBS-T auf einer Schüttelplatte an. Die Detektion und Quantifizierung des proteinspezifischen Fluoreszenzsignals erfolgte im Anschluss mittels LI-COR<sup>®</sup> Odyssey<sup>®</sup> CLx Infrared Imaging System und der zugehörigen Software (Image Studio<sup>™</sup>) des Geräteherstellers. Die Zweikanal Analyse (rot und grün) erlaubte es simultan zwei Antikörper zu detektieren. Als Ladungskontrolle wurde  $\beta$ -Aktin oder GAPDH verwendet.

### 3.3 Durchflusszytometrische Methoden

Die Durchflusszytometrie ist eine quantitative Methode zur Fluoreszenz basierten Analyse von Zellpopulationen, Proteinen und dem DNA-Gehalt von Zellen. Hierzu fließen Zellen in einem Mikrokanal einzeln an einer (Laser-)Lichtquelle vorbei und emittieren dabei optische Signale. Das aus der Lichtbrechung resultierende Streulicht gibt nach Aufnahme mit einem Detektor und Auswertung Aufschluss über die Zellgranularität (*sideward scatter*, SSC) und das Volumen

(*forward scatter*, FSC). Ebenfalls kann die Signalintensität von farbstoffmarkierten Zellen detektiert werden und erlaubt Rückschlüsse auf die Quantität der markierten Struktur.

### 3.3.1 Analyse der Zellzyklusverteilung

Dieses Verfahren dient der Zuordnung von Zellen zu ihrer aktuellen Zellzyklusphase in einer asynchronen Zellpopulation. Die Methode wird sowohl in unbehandelten Zellpopulationen als auch zur Beurteilung von Zellzyklusveränderungen nach Behandlung angewandt. Hierzu wurden die unter Abschnitt 3.1.2 in Ethanol fixierten Zellen verwendet. Die Zell-Ethanol-Suspension wurde, nach Lagerung bei -20 °C vor der weiteren Verwendung erneut zentrifugiert, der Überstand behutsam abgesaugt und das Zellpellet mit 2 ml Waschpuffer versetzt und gevortext. Diese erneut zentrifugierte Probe wurde mit 1 ml der Propidiumiodid (PI)-Färbelösung für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Zellzyklusanalyse erfolgte, nach Überführung der Probe durch einen Gase-Filter in die jeweiligen FACS-Röhrchen an einem Durchflusszytometer der Firma BD Bioscience (BD FACScanCanto™). Die Proben wurden für den Zeitraum der Analyse lichtgeschützt gelagert. Die Datenerhebung am FACS-Gerät erfolgte mittels BD FACSDIVA™ 6.1.2 Software. Zellen mit einem einfachen DNA-Gehalt wurden der G1-Phase zugeordnet. Zellen mit einem doppelten DNA-Gehalt der G2-Phase. Alle Zellen mit DNA-Werten dazwischen wurden der S-Phase zugeordnet. Zur anschließenden Datenauswertung wurde die Modfit LT™ Software genutzt.

### 3.4 Statistische Verfahren

Die statistischen Analysen wurden mittels linearer Regressionstestung in GraphPad Prism 6 vorgenommen. P-Werte wurden wie folgt gekennzeichnet: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

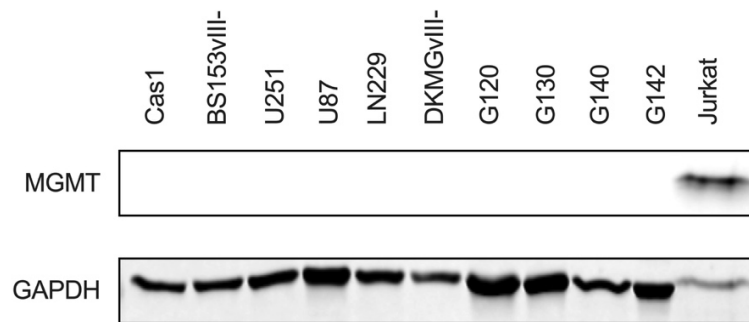
## 4. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die Expression von MMR-Proteinen in humanen GBM-Zelllinien ohne isogenetischen Hintergrund mit der TMZ-Sensitivität korreliert und ob Replikationsstress und die DDR mit der TMZ-Sensitivität assoziiert waren. Derartige Betrachtungen wurden bereits an isogenetischen MGMT-negativen humanen GBM-Zellen, die eine konstitutive Variante des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFRvIII) exprimieren vorgenommen und sollten nun auf ein breiteres heterogenes Zellmodell übertragen werden. Zur Durchführung wurden 10 humane GBM-Zelllinien verwendet (Cas1, BS153vIII-, U251, U87, LN229, DKMGvIII-, G120, G130, G140, G142). Alle verwendeten Zelllinien waren IDH-Wildtyp und MGMT-negativ.

### 4.1 Analyse der TMZ-Sensitivität von GBM-Zelllinien

#### 4.1.1 MGMT-Expression in GBM-Zelllinien

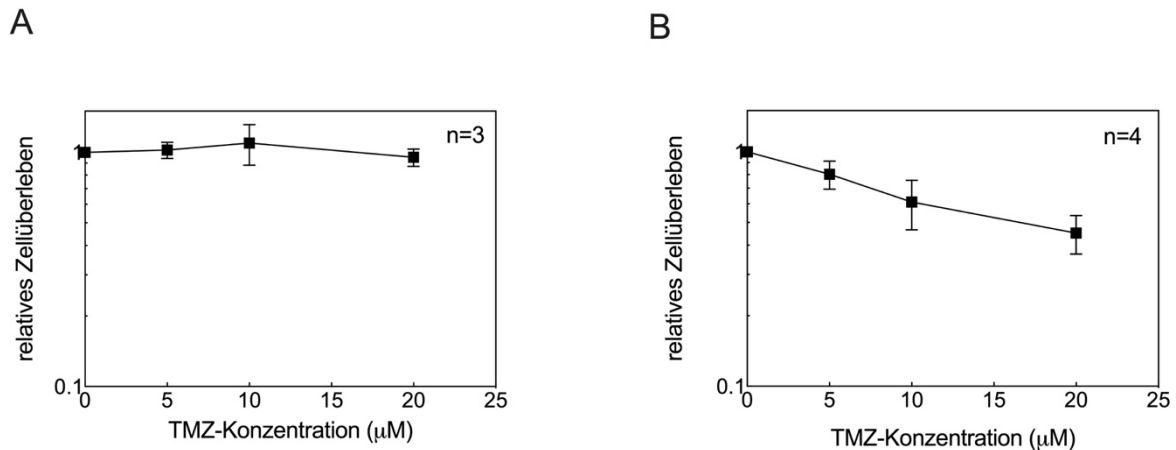
Da bekannt ist, dass die Expression des DNA-Reparaturenzyms MGMT mit einem verminderten Ansprechen auf TMZ einhergeht (Hermisson *et al.*, 2006), wurden im Rahmen dieser Arbeit alle Analysen an MGMT-negativen GBM-Zellen vorgenommen. Zur Sicherstellung, dass die ausgewählten Zelllinien MGMT-negativ waren, wurde mittels spezifischem MGMT-Antikörper im *Western Blot* die MGMT-Proteinexpression der humanen GBM-Zelllinien (Cas1, BS153vIII-, U251, U87, LN229, DKMGvIII-, G96, G112, G120, G121, G122, G124, G130, G140, G141, G142) vorab ermittelt. In 10 der getesteten GBM-Zelllinien konnte keine MGMT-Proteinexpression festgestellt werden. Die übrigen sechs Zelllinien wiesen eine Expression des MGMT-Proteins auf. Abbildung 6 zeigt exemplarisch den *Western Blot* für die MGMT-negativen GBM-Zelllinien, welche für die weiteren Betrachtungen ausgewählt wurden (Cas1, BS153vIII-, U251, U87, LN229, DKMGvIII-, G120, G130, G140, G142). Jurkat-Zellen wurden als Positivkontrolle verwendet und zeigten eine ausgeprägte MGMT-Proteinexpression. Somit war es möglich im weiteren Verlauf die Analysen der TMZ-Sensitivität unabhängig von dem Einfluss des MGMT-Enzyms zu betrachten.



**Abb.6: MGMT Proteinexpression in humanen GBM-Zellen.** Die Abbildung zeigt einen *Western Blot* nach Verwendung eines MGMT-spezifischen Antikörpers. Die Proben wurden auf Zellzahl normiert und jeweils die gleiche Lysatmenge aufgetragen. Jurkat-Zellen dienten als MGMT exprimierende Positivkontrolle. GAPDH diente als Ladekontrolle.

#### 4.1.2 TMZ-Sensitivität von MGMT-positiven und MGMT-negativen GBM-Zelllinien

Zur Bestätigung des beschriebenen Einflusses von MGMT auf die verwendeten Zelllinien, wurde zunächst der zytotoxische Effekt von TMZ exemplarisch mittels Koloniebildungstest anhand der MGMT-positiven G96-Zelllinie (s. Abb. 7A) und der MGMT-negativen DKMGvIII- -Zelllinie (s. Abb. 7B) ermittelt. Hierzu wurden beide Zelllinien jeweils separat mit steigenden Konzentrationen von 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  TMZ behandelt und deren Koloniebildungsverhalten analysiert. Es zeigte sich bei der MGMT-positiven Zelllinie G96 keine nennenswerte Reduktion der Koloniebildung nach durchgeführter TMZ-Behandlung. Weder bei einer geringen Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  TMZ (SF5: 1,01) noch bei der Maximaldosis von 20  $\mu\text{M}$  TMZ (SF20: 0,95) konnte ein ausgeprägter zytotoxischer Effekt beobachtet werden. Bei der MGMT-negativen DKMGvIII- -Zelllinie hingegen, wurde ein deutlicher zytotoxischer Effekt von TMZ festgestellt. Bereits bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  TMZ reduzierte sich das Koloniebildungspotential auf 80 %. Wie zu erwarten, reduzierte sich die Koloniebildung mit steigender TMZ-Konzentration deutlich. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  TMZ um 39 % (SF20: 0,61) und unter Maximaldosis von 20  $\mu\text{M}$  TMZ um 55 % (SF20: 0,45) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

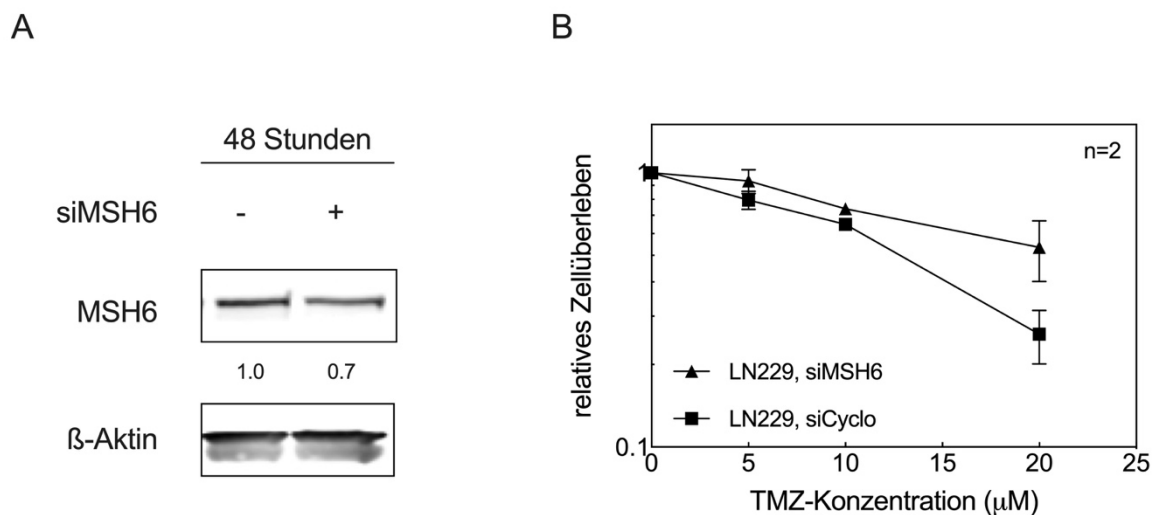


**Abb. 7: TMZ-Sensitivität von G96 (MGMT+) und DKMGvIII- (MGMT-) humanen GBM-Zelllinien.** Exponentiell wachsende Zellen wurden ausgelegt und nach 24 h mit TMZ behandelt. Nach weiteren 24 h erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden nach 5-10 Tagen fixiert, mit Kristallviolett angefärbt und ausgezählt. Hierbei ergaben mehr als 50 Zellen eine Kolonie. Dargestellt sind die Mittelwerte für G96 (A) aus drei und für DKMGvIII- (B) aus vier unabhängigen Sechsfachbestimmungen im Koloniebildungstest, inklusive SEM.

#### 4.1.3. Einfluss des MSH6-Knockdown auf die TMZ-Sensitivität

Aufgrund der essentiellen Bedeutung der MMR bei der replikationsabhängigen Schadensinduktion durch TMZ in MGMT-negativen Zellen (Quiros *et al.*, 2010) wurde exemplarisch für MSH6 der Einfluss auf die TMZ-Sensitivität in GBM-Zelllinien mittels eines *Knockdown*-Experiments untersucht. MSH6 ist zusammen mit MSH2 als Heterodimer MutL $\alpha$  essentieller Bestandteil der Schadenserkennung und damit der erste Schritt in der Schadensvermittlung von TMZ durch die MMR. Die Zellen der GBM-Zelllinie LN229 wurden nach Protokoll mit MSH6-spezifischer siRNA mittels Lipotransfektion behandelt. Cyclophilin B transfizierte Zellen dienten als Referenz. Nach 48 h wurden die Zellen entweder zur Erstellung von Ganzzelllysaten für einen *Western Blot* (s. Abb. 8A) oder für einen Koloniebildungstest ausgelegt (s. Abb. 8B). Die MMR-Proteinexpression von MSH6, im Vergleich zur betrachteten siCyclo Kontrollgruppe nach erfolgreichem *Knockdown* mittels MSH6-spezifischer siRNA war um 30 % reduziert (s. Abb. 8A). Der Einfluss des MSH6 *Knockdowns* auf die TMZ-Sensitivität lässt sich in Abbildung 8B ablesen. Bereits bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M TMZ konnte ein Unterschied zwischen der mit MSH6 spezifischer siRNA behandelten LN229 Zelllinie und der siCyclo Kontrollgruppe ausgemacht werden. Die siMSH6 transfizierten LN229 Zellen zeigten eine Reduktion im zellulären Überleben um 7 % (SF5: 0,93) und waren damit um  $\Delta$ 13 % resistenter als die siCylco Kontrollgruppe (SF5: 0,80). Ähnlich war der Effekt bei der TMZ-Konzentration von 10  $\mu$ M. Das zelluläre Überleben der siMSH6 transfizierten Zellen lag bei 74 % (SF10: 0,74) und unterschied sich von der siCyclo

Kontrollgruppe (SF10: 0,65) um  $\Delta 9$  %. Der stärkste zytotoxische Effekt auf das klonogene Zellüberleben wurde bei der verwendeten Maximalkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  TMZ beobachtet. Die siCyclo Kontrollgruppe wurde in Ihrer Koloniebildungsfähigkeit um 74 % (SF20: 0,26) gehemmt und war somit  $\Delta 28$  % sensitiver als die siMSH6 *Knockdown*-Zelllinie LN229. Die mit siMSH6 behandelten Zellen wurden um 46 % in Ihrer Koloniebildungsfähigkeit gehemmt (SF20: 0,54). Somit konnte der erwartete Effekt einer Resistenzbildung nach *Knockdown* des MSH6 MMR-Proteins für die GBM-Zelllinie LN229 bestätigt werden. Darüber hinaus zeigte sich eine verstärkte Resistenzbildung in siMSH6 transfizierten Zellen im Koloniebildungstest, unter Verwendung steigender TMZ-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe.



**Abb. 8: Einfluss des MSH6-Knockdowns auf die MSH6-Proteinexpression und das zelluläre Überleben nach TMZ-Behandlung in modifizierten LN229 GBM-Zellen.** (A) Zeigt einen *Western Blot* nach Anwendung eines MSH6-spezifischen Antikörpers bei modifizierten LN229 Zellen. Das Auslegen der Ganzzelllysate erfolgte 48 h nach Transfektion mit MSH6 spezifischer siRNA (siMSH6) und Cyclophilin B-siRNA (siCyclo) als Referenz für weitere 48 h. Die Proben wurden auf Zellzahl normiert und jeweils die gleiche Lysatmenge aufgetragen.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. (B) Zeigt das relative Zellüberleben im Koloniebildungstest von LN229 modifizierten Zellen (siCyclo und siMSH6). Exponentiell wachsende Zellen wurden nach Protokoll ausgelegt, nach 24 h mit TMZ behandelt. Es erfolgte ein Mediumwechsel nach weiteren 24 h. Die Zellen wurden nach 5-10 Tagen fixiert, mit Kristallviolett angefärbt und ausgezählt. Hierbei ergaben mehr als 50 Zellen eine Kolonie. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen Sechsfachbestimmungen im Koloniebildungstest, inklusive SEM.

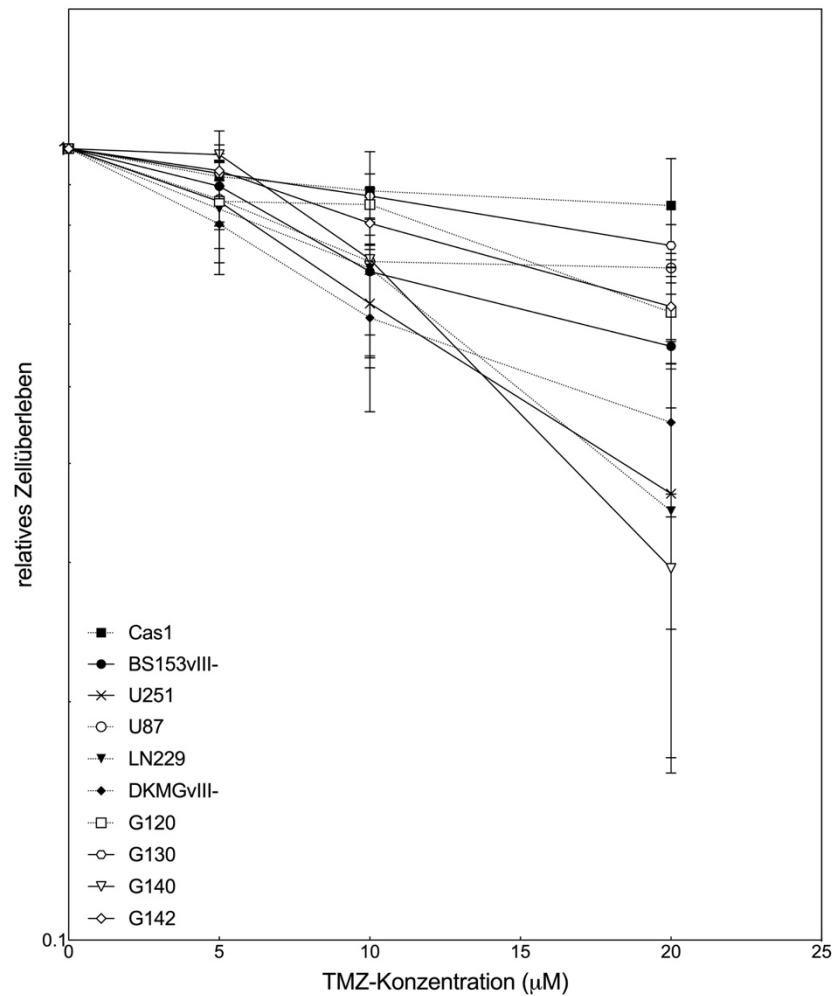
#### 4.1.4 Einfluss von TMZ auf das klonogene Zellüberleben bei MGMT-negativen GBM-Zelllinien

Wie in Abschnitt 4.1.2 dargestellt, konnten ausgeprägte Schwankungen in der Wirkung von TMZ in der MGMT-negativen und MGMT-positiven Zelllinie festgestellt werden. Um herauszufinden, wie das Ansprechverhalten auf TMZ in einem breiten Spektrum an MGMT-negativen GBM-Zelllinien ausfällt, wurden hierzu die 10 zuvor selektierten MGMT-negativen GBM-Zelllinien auf ihre Koloniebildungsfähigkeit in Abhängigkeit steigender TMZ-

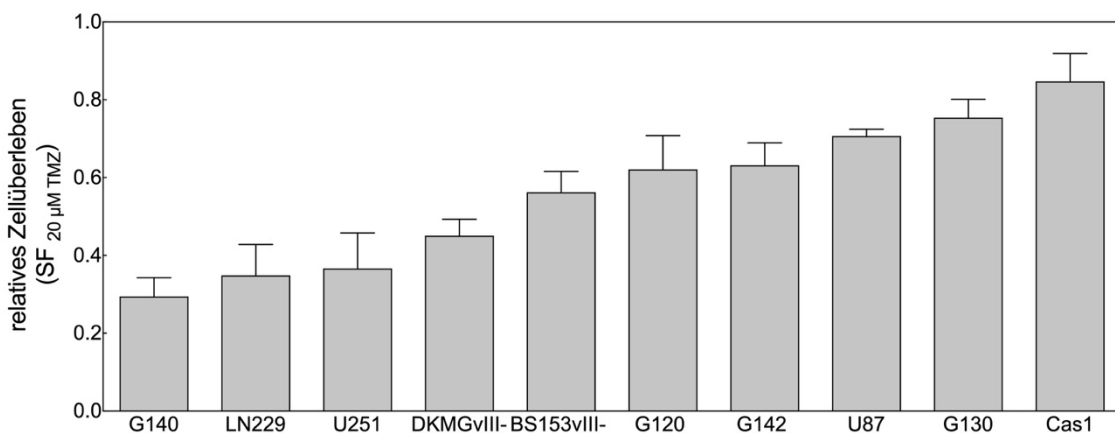


Konzentrationen untersucht. Es zeigte sich ein breites Spektrum im Ansprechen auf TMZ. Wie in Abbildung 9A zu erkennen ist, variierte das zelluläre Überleben je nach Zelllinie bereits bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M TMZ um circa 20 % innerhalb der betrachteten Zelllinien. Das zelluläre Überleben der Zelllinie DKMGvIII- ist bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M um 20 % reduziert (SF5: 0,80) und damit das Ansprechen auf TMZ am sensitivsten. Hingegen zeigte sich bei der Zelllinie G140 lediglich eine geringe Reduktion im zellulären Überleben um 2 % (SF05: 0,98), trotz des sensitivsten Ansprechens bei der betrachteten Maximalkonzentration von 20  $\mu$ M TMZ (SF20: 0,29). Die weiteren GBM-Zelllinien wiesen bei 5  $\mu$ M TMZ ein relatives Überleben in absteigender Reihenfolge wie folgt auf: G142 (SF5: 0,94) > G130 (SF5: 0,93) > Cas1 (SF5: 0,92) > BS153vIII- (SF5: 0,90) > U87 (SF5: 0,87). G120 (SF5: 0,86) und U251 (SF5: 0,86) unterschieden sich nicht im zellulären Überleben. Die Koloniebildungsfähigkeit von LN229 wurde ebenfalls bereits bei einer geringen TMZ-Konzentration von 5  $\mu$ M stark gehemmt (SF5: 0,84). Eine steigende Konzentration von TMZ führte, wie zu erwarten, zu einer verstärkten Zellinaktivierung. Dieser Effekt war je nach Zelllinie unterschiedlich stark ausgeprägt. Bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M TMZ ergab sich in absteigender Reihenfolge folgendes relatives Überleben für die GBM-Zelllinien: Cas1 (SF10: 0,88) > G130 (SF10: 0,87) > G120 (SF10: 0,85) > G142 (SF10: 0,80). G140 (SF10: 0,72) und U87 (SF10: 0,72) wiesen das gleiche zelluläre Überleben auf. Bei LN229 (SF10: 0,71) > BS153vIII- (SF10: 0,70) > U251 (SF10: 0,64) > DKMGvIII- (SF10: 0,61) konnte ein sensitiveres Ansprechen auf TMZ festgestellt werden. Abbildung 9B zeigt exemplarisch das zelluläre Überleben aller Zelllinien für die TMZ Konzentration von 20  $\mu$ M TMZ als Balkendiagramm. In absteigender Reihenfolge ergab sich für die GBM-Zelllinien folgendes zelluläres Überleben: Cas1 (SF20: 0,85) > G130 (SF20: 0,75) > U87 (SF20: 0,71) > G142 (SF20: 0,63) > G120 (SF20: 0,62) > BS153- (SF20: 0,56) > DKMG- (SF20: 0,45) > U251 (SF20: 0,37) > LN229 (SF20: 0,35) > G140 (SF20: 0,29). Das Koloniebildungsverhalten von U87 verhielt sich nahezu konstant bei einer Konzentrationsverdopplung von 10  $\mu$ M TMZ (SF10: 0,72) auf 20  $\mu$ M TMZ (SF20: 0,71). Cas1-Zellen waren mit einem relativen Überleben von 85 % bei 20  $\mu$ M (SF20: 0,85), wie auch schon bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M TMZ (SF10: 0,88) am resistentesten.

A



B

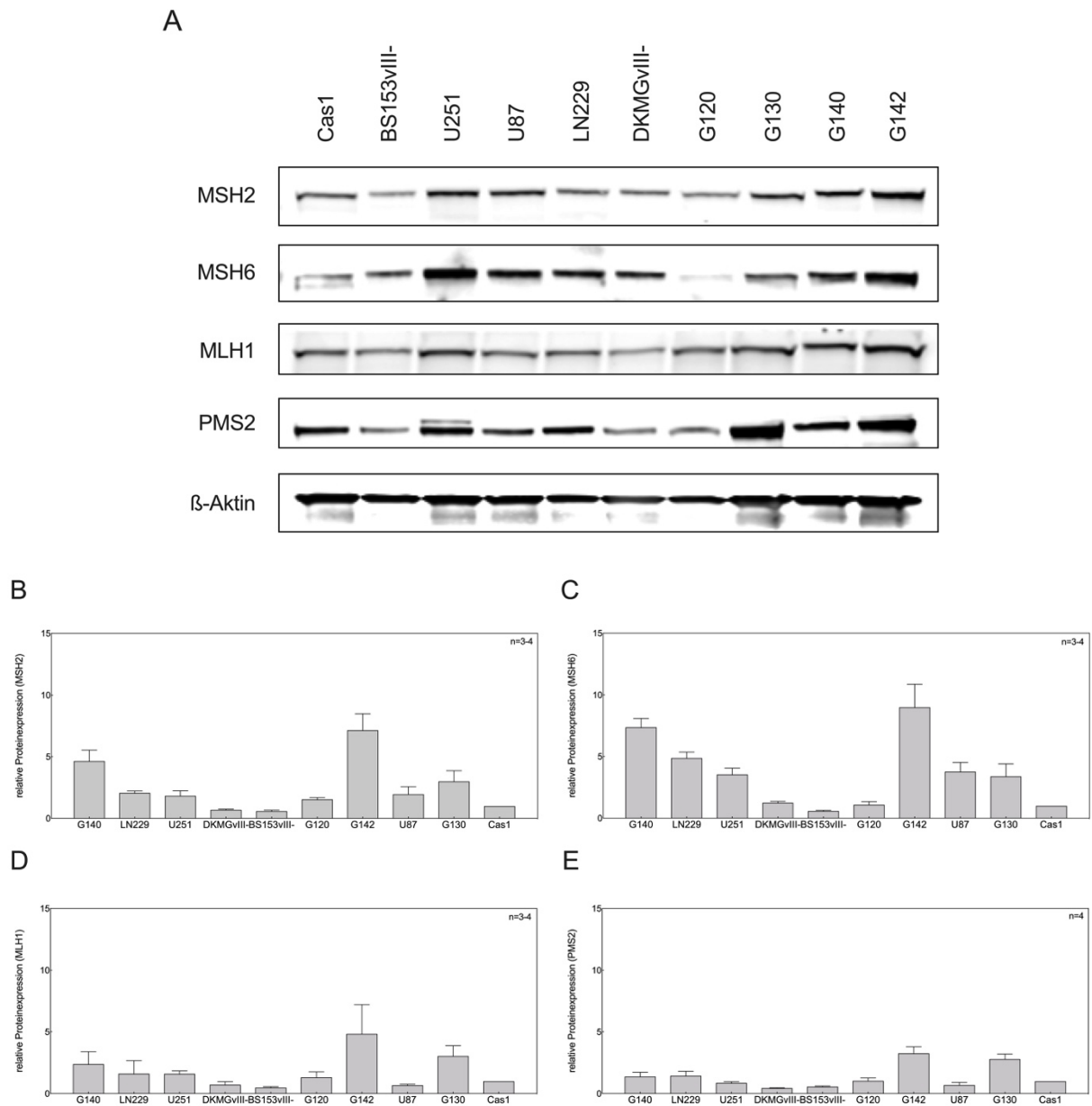


**Abb. 9: Relatives Zellüberleben humaner GBM-Zelllinien nach TMZ Behandlung.** (A) Zeigt das relative Überleben der GBM-Zelllinien in Abhängigkeit der TMZ-Konzentration (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M). (B) Zeigt das relative Zellüberleben der GBM-Zelllinien nach einer TMZ-Behandlung von 20  $\mu$ M TMZ in aufsteigender Reihenfolge als Balkendiagramm. Exponentiell wachsende Zellen wurden ausgelegt und nach 24 h mit TMZ behandelt. Nach weiteren 24 h erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden nach 5-10 Tagen fixiert, mit Kristallviolett angefärbt und ausgezählt. Hierbei ergaben mehr als 50 Zellen eine Kolonie. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei bis sechs unabhängigen Sechsfachbestimmungen im Koloniebildungstest, inklusive SEM.

## 4.2 Einfluss der Expression von MMR-Proteinen auf die TMZ-Sensitivität von GBM-Zelllinien

### 4.2.1 Analyse der basalen MMR-Proteinexpression in GBM-Zelllinien

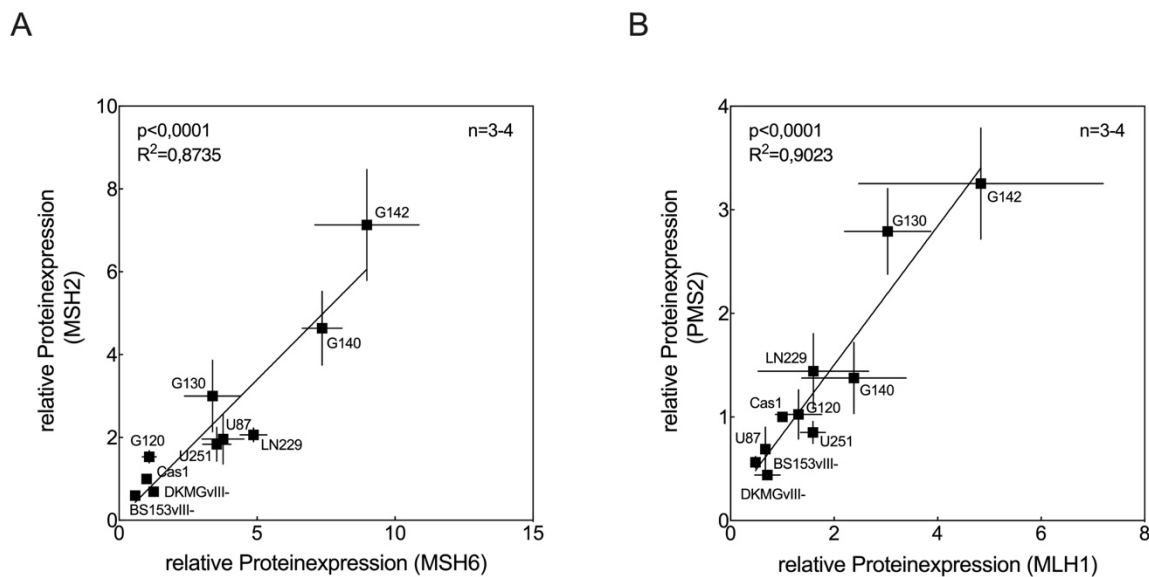
Wie in Abschnitt 4.1.3 gezeigt, konnte nach *Knockdown* des MMR-Proteins MSH6 mittels siRNA eine Resistenzerhöhung in MGMT-negativen LN229 Zellen erreicht werden. Darüber hinaus zeigte sich in Abschnitt 4.1.4, dass die 10 betrachteten MGMT-negativen GBM-Zelllinien ein sehr heterogenes Bild im Ansprechen auf die TMZ-Behandlung aufwiesen. Diese Sensitivitätsschwankungen zeigten sich bei allen verwendeten TMZ-Konzentrationen (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 20  $\mu$ M). Da bekannt ist, dass die Wirkung von TMZ in Zellen, die kein MGMT exprimieren, größtenteils von einer funktionalen MMR abhängt (Zhang *et al.*, 2012), wurde im Folgenden die basale Proteinexpression der MMR-Proteine und deren möglicher Einfluss auf die TMZ-Sensitivität in allen 10 GBM-Zelllinien genauer betrachtet. Die quantitative Auswertung erfolgte mittels *Western Blot* und spezifischer Antikörper gegen das jeweilige MMR-Protein. Es konnte in allen 10 GBM-Zelllinien eine basale Expression von MMR-Proteinen detektiert werden. Der *Western Blot* in Abbildung 10A veranschaulicht die heterogene Expression der MMR-Proteine in den untersuchten GBM-Zelllinien. Es wurden alle verantwortlichen Proteine der MMR betrachtet, welche im Zusammenhang mit der replikationsabhängigen Schadensinduktion von TMZ stehen. Dazu zählten MSH2, MSH6, MLH1 und PMS2. Cas1 wurde im Zuge der Betrachtungen als Referenzzelllinie für die MMR-Proteinexpression gewählt. Gründe hierfür waren die ermittelte hohe TMZ-Resistenz bei gleichzeitig mäßiger MMR-Proteinexpression. Es fiel auf, dass G142 Zellen bei allen untersuchten MMR-Proteinen die stärkste Expression aufwiesen (s. Abb. 10B-E). Die geringste Expression von MSH2, MSH6 und MLH1 konnte bei BS153vIII- Zellen ermittelt werden. PMS2 wurde am geringsten in DKMGvIII- Zellen exprimiert (s. Abb. 10E). Eine detaillierte Übersicht der heterogenen MMR-Proteinexpressionslevel finden sich in Form von Balkendiagrammen in Abbildung 10B bis E wieder.



**Abb. 10: Basale MMR-Proteinexpression in GBM-Zellen.** (A) Zeigt einen *Western Blot* nach Anwendung von MMR-spezifischen Antikörpern bei MGMT-negativen GBM-Zelllinien. Es wurde die basale Proteinmenge detektiert ohne vorausgegangene Behandlung. Die Proben wurden auf Zellzahl normiert und jeweils die gleiche Lysatmenge aufgetragen.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. (B-E) Zeigt die jeweilige quantifizierte Proteinmenge als Balkendiagramm. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bis vier unabhängigen *Western Blots*, inklusive SEM. Die Proteinexpression wurde auf Cas1 normiert.

Aufgrund des bekannten funktionalen Zusammenhangs von MSH2 und MSH6 im Rahmen der MMR, wurde die Abhängigkeit der Expression dieser beiden Proteine in allen untersuchten GBM-Zelllinien analysiert. MSH2 und MSH6 bilden zur Erkennung von DNA-Schäden das Heterodimer Mut $\alpha$ , welches essentiell für die MMR ist (Z. Li *et al.*, 2016). Wie Abbildung 11A zeigt, war eine vermehrte Expression des MMR-Proteins MSH6 mit einer erhöhten MSH2-Expression in den untersuchten Zelllinien assoziiert. Es konnte ein positiver signifikanter Zusammenhang der Dimerisierungspartner mittels linearer Regressionsanalyse ( $p < 0,0001$ ) in

dem hier betrachteten heterogenen Zellmodell festgestellt werden. MutL $\alpha$ , ein weiteres für die MMR notwendiges Heterodimer bestehend aus MLH1 und PMS2, dient der Rekrutierung von Proteinen an die Schadensstelle und zur Koordination des weiteren Reparaturprozesses (Kunkel und Erie, 2005). Die mittels linearer Regressionsanalyse durchgeführte statistische Analyse ergab, wie in Abbildung 11B dargestellt, ebenfalls einen positiven signifikanten Zusammenhang bei der Proteinexpression von MLH1 und PMS2 ( $p < 0,0001$ ). Eine vermehrte Expression des MLH1 Proteins war mit einem erhöhten Proteinlevel an PMS2 assoziiert.

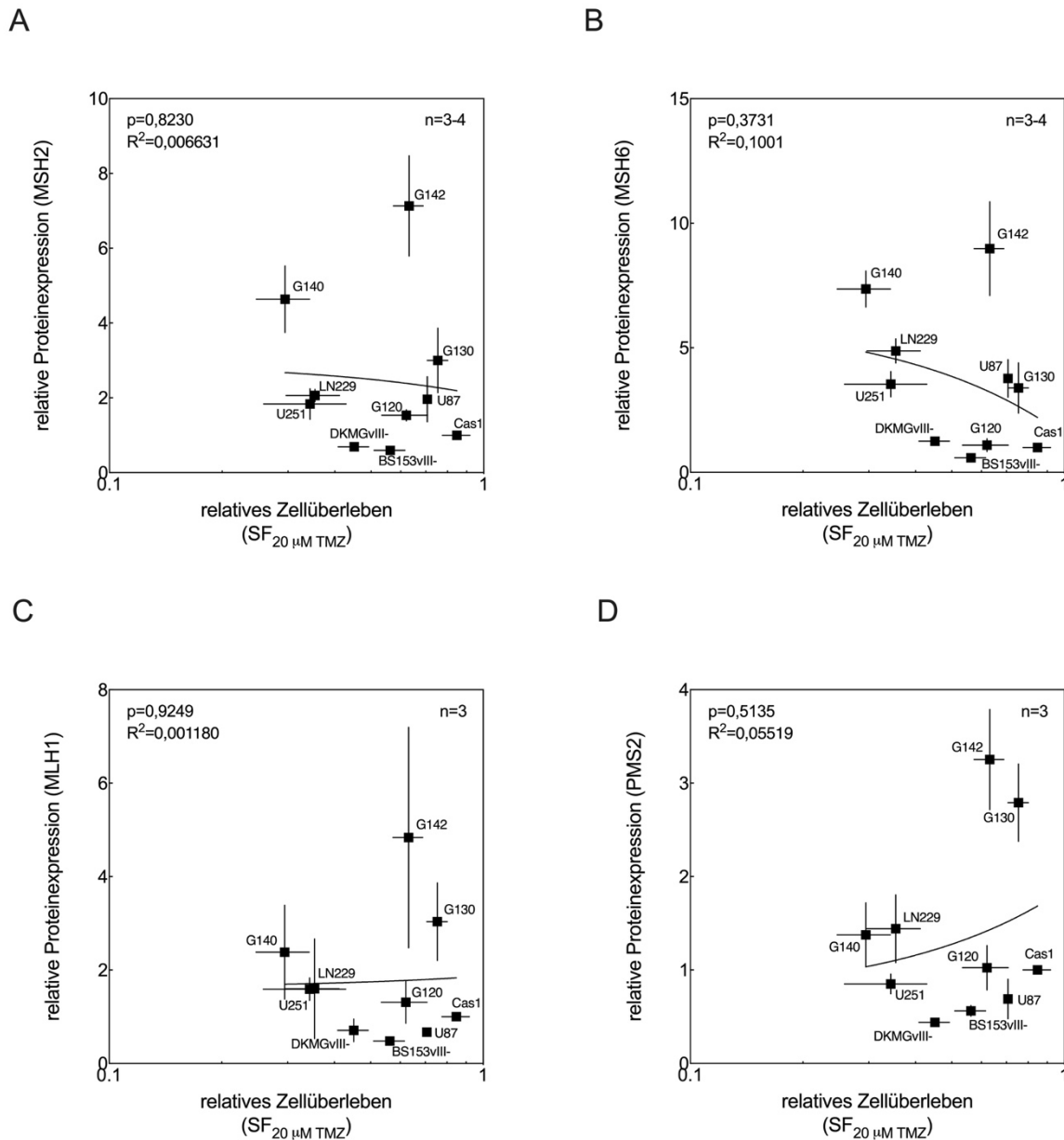


**Abb. 11: Korrelation der Expression der Dimerisierungspartner von MutS $\alpha$  und MutL $\alpha$ .** Es wurden mittels linearer Regressionsanalyse der Zusammenhang der jeweiligen Dimerisierungspartner von MutS $\alpha$  (MSH2 und MSH6) und MutL $\alpha$  (MLH1 und PMS2) statistisch analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bis vier unabhängigen *Western Blots* inklusive SEM. Es erfolgte eine Normierung auf Cas1. (A) Zeigt die signifikante Korrelation zwischen MSH2 und MSH6. (B) Zeigt die signifikante Korrelation zwischen MLH1 und PMS2.

#### 4.2.2 Zusammenhang zwischen der MMR-Proteinexpression und der TMZ-Sensitivität

Zur Klärung einer der Kernfragen dieser Arbeit, ob ein Zusammenhang zwischen der Expression von MMR-Proteinen und der TMZ-Sensitivität in einem heterogenen Zellmodell von humanen GBM-Zelllinien bestand, wurde diese Fragestellung statistisch geprüft. Bereits der unter Abschnitt 4.1.3 beschriebene Einfluss des *Knockdowns* des MMR-Proteins MSH6 und die resultierende Resistenzbildung der LN229 Zelllinie nach TMZ-Behandlung, zeigte einen bestehenden Zusammenhang zwischen der TMZ-Sensitivität und dem MMR-Proteinexpression. Um abschließend zu klären, ob sich ein möglicher Zusammenhang zwischen der MMR-Proteinexpression und der TMZ-Sensitivität in heterogenen GBM-Zelllinien auch statistisch absichern lässt, wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Hierzu wurde die mittels *Western Blot* detektierte basale MMR-Proteinmenge der relevanten Proteine aus drei

bis vier unabhängigen Experimenten gemittelt und gegen die TMZ-Sensitivität der humanen GBM-Zelllinien, nach Behandlung mit TMZ aufgetragen. Die Daten für das relative Zellüberleben basierten auf den in Abschnitt 4.1.4 gezeigten Koloniebildungstest. Die verwendete Konzentration von TMZ lag für die beschriebene Betrachtung aufgrund der Vergleichbarkeit zu klinischen Wirkspiegeln, bei 20  $\mu\text{M}$  (Portnow *et al.*, 2009).



**Abb. 12: Korrelation der MMR-Proteinexpression und TMZ-Sensitivität in GBM-Zelllinien.** Es wurde mittels linearer Regressionsanalyse geprüft ob die MMR-Proteinexpression (MSH6, MSH2, MLH1 und PMS2) mit der TMZ-Sensitivität in GBM-Zelllinien korreliert. Das zelluläre Überleben nach 20  $\mu\text{M}$  TMZ wurde mittels Koloniebildungstests (s. Abschnitt 4.1.4.) ermittelt. Die Proteinexpression wurde mittels *Western Blot* quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bis vier unabhängigen *Western Blots* und drei bis sechs unabhängigen Sechsfachbestimmungen im Koloniebildungstest, inklusive SEM. Es erfolgte eine Normierung auf Cas1.

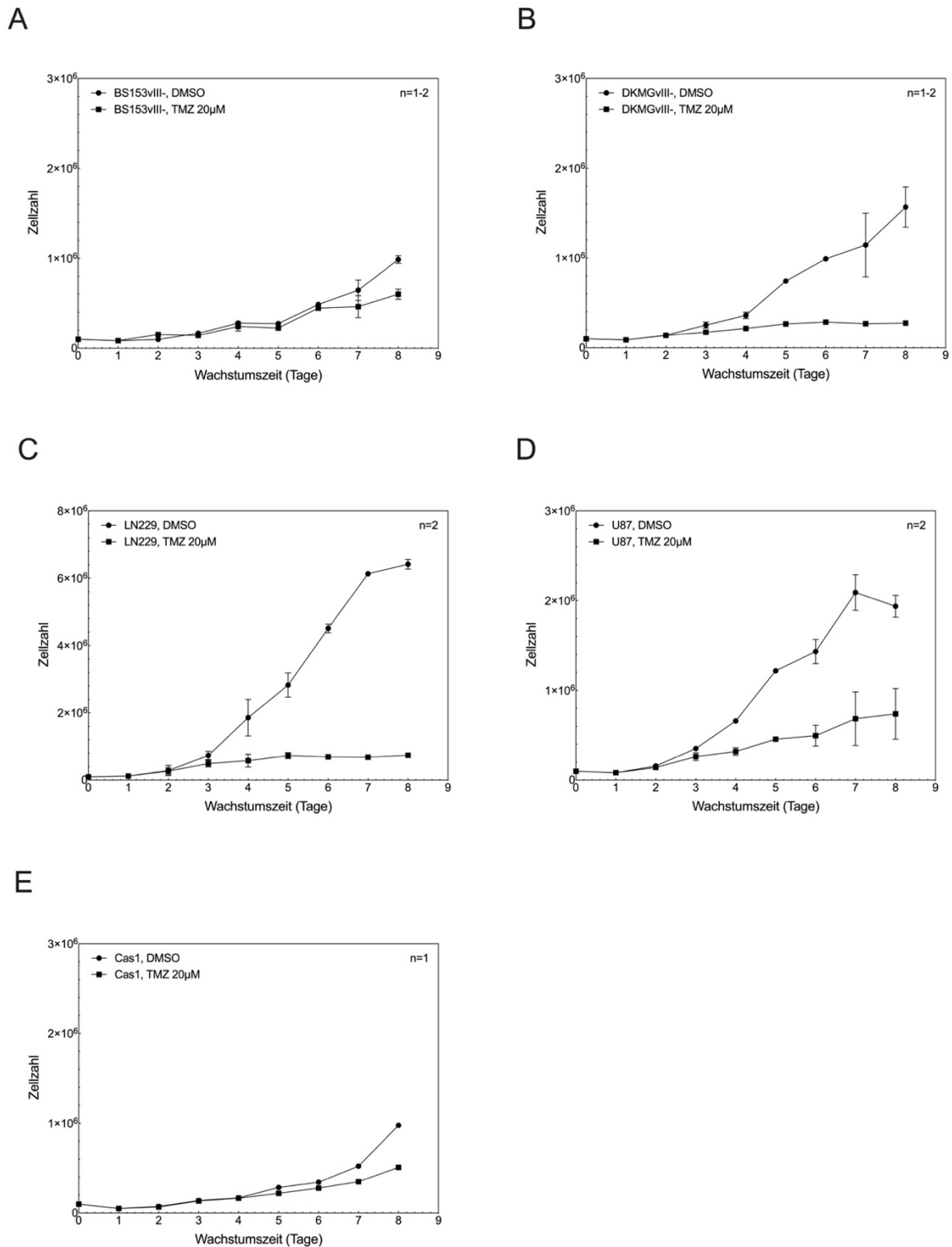
Abbildung 12 zeigt zusammenfassend die Ergebnisse nach angewandter linearer Regressionsanalyse. Es ergaben sich folgende p-Werte für die lineare Regressionsanalyse der MMR-Proteine und dem zellulären Überleben: MSH2 ( $p=0,8230$ ), MSH6 ( $p=0,3731$ ), MLH1 ( $p=0,9249$ ) und PMS2 ( $p=0,5135$ ). Damit konnte für keines der vier untersuchten MMR-Proteine (MSH2, MSH6, MLH1 und PMS2) ein signifikanter Zusammenhang in Bezug auf die TMZ-Sensitivität in dem vorliegenden heterogenen GBM-Zellmodell gezeigt werden.

### 4.3 Einfluss von TMZ auf die Proliferation und die Zellzyklusverteilung von GBM-Zelllinien

#### 4.3.1 Einfluss von TMZ auf das Proliferationsverhalten von GBM-Zelllinien

Um den Einfluss von TMZ auf die Proliferation zu analysieren, wurden zunächst exemplarisch für die etablierten Zelllinien Cas1, BS153vIII-, U87, LN229 und DKMGvIII- Wachstumskurven erstellt. Hierzu wurden exponentiell wachsende Zellen zur Behandlung mit TMZ und jeweils einer unbehandelten DMSO-Kontrolle ausgelegt und in zeitlichen Abständen von 24 h geerntet und quantifiziert. Die Behandlung mit 20  $\mu$ M TMZ erfolgte einmalig 24 h nach dem Auslegen der Zellen über einen Zeitraum von 24 h bis zum Mediumwechsel. Es ließen sich unterschiedliche Verdopplungszeiten für die betrachteten Zelllinien ermitteln. Die Verdopplungszeit wurde in der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen erhoben und ergab für BS153vIII- und DKMGvIII- eine Verdopplungszeit von ca. 36 bis 48 h. Mit einer Verdopplungszeit von über 48 h wuchsen die Cas1 Zellen von allen betrachteten Zelllinien am langsamsten. U87 wies eine Verdopplungszeit von ca. 24 h auf. LN229 war, mit einer Verdopplungszeit von weniger als 24 h die am schnellsten proliferierende GBM-Zelllinie. Am Tag 8 der Messung konnten 6,5-mal mehr Zellen bei der unbehandelten Kontrolle der schnell proliferierenden LN229 Zelllinie im Vergleich zur DMSO-Kontrolle der BS153vIII- Zelllinie quantifiziert werden. Am selben Tag wurden jedoch nur 1,2-mal so viele Zellen von LN229 in der TMZ behandelten Zellgruppe im Vergleich zu BS153vIII- ausgezählt. Der proliferationshemmende Effekt von TMZ auf die schnell proliferierende Zelllinie LN229 war somit stärker ausgeprägt als bei den BS153vIII- Zellen. Aus Abbildung 13A ist zu entnehmen, dass eine Reduktion der Zellzahl in der Zelllinie BS153vIII- an Tag 8 um 39,1 % im Vergleich zur DMSO Kontrolle resultierte. Betrachtet man im Vergleich die schnell proliferierende Zelllinie LN229 (s. Abb. 13C), ließ sich erkennen, dass TMZ einen stärkeren proliferationshemmenden Effekt auf diese GBM-Zelllinie hatte. In diesem Fall reduzierte sich

die Zellzahl von LN229 im Vergleich zu der Kontrolle um 88,5 % an Tag 8 der Messung. Unter allen betrachteten Zelllinien hatte TMZ den stärksten proliferationshemmenden Effekt bei LN229.



**Abb. 13: Einfluss von TMZ auf die Proliferation von GBM-Zelllinien (BS153vIII-, DKMGvIII-, LN229, U87, Cas1).** Es wurde die gleiche Anzahl an exponentiell wachsenden Zellen zur Behandlung mit 20 µM TMZ und DMSO ausgelegt. An Tag 0 erfolgte die Auslegung der Zellen und an Tag 1 die Behandlung mit TMZ/DMSO. An Tag 2 wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Dargestellt sind die Werte aus ein bis zwei unabhängigen Wachstumsexperimenten, inklusive SEM.



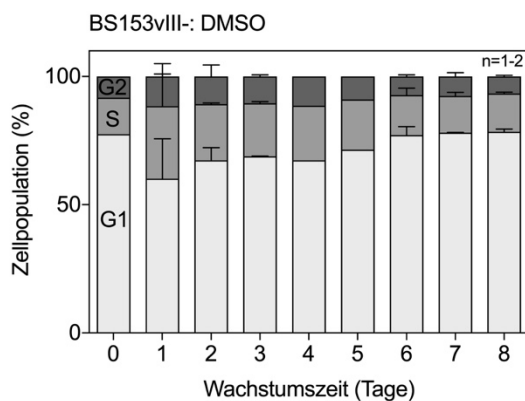
Es ließen sich auch bei den weiteren drei betrachteten Zelllinien unterschiedlich stark ausgeprägte hemmende Effekte von TMZ auf die exponentiell wachsenden Zellen ausmachen. Einen moderaten Einfluss von TMZ auf die Proliferationskapazität, wie bei BS153vIII-, konnte auch in Cas1-Zellen (s. Abb. 13F) beobachtet werden. Erst an Tag 8 stellt sich ein zunehmender Unterschied zwischen der Zellzahl in der TMZ-Kohorte zu der Kontrollgruppe ein. Der quantifizierbare Unterscheid lag an Tag 8 bei 47,9 %. Die verbleibenden Zelllinien U87 und DKMGvIII- zählten ebenfalls zu den Zelllinien mit einem verstärkten wachstumshemmenden Effekt durch TMZ. Bei U87 ließ sich an Tag 8 eine Reduktion der Zellzahl um 61,9 % und bei DKMGvIII- um 82,5 % im Vergleich zur Kontrolle ermitteln. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der stärkste Effekt von TMZ auf das Wachstum bei schnell proliferierenden Zellen deutlich wurde.

#### 4.3.2 Einfluss von TMZ auf die Zellzyklusverteilung von GBM-Zelllinien

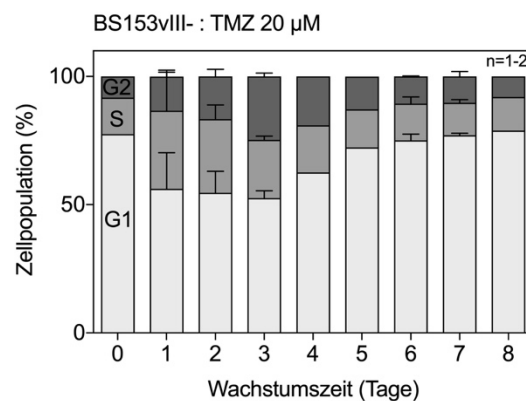
Zur weiteren Charakterisierung der GBM-Zelllinien und zur Beurteilung des Einflusses von TMZ auf die Zellzyklusverteilung, wurden die unter Abschnitt 4.3.1 ausgelegten Zellen im Anschluss mittels Durchflusszytometrie analysiert. Um die Zellzyklusphasen zu differenzieren, wurde der interkalierende DNA-Farbstoff PI genutzt. Die Zellen wurden quantitativ nach dem DNA-Gehalt den Zellzyklusphasen zugeordnet. Ein einfacher DNA-Gehalt liegt in der G1-Phase vor, ein doppelter DNA-Gehalt in der G2-Phase. Zellen, die einen Zwischenwert bei der Auswertung des DNA-Gehalt aufwiesen, wurden der S-Phase zugeordnet. Es zeigte sich eine sehr variable Verteilung bei den untersuchten Zelllinien. Dies galt sowohl für die Zellzyklusverteilung unter DMSO-Behandlung als auch für die Zellzyklusverteilung nach TMZ-Behandlung (s. Abb. 14). In der unbehandelten DMSO-Kontrolle wurde bei allen Zelllinien eine vermehrte Akkumulation der Zellen in der G1-Phase detektiert. U87-Zellen zeigten, ohne Behandlung, den stärksten Zuwachs an Zellen in der G1-Phase im Betrachtungszeitraum. Unabhängig von der Ausgangsverteilung der Zellen konnte bei allen Zelllinien nach TMZ-Behandlung ein Zuwachs an G2-Phase Zellen detektiert werden. Für einige Zelllinien konnte darüber hinaus ein Zuwachs von Zellen in der S-Phase quantifiziert werden. Den maximalen Zuwachs an G2-Zellen nach TMZ-Behandlung erreichte die Zelllinie U87 ( $\Delta G2$ : 52,9 %). Dieses Maximum stellte sich an Tag 3, 48 h nach TMZ-Behandlung ein (s. Abb. 14J). Es konnte unter anderem ein moderater Zuwachs von Zellen in der S-Phase detektiert werden. Nach 2 Tagen und damit am schnellsten, wurde ein G2-Phase Maximum bei der Zelllinie LN229 (s. Abb. 14H) festgestellt. Es wurde ein G2-Zellen Zuwachs von  $\Delta 48,9$

% für die LN229 Zelllinie quantifiziert. LN229 war eine schnell proliferierende Zelllinie mit einer Verdopplungszeit von unter 24 h (s. Abschnitt. 4.3.1). Eine gesteigerte Anzahl von Zellen in der S-Phase im Vergleich zur Kontrolle, konnten bei LN229 ab Tag 5 detektiert werden. Bei Cas1 trat das G2-Phase Maximum am 4. Tage und damit am spätesten ein (s. Abb. 14D). Ebenfalls geringer ausgeprägt, war der Zuwachs an Zellen in der G2 Phase mit  $\Delta 23,2\%$  im Vergleich zu LN229 und U87. Der geringste Zuwachs von Zellen in der G2-Phase nach TMZ Behandlung wurde in den langsam proliferierenden BS153vIII-Zellen detektiert. Das Maximum an G2-Phase Zellen konnte mit  $\Delta 13,3\%$  an Tag 3 quantifiziert werden (s. Abb. 14B). Bei Cas1 und BS153vIII- wurden keine relevanten Schwankungen ( $<6\%$ ) der Zellen in der S-Phase im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ermittelt. Ausschließlich bei BS153vIII- Zellen wurde eine vollständige Normalisierung der Zellzyklusverschiebung im Betrachtungszeitraum festgestellt. Bei DKMGvIII- Zellen wurde vor allem ein Zuwachs von G2-Phase Zellen ermitteln. Eine Verringerung von S-Phase Zellen wurde im Verlauf beobachtet. Der maximale G2-Phase Zuwachs wurde an Tag 3 mit  $\Delta 42,1\%$  im Vergleich zur Kontrolle quantifiziert.

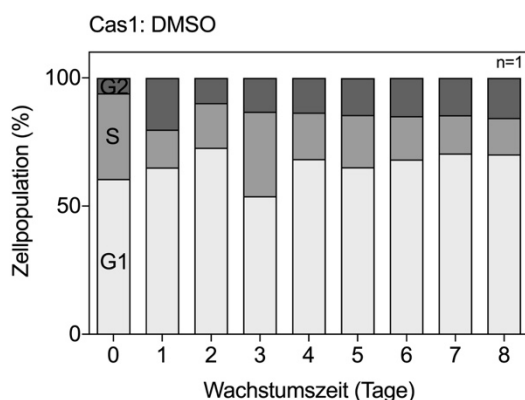
A



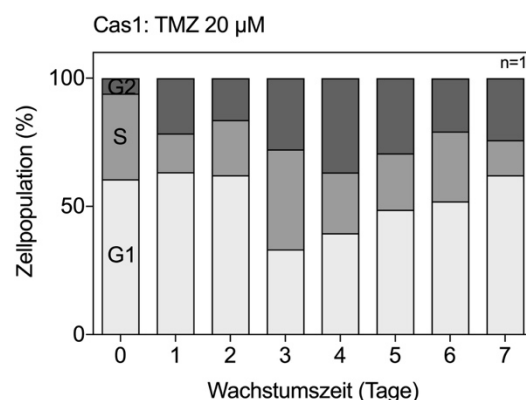
B



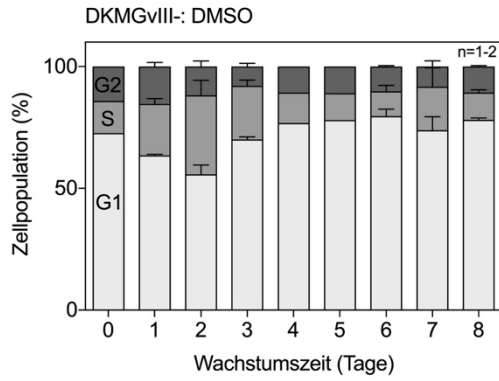
C



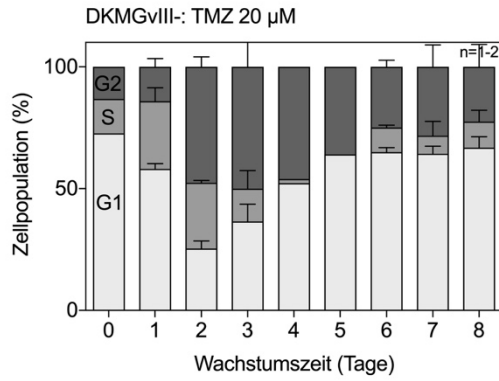
D



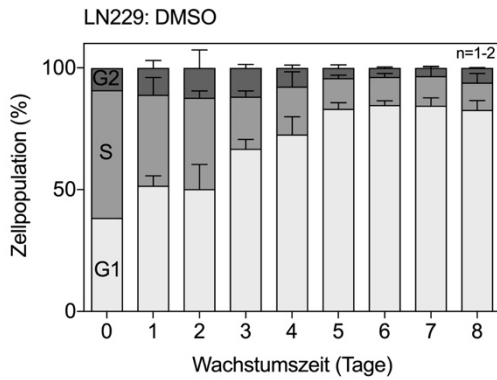
E



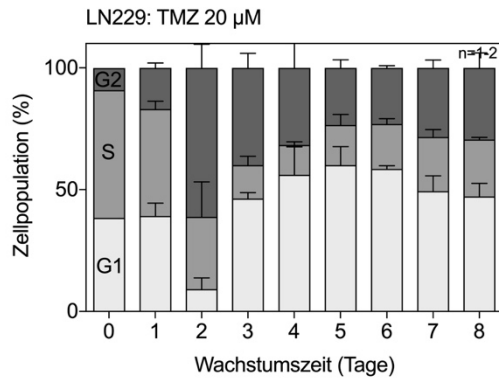
F



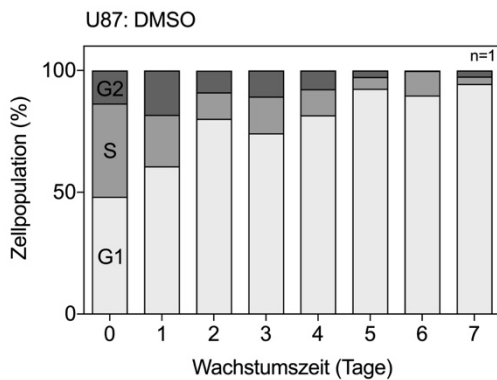
G



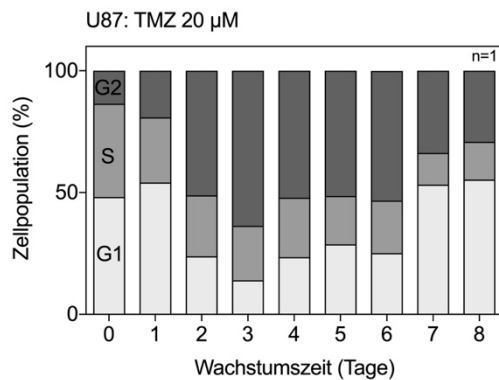
H



I



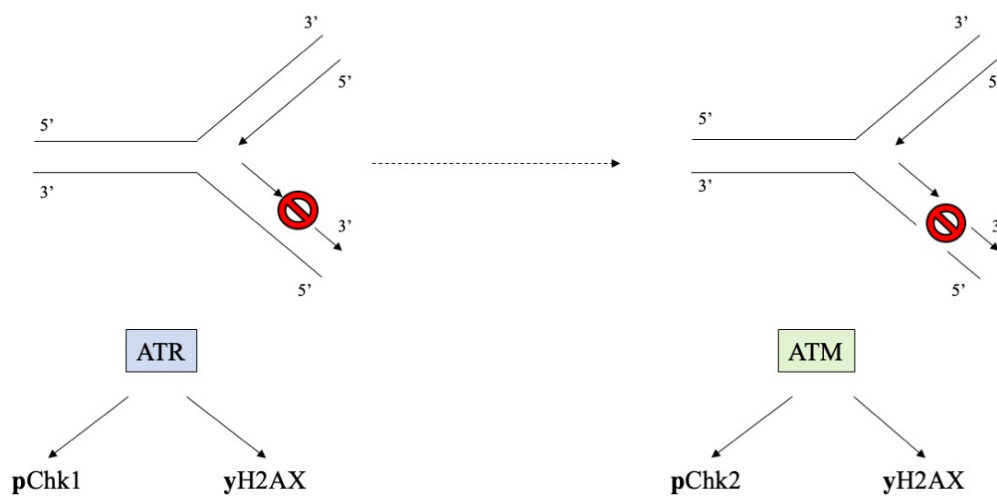
J



**Abb. 14: Einfluss von TMZ auf die Zellzyklusverteilung von GBM-Zelllinien (BS153vIII-, Cas1, DKMGvIII-, LN229, U87).** Die Zellen wurden, wie für die Wachstumskurve beschrieben, ausgelegt und behandelt. Für die Zellzyklusanalyse wurden die Zellen zusätzlich mit dem Farbstoff PI gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus ein bis zwei unabhängigen Messungen, inklusive SEM.

#### 4.4 Einfluss der Expression von DDR- und Replikationsstressproteinen auf die TMZ-Sensitivität von GBM-Zelllinien

Als Replikationsstress werden Störungen der DNA-Replikation unterschiedlichster Ursache bezeichnet die eine reibungslose Progression der Replikation in der S-Phase verhindern und eine Aktivierung von Signalwegen zur Folge haben. Die Replikation kann bspw. aufgrund von SSBs gestört sein, welche im weiteren Verlauf zu DSBs führen können und die Aktivierung der DDR zur Folge haben. Abbildung 15 veranschaulicht stark vereinfacht die aktivierten Signalwege je nach Schadenstyp.

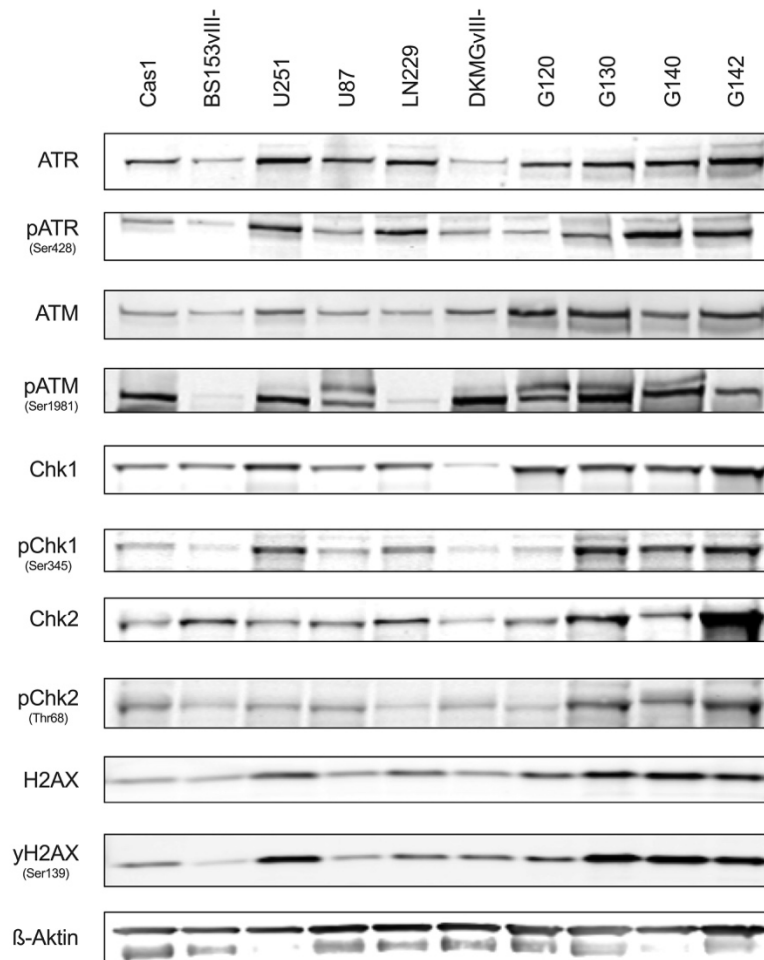


**Abb. 15: Schematische Darstellung der Schadensantwort bei DNA-Strangbruch an der Replikationsgabel.** Die Abbildung zeigt vereinfacht die zelluläre Schadensantwort der Zelle bei Erkennung eines DNA-Strangbruchs (roter Kreis) an der Replikationsgabel. SSBs aktivieren ATR, was eine Phosphorylierung von Chk1 und H2AX zur Folge hat. Aus SSBs können DSBs resultieren. DSBs aktivieren ATM, was eine Phosphorylierung von Chk2 und H2AX zur Folge hat.

In Vorarbeiten von Struve zeigte sich bereits, dass in isogenetischen MGMT-negativen humanen GBM-Zellen, die eine konstitutive Variante des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFRvIII) exprimieren eine gesteigerte Sensitivität gegenüber TMZ im Vergleich zu EGFRvIII-negativen Zellen bestand (Struve, 2015). Im Rahmen dieser Betrachtungen wurde bei der TMZ-sensitiveren Subgruppe (EGFRvIII-positiv) eine vermehrte Expression von MMR-Proteinen detektiert. Darüber hinaus konnte ein erhöhtes Stresslevel in Form von Replikationsstress quantifiziert werden. Dieser wurde für eine mögliche Ursache der vermehrten MMR-Proteinexpression in Betracht gezogen (Struve, 2015). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Zusammenhang von basalem Replikationsstress und DDR in Bezug auf eine gesteigerte TMZ-Sensitivität in einem heterogenen Zellmodell von 10 humanen GBM-Zelllinien genauer betrachtet.

#### 4.4.1 Analyse der Expression von DDR- und Replikationsstressproteinen in GBM-Zelllinien

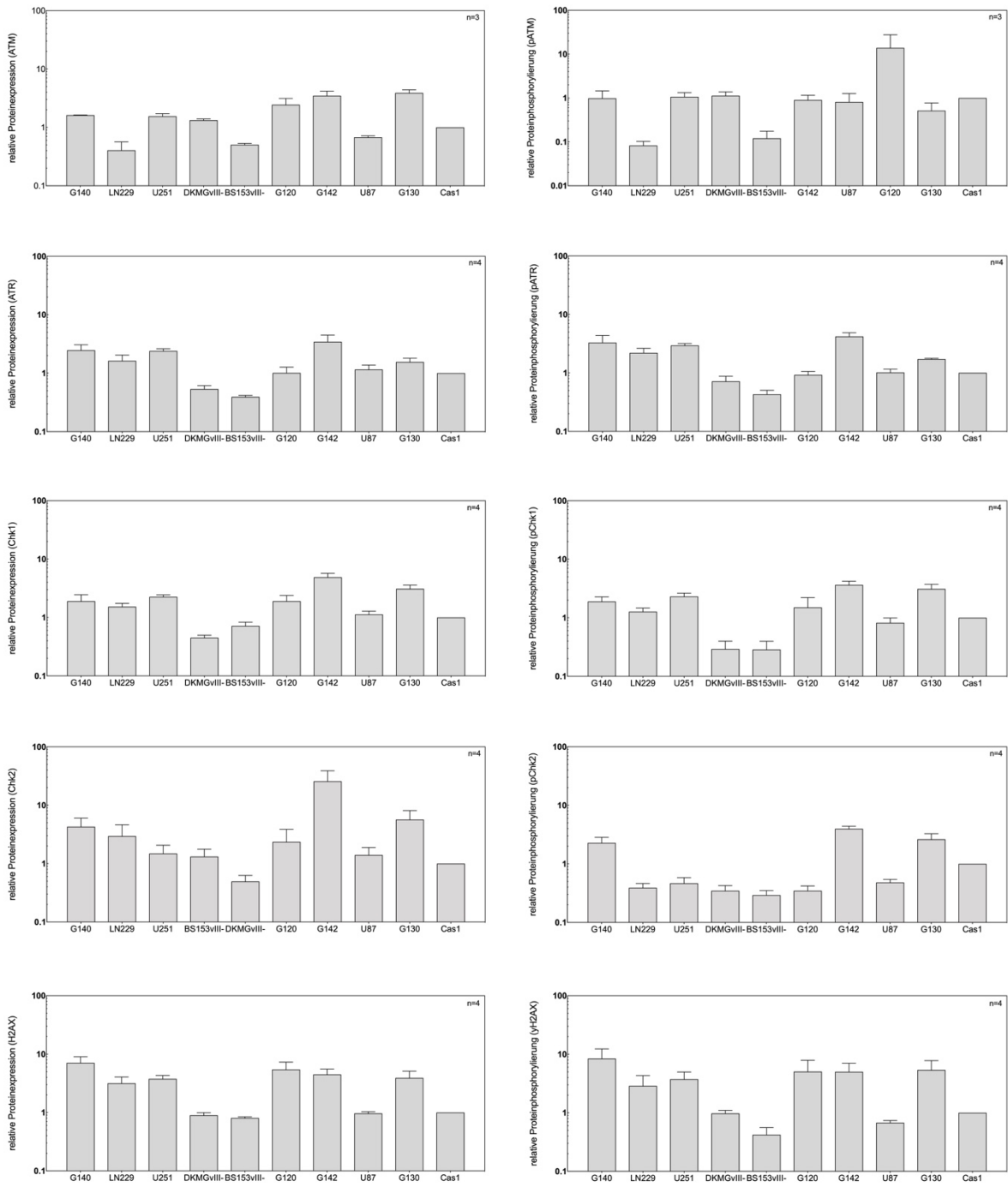
Replikationsstress ist je nach Zelllinie sehr variabel ausgeprägt und führt unter anderem zur Aktivierung von DDR-Signalkaskaden. Abbildung 16 zeigt exemplarisch einen *Western Blot* aller analysierten DDR Proteine dieser Arbeit. Dies schließt die für Replikationsstress spezifischen Proteine ATR, pATR, Chk1 und pChk1 ein. Das Präfix *p* beschreibt den phosphorylierten Zustand des Proteins, was dem Aktivitätsstatus gleichgesetzt wurde. Die in Abbildung 16 unterhalb des Proteins angegebene Zusatzbezeichnung beschreiben die phosphorylierte Aminosäure und deren genaue Lokalisation in der Aminosäuresequenz. Es konnten alle DDR-Proteine in den betrachteten Zelllinien detektiert werden. Hierbei zeigten sich starke Schwankungen im Expressionslevel der DDR-Proteine innerhalb der verschiedenen GBM-Zelllinien. Zur besseren Vergleichbarkeit der Expressionslevel der einzelnen Proteine innerhalb der betrachteten Zelllinien, wurden diese gruppiert nach Proteinen in Abbildung 17 dargestellt. Die Zelllinien wurden entsprechend Ihrer ermittelten TMZ-Sensitivität (s. Abb. 9) mit zunehmender TMZ-Resistenz auf der X-Achse dargestellt. Betrachtet man die Expression der Replikationsstressproteine ATR und Chk1 (s. Abb. 17A) im Detail, fällt auf, dass diese Proteine am stärksten in der TMZ-sensitiven Zelllinie G142 exprimiert wurden. Gleiches gilt für deren phosphorylierte Formen, pATR und pChk1. Die weiteren DDR-Proteine wurden ebenfalls verstärkt in der G142-Zelllinie exprimiert. Auffallend war die detektierte Proteinmenge der *Checkpoint*-Kinase Chk2, welche um den Faktor 25 stärker exprimiert in der Zelllinie G142 im Vergleich zur Referenzzelllinie Cas1 vorlag. Der Aktivitätsindex von pATR/ATR und  $\gamma$ H2AX/H2AX (s. Abb. 17B) wurden bei G142 mit einem Wert größer eins ermittelt. Ein gegensätzliches Bild präsentierte sich in der Zelllinie BS153vIII- bei detaillierterer Betrachtung der Replikationsstressproteine. BS153vIII- wies das geringste Proteinexpressionslevel bei den Proteinen ATR, pATR und pChk1 auf. Ausgenommen war das Protein Chk1, dieses wurde von der Zelllinie DKMGvIII- in geringeren Mengen exprimiert. Es zeigte sich für alle Zelllinien, ausgenommen U87 ein Aktivitätsindex von pATR/ATR größer eins, im Vergleich zur resistenten Referenzzelllinie Cas1 (s. Abb. 17B). Bei keinem weiteren Protein konnte in so vielen Zelllinien ein Aktivitätsindex größer eins festgestellt werden.



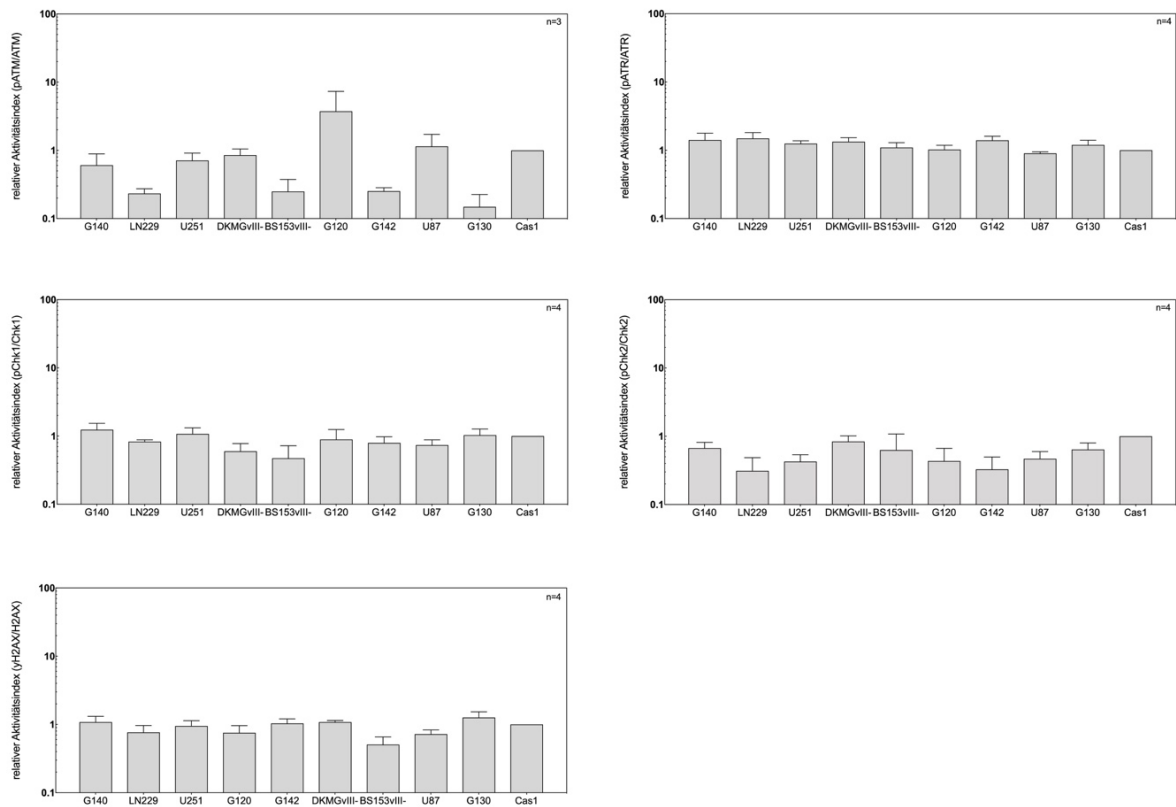
**Abb. 16: Basale DDR Proteinexpression in humanen GBM-Zelllinien.** Die Abbildung zeigt einen *Western Blot* nach Anwendung von DDR-spezifischen Antikörpern bei humanen MGMT-negativen GBM-Zelllinien. Es wurde die basale Proteinmenge detektiert ohne vorausgegangene Behandlung. Die Proben wurden auf Zellzahl normiert und jeweils die gleiche Lysatmenge aufgetragen.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Replikationsstressspezifische Proteine waren ATR, pATR, Chk1 und pChk1. Das Präfix *p* beschreibt den phosphorylierten Zustand des jeweiligen Proteins. Die Zusatzbezeichnung unterhalb benannte die phosphorylierte Aminosäure und deren genaue Lokalisation in der Aminosäuresequenz.

Das gegensätzliche Bild präsentierte sich bei dem Aktivitätsindex von pChk2/Chk2 (s. Abb. 17B). Hier lagen die Werte aller Zelllinien bei kleiner eins und damit geringer als bei der resistenten Referenzzelllinie Cas1. Bei den weiteren betrachteten Proteinen zeigte sich eine heterogene Verteilung. Es konnte kein einheitliches Muster bei der Expression der Proteine in Bezug auf die Zelllinien festgestellt werden. Die Schwankungen bei der Proteinexpression lagen bis zu einem Faktor 10 höher bzw. 0,1 geringer im Vergleich zur Referenzzelllinie Cas1. Zwei Ausnahmen stellten die zuvor genannte Proteinexpression von Chk2 in der G142 Zelllinie, sowie die um den Faktor 13 erhöhte Expression von pATM (s. Abb. 17A) in der Zelllinie G120 dar.

A



B

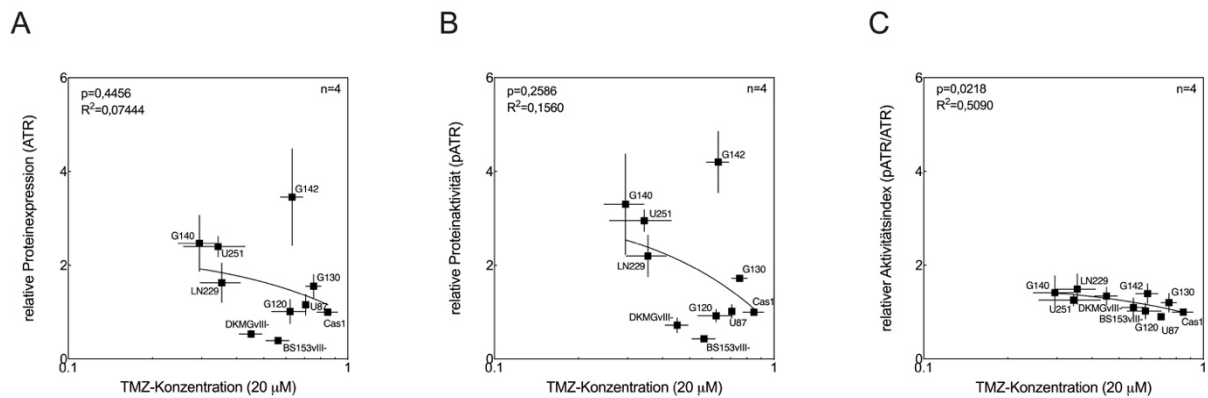


**Abb. 17: Quantitative Analyse der basalen DDR-Proteinexpression in humanen GBM-Zelllinien.** Die Abbildung zeigt die jeweils quantifizierte DDR-Proteinmenge als Balkendiagramm. Es wurde die basale Proteinmenge ohne vorausgegangene Behandlung detektiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bis vier unabhängigen *Western Blots*, inklusive SEM (s. Abb. 16). Die Proteinexpression wurde auf Cas1 normiert. (A) Zeigt linksseitig das relative Proteinexpressionslevel sowie rechtsseitig die jeweilige relative Proteinphosphorylierung. (B) Zeigt den relativen Aktivitätsindex der Proteine.

#### 4.4.2 Zusammenhang zwischen DDR- und Replikationsstress Proteinexpression und TMZ-Sensitivität

Um die zweite Kernfrage dieser Arbeit zu klären, ob ein Zusammenhang zwischen der Expression von DDR-Proteinen und Replikationsstressproteinen in Bezug auf die TMZ-Sensitivität in einem heterogenen Zellmodell von humanen GBM-Zelllinien bestand, wurde diese Fragestellung statistisch untersucht. Hierzu wurden die mittels *Western Blot* detektierten Proteinexpression der DDR-Proteine (s. Abschnitt 4.4.1) gegen die TMZ-Sensitivität der humanen GBM-Zelllinien, nach Behandlung mit 20  $\mu$ M TMZ (s. Abschnitt 4.1.4) aufgetragen und mittels linearem Regressionstest auf Signifikanz geprüft. Abbildung 18 zeigt exemplarisch für das Replikationsstressprotein ATR, dessen Proteinaktivität pATR und deren Aktivitätsindex die ermittelten Graphen und p-Werte.





**Abb. 18: Korrelation der Expression des Replikationsstressprotein ATR, der Proteinaktivität pATR und des Aktivitätsindex (pATR/ATR) mit der TMZ-Sensitivität in humanen GBM-Zelllinien.** Es wurde mittels linearer Regressionsanalyse geprüft ob die Expression von dem Replikationsstressprotein ATR, das Aktivitätslevel von pATR sowie der Aktivitätsindex von pATR/ATR mit der TMZ-Sensitivität in GBM-Zelllinien korrelierte. Das zelluläre Überleben nach 20 µM TMZ wurde mittels Koloniebildungstests (s. Abschnitt 4.1.4) ermittelt. Die Proteinexpression wurde mittels *Western Blot* quantifiziert (s. Abschnitt 4.4.1). Es erfolgte eine Normierung auf Cas1. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen *Western Blots* und drei bis sechs unabhängigen Sechsfachbestimmungen im Koloniebildungstest, inklusive SEM.

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang der Proteinexpression von ATR,  $p=0,4456$  (s. Abb. 18A) und der Proteinaktivität von pATR,  $p=0,2586$  (s. Abb. 18B) in Bezug auf die TMZ-Sensitivität in den betrachteten GBM-Zelllinien. Lediglich für den Aktivitätsindex pATR/ATR konnte eine signifikante Korrelation ( $p=0,0218$ ) berechnet werden. Es war anhand der Abbildung 18A und 18B zu erkennen, dass besonders die GBM-Zelllinie G142 sich weit von der analysierten Punktwolke entfernte. Eine G142 unabhängige Betrachtung führte jedoch ebenfalls zu keinem statistisch signifikanten Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Wie bereits in Abschnitt 4.4.1 aufgrund der heterogenen Verteilung zu erahnen war, bestand auch bei den weiteren betrachteten Replikationsstressproteinen und DDR-Proteinen zwischen dem Expressionslevel und der TMZ-Sensitivität kein rechnerisch signifikanter Zusammenhang in dem heterogenen Zellmodell von GBM-Zelllinien. Die genauen errechneten p-Werte, nach linearer Regressionsanalyse sind für die einzelnen betrachteten Proteine der Tabelle 3 zu entnehmen. Signifikante Werte wurden wie folgt gekennzeichnet: \*:  $p<0,05$ . Es ergab sich eine Schwankung bei den p-Werten von  $p=0,0218$  bei pATR/ATR bis hin zu  $p=0,8701$  bei yH2AX/H2AX.

**Tab. 3: Quantitative Auswertung der Linearen Regressionsanalyse zwischen der DDR-Proteinexpression und TMZ-Sensitivität in humanen GBM-Zelllinien.**

<b>DDR-Protein</b>	<b>p-Wert der Linearer Regressionsanalyse</b>
ATR	0,4456
pATR	0,2586
pATR/ATR	0,0218*
ATM	0,4149
pATM	0,7404
pATM/ATM	0,6401
Chk1	0,7793
pChk1	0,8648
pChk1/Chk1	0,6714
Chk2	0,7298
pChk2	0,6229
pChk2/Chk2	0,3521
H2AX	0,2538
yH2AX	0,3366
yH2AX/H2AX	0,8701

\* p<0,05

## 5. Diskussion

Das GBM ist der häufigste maligne Hirntumor im Erwachsenenalter (Brandes *et al.*, 2008) und geht mit einer infausten Prognose einher. Die mittlere Lebenserwartung nach Diagnosestellung liegt trotz leitliniengerechter Radiochemotherapie mit TMZ bei ca. 14 Monaten (Dunn *et al.*, 2009; Stupp *et al.*, 2005). Ein besseres Therapieansprechen und verlängertes Gesamtüberleben der Patienten ist bei MGMT-methylierten Tumoren zu beobachten (Hegi *et al.*, 2005). Dennoch zeigen sich auch innerhalb der MGMT-negativen Patienten-Subgruppe starke Schwankungen im Ansprechen auf eine TMZ-Behandlung (Dunn *et al.*, 2009). Da bisher neben dem MGMT-Status keine Biomarker für IDH-Wildtyp GBMs bekannt sind, welche sowohl mit einem suffizienteren Therapieansprechen als auch mit einem erhöhten Gesamtüberleben assoziiert werden können, gilt es weitere Marker zu etablieren, mit denen es möglich ist TMZ-resistente Tumoren vor Therapiebeginn zu identifizieren.

Es ist bekannt, dass die MMR eine essentiellen Bedeutung bei der replikationsabhängigen Schadensinduktion von TMZ in MGMT-negativen Zellen einnimmt (Quiros *et al.*, 2010). Der quantitative Einfluss der MMR-Proteinexpression auf die TMZ-Sensitivität in einem heterogenen Zellmodell ist hierbei jedoch noch nicht abschließend geklärt. Des Weiteren ist unklar ob Replikationsstress einen Einfluss auf die TMZ-Sensitivität von GBM-Zellen hat. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit analysiert werden, ob die MMR-Proteinexpression oder der Replikationsstress mit der TMZ-Sensitivität in einem heterogenen Zellmodell von MGMT-negativen GBM-Zelllinien assoziiert ist. Dies könnte dann zum einen die Möglichkeit bieten, mit klinisch erprobten Substanzen, welche bspw. wie Irinotecan während der Replikation wirken, die TMZ-Sensitivität zu erhöhen und zum anderen könnte Replikationsstress oder die MMR-Proteinexpression auf diese Weise als Marker für das Ansprechen auf TMZ etabliert werden.

### 5.1 Analyse der TMZ-Sensitivität von humane GBM-Zelllinien

Zur Klärung dieser Fragestellungen wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst die TMZ-Sensitivität von heterogenen humanen GBM-Zelllinien betrachtet. Hierzu wurden zehn MGMT-negative GBM-Zelllinien untersucht, wobei der MGMT-Status von entscheidender Bedeutung war, da MGMT die Schadenswirkung von TMZ reduzieren kann (Hegi *et al.*, 2005). Daher wurde der MGMT-negative Status vorab bei allen betrachteten Zelllinien mittels *Western Blot* überprüft und sichergestellt. Der bekannte Einfluss von MGMT auf die TMZ-Sensitivität

konnte in eigenen Untersuchungen im gewählten experimentellen Versuchsaufbau anhand eines Vergleichs einer MGMT-negativen (DKMGvIII-) und einer MGMT-positiven (G96) Zelllinie nachvollzogen und bestätigt werden (s. Abb. 7). Die MGMT-negativen DKMGvIII-Zellen wiesen im Vergleich zur MGMT-positiven Zelllinie G96 eine deutlich höhere TMZ-Sensitivität auf (SF20<sub>DKMGvIII</sub>: 0,45 zu SF20<sub>G96</sub>: 0,95). Ein sensitiveres Ansprechen von DKMGvIII- konnte für alle verwendeten Konzentrationen von TMZ (5 µM, 10 µM und 20 µM) beobachtet werden.

Da in keiner der 10 näher betrachteten GBM-Zelllinien MGMT exprimiert wurde (s. Abb. 6), war es möglich in dieser Arbeit die Wirkung von TMZ unabhängig von der MGMT-Wirkung zu betrachten. Für alle Betrachtungen wurden ausschließlich klinisch relevante TMZ-Konzentrationen bis 20 µM verwendet (Portnow *et al.*, 2009). Trotz des einheitlichen MGMT-negativen Status zeigte sich ein sehr heterogenes Ansprechen der GBM-Zelllinien auf die TMZ-Behandlung. Diese starken Schwankungen im zellulären Überleben konnten für alle verwendeten TMZ-Konzentrationen ermittelt werden. Bei einer Konzentration von 20 µM TMZ beispielsweise, reichten diese im zellulären Überleben von SF20: 0,85 für die TMZ-resistenteste Zelllinie Cas1, bis zu SF20: 0,29 für die TMZ-sensitivste Zelllinie G140 (s. Abb. 9). Ein vergleichbares Bild präsentierte sich auch in der Arbeit von Hermisson *et al.* (Hermisson *et al.*, 2006). Hier wurden ausgeprägte TMZ-Schwankungen zum Erreichen des halbmaximalen (ED<sub>50</sub>) akut zytotoxischen Effekts (87 µM bis 1290 µM) und des ED<sub>50</sub> von TMZ auf das klonogene Zellüberleben (7 µM bis 511 µM) ermittelt. Diese ausgeprägten Schwankungen wurden sowohl in MGMT-positiven als auch in MGMT-negativen Zelllinien beobachtet. Ebenfalls heterogen präsentierte sich das klonogene Zellüberleben in den Betrachtungen von van Nifterik *et al.* nach einer Behandlung mit 250 µM TMZ (van Nifterik *et al.*, 2010). Klinische Daten von Dunn *et al.* bestätigen den eingangs erwähnten signifikanten Einfluss von MGMT auf das OAS und PFS von GBM-Patienten (Dunn *et al.*, 2009). In der gleichen Arbeit lässt sich darüber hinaus ein variables Ansprechen von MGMT-negativen Patienten auf die Standard-Radiochemotherapie nach Stupp *et al.* erkennen (Stupp *et al.*, 2005). Hierbei wurde das OAS für MGMT-negative GBM-Tumore mit 13,2 bis 20,4 Monaten angegeben (Dunn *et al.*, 2009). Ein variables Ansprechen auf TMZ, welches auch im heterogenen Zellmodell dieser Arbeit beobachtet werden konnte, ist somit ein nicht unbekanntes Phänomen, das sich sowohl in Zellexperimenten als auch in Überlebensdaten von Patienten wiederfindet. Ein Einfluss der TMZ-Behandlung auf den Methylierungsgrad der MGMT-Promotorregion konnte jedoch in therapieresistenten Rezidiven ausgeschlossen werden (Felsberg *et al.*, 2011). Hingegen ist nicht ausgeschlossen, dass sich die MGMT-Expression unter Therapie oder im Rezidiv verändert. In

TMZ-resistenten Zellen, die MGMT exprimierten, konnte ferner beobachtet werden, dass die TMZ-Behandlung zu einer verstärkten MGMT-Expression führte und schließlich in einer gesteigerten TMZ-Resistenz resultierte (Happold *et al.*, 2012). Ein vergleichbares Bild präsentierte sich bei Zelllinien, welche durch konstante TMZ-Exposition eine erworbene Resistenz gegenüber TMZ aufwiesen. Es konnte im Vergleich zur sensitiveren Kontrollgruppe eine vermehrte MGMT-Expression detektiert werden (Zhang *et al.*, 2010). In MGMT-negativen GBM-Zelllinien zeigte sich hingegen keine induzierte Expression von MGMT nach TMZ-Behandlung (Happold *et al.*, 2012). Demzufolge muss die Resistenzerhöhung von MGMT-negativen GBM-Zellen gegenüber TMZ, nach konstanter TMZ-Behandlung andere Ursachen haben. Eine Arbeit von Happold *et al.* machte eine Veränderung in der MMR-Proteinexpression für das schlechtere Ansprechen auf TMZ verantwortlich (Happold *et al.*, 2012).

Da die betrachteten GBM-Zelllinien in dieser Arbeit ebenfalls alle MGMT-negativ waren, liegt ein Einfluss durch die MMR-Proteinexpression auch in diesem Zellmodell nahe. Der durch TMZ verursachte Schaden wird hierbei in Abhängigkeit der MMR-Aktivität im folgenden Replikationszyklus zu DSB prozessiert. Es ist somit anzunehmen, dass MGMT nicht alleine für das Ansprechen auf TMZ verantwortlich ist und weitere Einflussfaktoren die Wirkung von TMZ mitbestimmen.

## 5.2. Einfluss der MMR-Proteinexpression auf die TMZ-Sensitivität in humanen GBM-Zelllinien

Ein relevanter Zusammenhang zwischen einer funktionalen MMR und der zytotoxischen Wirkung von TMZ, wurde bereits 1998 von D'Atri *et al.* beschrieben (D'Atri *et al.*, 1998). Es zeigte sich in einer ausgewählten Kohorte von 33 erstdiagnostizierten GBM-Patienten ein verbessertes TMZ-Ansprechen für Tumoren mit einer reduzierten MGMT-Expression und einer erhöhten MMR-Proteinexpression. MLH1 und MSH2 wurde in Kombination mit dem MGMT-Status ein möglicher prädiktiver Wert für das Therapieansprechen auf TMZ zugeschrieben (Friedman *et al.*, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen der MMR-Proteinexpression in einem heterogenen Zellmodell von MGMT-negativen GBM-Zelllinien und der TMZ-Sensitivität statistisch untersucht. Zur Klärung der Kernfrage, wurden alle relevanten MMR-Proteine, die einen unmittelbaren Einfluss auf die Wirkweise von TMZ haben mittels *Western Blot* analysiert. Dies schloss die Proteine MSH6, MSH2, MLH1 und PMS2 ein (Li *et al.*, 2016).

Es zeigte sich hierbei kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Expressionslevel der MMR-Proteine und dem Ansprechen auf TMZ in dem heterogenen Zellmodell (s. Abb. 10). Jedoch konnte für die Expression der Dimerisierungspartner von MutS $\alpha$  (MSH2 und MSH6) und MutL $\alpha$  (MLH1 und PMS2) eine statistisch signifikante Korrelation ermittelt werden (s. Abb. 11).

Ähnliche Ergebnisse beschreiben Hermisson *et al.* bei der Betrachtung des Zusammenhangs der MMR-Proteinexpression und der TMZ-Sensitivität von drei MGMT-positiven und neun MGMT-negativen GBM-Zelllinien. Die verwendeten TMZ-Konzentrationen der ED<sub>50</sub> für die akute Zytotoxizität und das klonogene Zellüberleben lagen jedoch deutlich höher als in eigenen Experimenten (s. Abschnitt 5.1) (Hermisson *et al.*, 2006). Es konnte dennoch im Einklang mit eigenen Daten und Experimenten von McFaline-Figueroa *et al.* ein signifikanter Zusammenhang der Dimerisierungspartner von MutS $\alpha$ , MSH2 und MSH6 zueinander ermittelt werden (McFaline-Figueroa *et al.*, 2015). MutS $\alpha$  ist das entscheidende Heterodimer bei der Erkennung und Initiierung einer Basenfehlpaarung. Der darüber hinaus in eigenen Experimenten ermittelte signifikante Zusammenhang der Expression der Dimerisierungspartner von MutL $\alpha$ , MLH1 und PMS2 zueinander, wurde von keiner der beiden Arbeiten bestätigt bzw. näher betrachtet. In Experimenten von McFaline-Figueroa *et al.* konnte jedoch nicht nur ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Dimerisierungspartner von MutS $\alpha$  beschrieben werden, sondern auch, im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen, eine signifikante Korrelation zwischen der MMR-Proteinexpression von MSH6 und MSH2 in Bezug auf die TMZ-Sensitivität hergestellt werden (McFaline-Figueroa *et al.*, 2015).

Eine fehlende Korrelation in der eigenen Arbeit lässt sich durch das vergleichsweise große Zellmodell von zehn GBM-Zelllinien erklären, anhand welchem die Korrelation der TMZ-Sensitivität und der MMR-Proteinexpression analysiert wurde. McFaline-Figueroa *et al.* hingegen betrachtete exemplarisch nur eine Zelllinie (U87) mit verschiedenen MMR-Protein Leveln. Darüber hinaus konnte nicht in allen artifiziell generierten TMZ-resistenten Zelllinien eine Reduktion in der MMR-Proteinexpression im Vergleich zur TMZ-sensitiven Kontrollgruppe nachgewiesen werden (McFaline-Figueroa *et al.*, 2015). Als weiterer möglicher Grund sind die verwendeten TMZ-Konzentrationen anzuführen. Diese lagen bei McFaline *et al.* mit bis zu 80  $\mu$ M TMZ um den Faktor vier höher als die klinisch relevante TMZ-Konzentration von 20  $\mu$ M, wie sie in den eigenen Experimenten verwendet wurden (Portnow *et al.*, 2009). Erst bei steigenden Konzentrationen von TMZ und in Abhängigkeit der MMR-Proteinexpression wurde ein signifikanter Zusammenhang in Bezug auf die TMZ-Sensitivität in der Arbeit von McFaline-Figueroa *et al.* deutlich (McFaline-Figueroa *et al.*, 2015). Ein

möglicher, dann auch statistisch signifikanter Zusammenhang im eigenen heterogenen Zellmodell ist daher bei einer Konzentrationserhöhung von TMZ nicht auszuschließen.

Das jedoch auch bei den klinisch relevanten geringeren TMZ-Konzentrationen die MMR-Proteinexpression einen relevanten Einfluss auf die TMZ-Sensitivität hatte, zeigten eigene Ergebnisse eines *Knockdown*-Versuch in der TMZ-sensitiven GBM-Zelllinie LN229. Der *Knockdown* des MMR-Proteins MSH6 mittels MSH6-spezifischer siRNA, resultiere in einer Reduktion der MMR-Proteinexpression von MSH6 um 30 % und einem TMZ-Resistenzanstieg im Koloniebildungstest um  $\Delta 28$  % bei einer verwendeten TMZ-Konzentration von 20  $\mu\text{M}$ . Dieser Zusammenhang wiederum ist konform mit *Knockdown*-Experimenten von McFaline-Figueroa *et al.* und Yip *et al.* und bestätigt den Einfluss der MMR in diesem Zellmodell (McFaline-Figueroa *et al.*, 2015; Yip *et al.*, 2009). Es fiel jedoch auf, dass im *Knockdown*-Versuch von McFaline-Figueroa *et al.* eine Reduktion des MMR-Proteins MSH6 in der GBM-Zelllinie U87 um 68 % nötig war, um eine vergleichbare, ausgeprägte Differenz in der Resistenzhöhung, wie sie in den eigenen Experimenten bei der LN229-Zelllinie beobachtet wurde, zu erzielen (McFaline-Figueroa *et al.*, 2015). Dies unterstreicht den variablen Einfluss von MSH6, in Abhängigkeit der Zelllinie auf die Wirkung von TMZ.

Ein statistisch relevanter Einfluss der Proteinexpression von MSH6 auf die TMZ-Sensitivität in Bezug auf alle GBM-Zelllinien des heterogenen Zellmodells, konnte nicht belegt werden. Das jedoch die MMR-Proteinexpression auch in der klinischen Praxis einen Einfluss auf die Chemotherapie mit TMZ hat, zeigte die immunhistochemische Analyse von Rezidiven (Felsberg *et al.*, 2011). In GBM-Rezidiven und therapieresistenten Gliomen wurden nach TMZ-Behandlung eine geringere Expression an MMR-Proteinen (MSH2, MSH6 und PMS2) detektiert, welche für das reduzierte Ansprechen auf TMZ verantwortlich gemacht wurden. Darüber hinaus identifizierten Cahill *et al.* und Yip *et al.* MSH6-Mutationen in resistenten GBM-Zelllinien nach TMZ-Behandlung. Diese Veränderung konnte auch bei der Auswertung von Tumorproben mittels *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) bestätigt werden (Cahill *et al.*, 2007; Yip *et al.*, 2009). Es ist jedoch anzumerken, dass die GBM-Zelllinien in diesem Zellmodell lediglich einmalig für die maximale Dauer von 24 h mit TMZ behandelt wurden und keiner konstanten Exposition des Chemotherapeutikums ausgesetzt waren. Somit erscheint der Einfluss einer erworbenen MSH6-Mutation durch TMZ-Exposition als Ursache einer Resistenzhöhung in diesem Zellmodell als eher unwahrscheinlich.

Neben den diskutierten Einflüssen von MSH6 und MSH2 auf die TMZ-Sensitivität in GBM-Zelllinien, assoziierte Shinsato *et al.* eine Reduktion der MMR-Proteine MLH1 und PMS2 mit einer Resistenzsteigerung in artifiziell generierten TMZ-resistenten U251 GBM-Zellen.

Darüber hinaus konnte ein signifikanter Zusammenhang der beiden Dimerisierungspartner von MutL $\alpha$ , MLH1 und PMS2, wie in eigenen Daten beschreiben (s. Abb. 11), gezeigt werden (Shinsato *et al.*, 2013). Dies unterstreicht die Abhängigkeit und den funktionellen Zusammenhang der beiden MMR-Dimerisierungspartner im Rahmen der MMR voneinander (Jiricny, 2006). In der TMZ-resistenten Subpopulation von U251 konnte neben einer erniedrigten MLH1 Proteinexpression somit auch nur ein reduzierter Proteinlevel von PMS2 detektiert werden.

Ein vergleichbarer Einfluss von MLH1 und PMS2 konnte bei der Zelllinie U87 in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden. Es fiel auf, dass bei U87 vor allem die MutS $\alpha$  Dimerisierungspartner MSH2 und MSH6 erhöht waren. Die MMR-Proteine des Heterodimers MutL $\alpha$ , MLH1 und PMS2 wurden jedoch nur in geringen Mengen exprimiert. Die Zelllinie U87 präsentierte sich resistenter im Vergleich zu anderen GBM-Zelllinien bei denen alle vier genannten MMR-Proteine vermehrt exprimiert wurden. Beispielsweise konnten bei der Zelllinie LN229 vergleichbare Proteinmengen von MSH2 und MSH6 quantifiziert werden, jedoch wesentlich mehr MLH1 und PMS2 als in U87-Zellen. Dies äußerte sich in einem nahezu doppelt so sensitiven Ansprechen von LN229 auf die TMZ-Behandlung mit 20  $\mu$ M und steht im Einklang mit den Erkenntnissen von Shinsato *et al.* (Shinsato *et al.*, 2013). Somit ist anzunehmen, dass eine Erkennung des Schadens durch MutS $\alpha$  möglich war, jedoch eine Prozessierung und Koordinierung der Schadensantwort durch MutL $\alpha$  aufgrund einer zu geringeren Expression im Vergleich behindert gewesen sein könnte.

Betrachtet man ausgewählte Zelllinien dieser Arbeit, wie beispielsweise G140 und LN229, kann ein möglicher Zusammenhang zwischen einer vermehrten MMR-Proteinexpression (s. Abb. 10) und einem sensitiven Ansprechen auf TMZ (s. Abb. 9) erkannt werden. Es musste dennoch bei der Betrachtung der zehn heterogenen MGMT-negativen GBM-Zelllinien festgestellt werden, dass der Einfluss der MMR auf die TMZ-Schadenswirkung nicht in allen Zelllinien gleich stark ausgeprägt war. Daher ist naheliegend, dass weitere Faktoren die TMZ-Sensitivität von heterogenen GBM-Zellen beeinflussen können und es scheint plausibel anzunehmen, dass diese Mechanismen unterschiedlich stark je nach GBM-Zelllinie ausgeprägt sind und somit in unterschiedlichem Maße zur TMZ-Wirkung und Resistenzbildung beitragen. Da TMZ nicht nur O<sup>6</sup>meG-Läsionen, sondern unter anderem auch N<sup>7</sup>-meG- und N<sup>3</sup>-meA-Läsionen (s. Abschnitt 1.3.3.1) verursacht, ist zu erwarten, dass solche Läsionen bei fehlender Reparatur ebenfalls zu bleibenden Schäden an der DNA beitragen. Der Großteil des Schadens von TMZ wird durch die O<sup>6</sup>meG-Läsionen verursacht, welche 5 % der Gesamtläsionen ausmachen (Denny *et al.*, 1994). Es bleibt davon auszugehen, dass bei der ermittelten variablen



TMZ-Sensitivität (s. Abb. 9) weitere DNA-Reparaturmechanismen eine Rolle spielen. Für die Entfernung der Läsionen N<sup>7</sup>-meG und N<sup>3</sup>-meA ist die BER verantwortlich. Eine BER-Defizienz könnte somit ein mögliches sensitiveres Ansprechen auf TMZ erklären. Der funktionelle Zusammenhang wäre somit gegensätzlich zur MMR, welche benötigt wird um den durch TMZ verursachten Schaden zu vermitteln.

Aufgrund der Tatsache, dass keine detailliertere Betrachtung anderer relevanter Reparaturmechanismen wie der BER, der HR oder dem NHEJ in dieser Arbeit erfolgte, bleibt es ungewiss ob das heterogene Ansprechen auf TMZ auf diese Einflussfaktoren zurück zu führen ist. Dennoch zeigte sich in Arbeiten von Agnihotri *et al.*, dass ein Mangel der DNA-Glykosylase APNG, welche N<sup>7</sup>-meG- und N<sup>3</sup>-meA-Läsionen repariert, zu einem sensitiveren Ansprechen auf TMZ in MGMT-positiven GBM-Zelllinien beitrug (Agnihotri *et al.*, 2012). Ensminger *et al.* hingegen betonen die Relevanz einer funktionalen Glykosylase. Erst die erfolgreiche Initiation der BER führt bei einer gestörter Polymerase- oder Ligaseaktivität zu einer vermehrten Akkumulation von DSBs in der S-Phase der Zelle nach Behandlung mit einem alkylierenden Chemotherapeutikum und dem konsekutiven Zelltod (Ensminger *et al.*, 2014). Somit ist der Einfluss der BER in Bezug auf die Wirkung von alkylierenden Chemotherapeutika noch nicht abschließend geklärt und steht als möglicher Einflussfaktor für das heterogene Ansprechen von TMZ im Raum.

Beispielsweise könnte eine eingeschränkte BER-Kapazität der Zelllinien DKMGvIII- und BS153vIII-, welche beide eine geringe MMR-Proteinexpression aufwiesen (s. Abb. 10) und trotzdem deutlich auf TMZ ansprachen einen möglichen Erklärungsansatz liefern. Hierbei könnte der akkumulierte Schaden durch die Läsionen von N<sup>7</sup>-meG und N<sup>3</sup>-meA zur verstärkten Wirkung von TMZ beigetragen haben. Für Zelllinien, die trotz vergleichbarem MMR-Gehalt unterschiedliche TMZ-Sensitivitäten aufweisen, ist es darüber hinaus möglich, dass die Schwankungen im Ansprechen auf TMZ auch durch die Defizienz weiterer DNA-Reparaturmechanismen wie der HR oder NHEJ zu Stande kommen. In diesem Zusammenhang konnten Roos *et al.* zeigen, dass Zellen die eine Mutation des Proteins DNA-PKcs aufwiesen, welches essentiell für das NHEJ ist, nach TMZ-Exposition eine vermehrte Akkumulation von DSB sowie eine gesteigerte Apoptoserate aufwiesen (Roos *et al.*, 2007).

Eine TMZ-Sensitivierung ist ebenfalls nach Inhibition von PARP, einem reparaturrelevanten Protein der BER und HR in GBM-Zellen zu beobachten (Zhang *et al.*, 2010). PARP-1-Inhibitoren sind bereits bei anderen Tumorentitäten (Ovarialkarzinom und Brustkrebs) von der *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen und wurden in Studien erfolgreich getestet (Kaufman *et al.*, 2015). Die Phase- I-Studie PARADIGM-2 untersucht aktuell den Einfluss von

Olaparib in Abhängigkeit des MGMT-Status bei Kombination mit der GBM-Standardtherapie (Fulton *et al.*, 2018). Diese Therapieoption bietet einen weiteren vielversprechenden Ansatz zur Überwindung von TMZ-Resistenzen in der Behandlung von therapieresistenten GBMs oder Rezidivtumoren. Ebenso konnte im *Knockdown*-Versuch der HR relevanten Proteine, Rad51 und BRCA1 in GBM-Zellen eine Sensitivitätszunahme gegenüber TMZ gezeigt werden (Quiros *et al.*, 2011).

Zur Identifikation weiterer Einflussfaktoren wurden unter anderem der Zellzyklus und das Wachstumsverhalten in ausgewählte Zelllinien genauer betrachtet.

### 5.3. Einfluss von TMZ auf die Proliferation und den Zellzyklus von humanen GBM-Zelllinien

TMZ ist ein Chemotherapeutikum, das in Abhängigkeit einer funktionellen MMR in der Regel im zweiten Replikationszyklus seine zytotoxische Wirkung vermittelt (Wang und Edelmann, 2006). Im vorliegenden Zellmodell konnte ein heterogenes Ansprechen auf TMZ (s. Abb. 9) beobachtet werden. Der Einfluss durch die MMR-Proteinexpression wurde bereits im vorherigen Abschnitt diskutiert (s. Abschnitt 5.2). In wie fern die Proliferationsgeschwindigkeit oder die Zellzyklusverteilung in einem Zusammenhang mit der TMZ-Sensitivität steht, wurde anhand von fünf ausgewählten GBM-Zelllinien (Cas1, BS153vIII-, DKMGvIII-, U87 und LN229) mittels Wachstumskurven und Zellzyklusanalysen untersucht. Bei der Erhebung der Verdopplungszeiten mittels Wachstumskurven zeigte sich ein variables Bild innerhalb der betrachteten Zelllinien. Die schnell proliferierenden Zelllinien U87 und LN229 mit Verdopplungszeiten von 24 h bzw. unter 24 h, wiesen bereits ab Tag 4 im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutlich reduzierte Zellzahl nach TMZ-Behandlung auf. Die langsam proliferierenden Zelllinien Cas1, mit einer Verdopplungszeit von mehr als 48 h und BS153vIII-, mit einer Verdopplungszeit von ca. 36 bis 48 h, zeigten erst ab Tag 7 einen erkennbaren Unterschied in der Zellzahl nach TMZ-Behandlung im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe. Eine Ausnahme stellt die Zelllinie DKMGvIII- dar, welche mit einer Verdopplungszeit von ca. 36 bis 48 h bereits an Tag 5 einen auffallenden Unterschied in der Zellzahl nach TMZ-Behandlung aufwies.

Bei der am schnellsten proliferierenden Zelllinie LN229 zeigte sich der stärkste wachstumshemmende Effekt von TMZ. Betrachtet man die anderen vier Zelllinien, ist der hemmende Effekt von TMZ im Vergleich zu LN229 Zelllinie geringer ausgeprägt. Es lässt sich allerdings kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Proliferationsgeschwindigkeit der

Zelllinien und dem Ansprechen auf TMZ erkennen. In dieser Arbeit wurden nicht alle möglichen Ursache für den wachstumshemmenden Effekt von TMZ auf die proliferierenden Zellen untersucht. Daher kann nur gemutmaßt werden, ob der hemmende Effekt von TMZ, wie von Roos *et al.* beschrieben, aufgrund einer vermehrten replikationsabhängigen Apoptose in den Zellen eingeleitet wurde, oder ob der ermittelte transiente Zellarrest in der G2/S-Phase aus eigenen Experimenten für die beobachtete Wachstumshemmung von TMZ ursächlich war (Roos *et al.*, 2007).

Es präsentieren sich lediglich die Verdopplungszeiten von LN229 und Cas1 im Einklang mit der ermittelten MMR-Proteinexpression und der TMZ-Sensitivität. Die schnell proliferierende Zelllinie LN229 (unter 24 h) exprimiert stark MMR-Proteine und sprach sensitiv auf eine TMZ-Behandlung an. Bei Cas1 präsentierte sich ein gegensätzliches Bild. Die Cas1-Zellen proliferierten langsam mit einer Verdopplungszeit von über 48 h und exprimierten geringe Mengen an MMR-Proteinen und sprachen wie zu erwarten resistent auf TMZ an. Die stärkere MMR-Proteinexpression der DKMGvIII- Zelllinie, im Vergleich zur gleich schnell proliferierenden BS153vIII- Zelllinien stellt einen Erklärungsansatz für den stärker hemmenden Effekt von TMZ auf das Zellwachstum dar. Darüber hinaus besaß DKMGvIII- einen p53-Wildtyp Status im Gegensatz zu BS153vIII-, welcher ebenfalls als weiterer Einflussfaktor für ein verstärktes Ansprechen auf TMZ verantwortlich gewesen sein kann. Diese Überlegung steht im Einklang mit Experimenten von Roos *et al.*, welche vermehrt Apoptose in p53-profizienten GBM-Zellen nach TMZ-Behandlung nachwiesen (Roos *et al.*, 2007). Darüber hinaus bestätigten p53-spezifische *Knockdown*-Experimente von Hermisson *et al.* in p53-profizienten Zellen eine Resistenzzunahme gegenüber TMZ (Hermisson *et al.*, 2006). Unvereinbar mit diesen Beobachtungen, konnte im *Knockdown*-Versuch von McFaline-Figueroa *et al.* weder in TMZ-resistenten noch in TMZ-sensitiven Zellen ein Einfluss von p53 auf die TMZ-Sensitivität beobachtet werden (McFaline-Figueroa *et al.*, 2015).

Um zu untersuchen, ob der p53-Status mit dem Ausmaß des Zellzyklusarrestes nach TMZ-Behandlung assoziiert war und ob dieser wiederum mit der TMZ-Sensitivität korreliert, wurden die ausgewählten Zelllinien mittels Zellzyklusanalyse genauer betrachtet. Der Tumorsuppressor p53 spielt sowohl bei der Regulation des G1- als auch des G2-Phasearrests eine entscheidende Rolle. Im Rahmen eines G1-Arrests kann p53 indirekt durch p21-Induktion hemmend auf CDK2 einwirken um die Zellzyklusprogression zu stoppen (Agarwal *et al.*, 1995; Taylor und Stark, 2001). Zellen die p53 mutiert sind, sind zumeist auf Chk1 zur Einleitung eines Zellzyklusarrests angewiesen (Chen *et al.*, 2006b). Die Zelllinien DKMGvIII- und U87 wiesen einen p53-Wildtyp Status auf, während die Cas1, BS135vIII- und LN229 p53-mutiert

waren. Es war zu erkennen, dass DKMGvIII- und U87 Zellen nach TMZ-Behandlung im Vergleich zu Cas1, BS153vIII- und LN229 einen verstärkten und prolongierten G2/S-Phase Anstieg aufwiesen. Die Zellzyklusverteilung von U87 (p53-Wildtyp) zeigte nach TMZ-Behandlung einen ausgeprägten und über den gesamten Betrachtungszeitraum anhaltenden G2/S-Phase Anstieg (s. Abb. 9J). Diese eigenen Ergebnisse finden sich auch in Betrachtungen von Hirose *et al.* wieder (Hirose *et al.*, 2001a). Der Einfluss von p53 auf den G2-Phase Anstieg konnte durch Hirose *et al.* in einem p53-*Knockdown* bestätigt werden, welcher nach erfolgreicher Ausführung zu einer Aufhebung des G2-Arrest führte, was in einer Sensitivierung gegenüber TMZ resultierte (Hirose *et al.*, 2001a). Ein ausgeprägter G2-Arrest in GBM-Zellen könnte therapeutisch von Nutzen sein, um GBM-Zellen gegenüber einer TMZ-Behandlung, beispielsweise mittels Chk1-Inhibitoren zu sensitivieren (Hirose *et al.*, 2001b).

Es ist somit anzunehmen, dass der G2/S-Phase Anstieg der U87-Zellen in eigenen Experimenten nach Schadenserkennung der MMR unter p53-Einfluss eingeleitet und aufrechterhalten wurde. Die eigenen Daten präsentierten in den fünf betrachteten Zelllinien des heterogenen Zellmodells kein klares Bild über den Einfluss von p53 auf die TMZ-Sensitivität, jedoch konnte ein Einfluss von p53 auf die Einleitung eines G2-Phase Arrests in p53-profizienten Zellen nachvollzogen werden. Dass jedoch auch in p53-mutierten Zelllinien ein G2-Phase Anstieg auftreten konnte, zeigte sich gut sichtbar in der schnell proliferierende Zelllinie LN229 (weniger als 24 h). Dieser wurde mutmaßlich nach Schadenserkennung von Chk1 initiiert und war am zweiten Tag, 24 h nach TMZ-Behandlung am stärksten ausgeprägt. Diese Beobachtung deckte sich mit dem replikationsabhängigen Wirkmechanismus von TMZ im 2. Replikationszyklus (Wang und Edelman, 2006). Der starke Abfall an G2-Phase Zellen am Tag drei, könnte an einem fehlenden aufrechterhaltenden Einfluss von p53 auf den G2-Arrest liegen (Hirose *et al.*, 2001a) und der Tatsache, dass die TMZ-sensitiven Zellen mit unreparierten DSBs weiter im Zellzyklus durch die Mitose voranschreiten. Des Weiteren konnte, wenn auch nur geringer ausgeprägt, in den p53-mutierten Zelllinien BS153vIII- und Cas1 eine Zunahme von G2/S-Phase Zellen beobachtet werden. Diese fiel im Vergleich zu der Zellzyklusveränderung von LN229 deutlich geringer aus und manifestierte sich zeitlich verzögert. Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine geringere Anzahl an DSB in den Zelllinien Cas1 und BS153vIII- nach TMZ-Behandlung sein. Eine genaue Analyse mittels  $\gamma$ H2AX-53BP1-Foci erfolgte in dieser Arbeit jedoch nicht. Darüber hinaus legten eine geringere MMR-Proteinexpression und ein resistenteres Ansprechen auf TMZ im Vergleich zu LN229 eine solche Vermutung nahe.

Neben p53 beeinflussen eine Vielzahl weiterer Proteine den Zellzyklus und damit die Schadensantwort der Zelle. Hierbei spielen unter anderem der Replikationsstress und die DDR eine wichtige Rolle (s. Abschnitte 1.4.3 und 1.4.1). Im Folgenden wird erörtert, in wie weit diese Faktoren im Zusammenhang mit der TMZ-Sensitivität von GBM-Zellen stehen und ob sie möglicherweise als Biomarker für ein suffizienteres Therapieansprechen von TMZ gelten können.

#### 5.4 Einfluss der Expression von Proteinen der DNA-Schadensantwort und der Replikations-Stressantwort auf die TMZ-Sensitivität

Replikationsstress entsteht in Zellen, in denen der Replikationsprozess behindert wird und nicht komplikationsfrei ablaufen kann. Dies ist ein Phänomen, dass vor allem in Tumorzellen auftritt und sowohl durch intrinsische als auch extrinsische Einflussfaktoren (s. Abschnitt 1.4.3) ausgelöst werden kann (Zhang *et al.*, 2016). Replikationsstress ist von zunehmender Relevanz in der Tumorthherapie. In Tumoren mit erhöhtem Replikationsstress kann somit durch eine gezielte Hemmung von Signalwegen der DDR oder dem Einsatz von Chemotherapeutika der Stress auf die Zelle weiter erhöht werden und ein konsekutiver Zelltod ausgelöst werden. Hierzu zählen neben TMZ auch Topoisomerasehemmer (bspw. Irinotecan, Etoposide) oder Antimetabolite (Kitao *et al.*, 2018). Diese finden teilweise, wie bspw. Irinotecan bereits als Alternativoption in der Rezidivtherapie des GBM Anwendung oder werden für neudiagnostizierte GBMs in klinischen Studien erprobt (Herrlinger *et al.*, 2016).

Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die Expression von Replikationsstressproteinen oder die DDR-Proteinexpression in unmittelbarem Zusammenhang mit der TMZ-Sensitivität in einem heterogenen Zellmodell von zehn MGMT-negativen GBM-Zelllinien stand. Darüber hinaus sollte geklärt werden ob sich die DDR oder der Replikationsstress als biologischer Marker für das Ansprechen auf TMZ eignen oder als Indikatoren für ein alternatives Therapieschema dienen können.

Zur Klärung dieser Kernfrage wurden die repräsentativen Replikationsstressproteine (ATR, pATR, Chk1 und pChk1) und die relevanten DDR-Proteine (ATM, pATM, Chk2 und pChk2) mittels *Western Blot* analysiert. Ferner wurde der DNA-Schadensmarker  $\gamma$ H2AX betrachtet, welcher unter anderem in Folge von *stalled replication forks* phosphoryliert wird (He *et al.*, 2015; Szilard *et al.*, 2010). Es konnte wider Erwarten kein signifikanter Zusammenhang zwischen der DDR-Proteinexpression und der Expression von Replikationsstressproteinen in

Bezug auf die TMZ-Sensitivität festgestellt werden (s. Tab. 3). Lediglich der Aktivitätsindex von pATR/ATR korrelierte signifikant ( $p=0,0218$ ) mit der TMZ-Sensitivität (s. Abb. 18).

Der fehlende Zusammenhang lässt sich in Teilen durch die angewandte Methodik begründen. Es erfolgte in dieser Arbeit keine Betrachtung des Replikationsprozesses anhand eines *fiber assays*. Dieser ermöglicht, im Gegensatz zum *Western Blot* eine spezifischere Betrachtung der Initiation, Elongation und Termination von Replikationsprozessen. Darüber hinaus lassen sich bei genauerer Betrachtung der relevanten Signalwege weitere Einflussfaktoren identifizieren, welche in dieser Arbeit nicht mit in die Betrachtungen eingeschlossen wurden. Hierzu zählt das Protein RPA, welches an die freien ssDNA-Abschnitten im Rahmen einer *stalled replication fork* bindet und ATR rekrutiert (Zou, 2003). ATR stabilisiert daraufhin die angehaltene Replikationsgabel (Toledo *et al.*, 2013). Liegt ein reduziertes Level an RPA-Proteinen vor, oder ist der Vorrat an RPA aufgebraucht, bleiben ungeschützte ssDNA-Enden frei zurück und es kommt zu einem beschleunigten Kollaps der Replikationsgabel und zu DSB (Toledo *et al.*, 2013). Somit wird RPA eine wichtige limitierende Funktion für die Stabilität an der Replikationsgabel zugeschrieben.

Eine stabilisierende Eigenschaft übernimmt auch PTEN, im Rahmen einer *stalled replication fork* (He *et al.*, 2015). Der Funktionsverlust des Tumorsuppressors PTEN führt vermehrt zu Replikationsstress (He *et al.*, 2015), einer unkontrollierten Fortführung der Replikation und Mutationen in der Zelle (Feng *et al.*, 2015). Eine PTEN-Mutation findet sich in 20-40 % der humanen GBMs (Li, 1997) und ist mit einem schlechteren Überleben assoziiert (Koul, 2008). In dieser Arbeit lag eine ungleichmäßige Verteilung des PTEN-Status innerhalb der betrachteten Zelllinien vor, weshalb weder ein Zusammenhang zwischen dem PTEN-Status und dem Expressionslevel von DDR- und Replikationsstressproteinen hergestellt werden konnte, noch in Bezug auf die TMZ-Sensitivität. Es ist dessen ungeachtet wohl davon auszugehen, dass der PTEN-Status einen Einfluss auf ein sensitiveres TMZ-Ansprechen in den Zelllinien dieser Arbeit hatte. Diese Vermutung bestätigt die Arbeit von McEllin *et al.* und begründet diese, in PTEN-mutierten Zellen mit einer unzureichenden DSB-Reparatur durch die HR (McEllin *et al.*, 2010). Aus diesem Grunde, bietet die Kombinationstherapie von TMZ mit einem PARP-Inhibitor eine Therapiealternative für PTEN-mutierte GBMs (McEllin *et al.*, 2010). Dieser Therapieansatz steht im Einklang mit dem in Abschnitt 5.2 geschilderten sensitiveren Ansprechen von TMZ bei Kombination mit einem PARP-Inhibitor. Darüber hinaus hebt dies erneut die Wichtigkeit anderer Reparaturmechanismen im Therapieansprechen auf TMZ hervor.

In der Arbeit von Gupta *et al.* wurde die Prozessierung der DNA-Fehlpaarungen (<sup>m</sup>cG:T) durch die MMR, nach Behandlung mit Methylnitronitrosoguanidin (MNNG) für eine Behinderung der Replikation verantwortlich gemacht (Gupta *et al.*, 2018). Dies äußerte sich in vermehrtem Replikationsstress und einem transienten Verweilen der Zellen in der S-Phase. Erst eine MMR-abhängige Aktivierung des ATR-Chk1 Signalwegs führte zu der Einleitung eines G2-Arrest. Eine Inhibition von ATR-Chk1 führte im Umkehrschluss zu einer erhöhten Rate an kollabierenden Replikationsgabeln und DSB (Gupta *et al.*, 2018). In ausgewählten unbehandelten Zelllinien (G130, G140 und G142) dieser Arbeit, welche eine starke basale MMR-Proteinexpression (s. Abb. 10) aufwiesen, ließ sich ebenfalls eine starke Expression von DDR- und Replikationsstressproteinen (s. Abb. 12) nachweisen. Somit ist zu mutmaßen, ob in diesen Zelllinien ein erhöhter basaler Stress bspw. durch ROS vorlag. ROS können unter anderem zur Bildung von 8-Oxoguanin führen, welches mit Thymin eine Fehlpaarung eingehen kann und somit durch die MMR erkannt wird. Diese gesteigerte MMR-Aktivität könnte wiederum im Einklang mit den Ergebnissen von Gupta *et al.* zu einer vermehrten Induktion von Replikationsstress führen (Gupta *et al.*, 2018). Die im Vergleich zu den anderen Zelllinien (Cas1, BS153vIII- und DKMGvIII-) gesteigerte MMR-Proteinexpression sowie die verstärkte Expression der DDR- und Replikationsstressproteine spiegelten sich jedoch nicht in einem sensitiveren Ansprechen auf TMZ wieder.

Es stellt sich nun die Frage ob eine Inhibition von ATR, RPA oder Chk1 auch in dem hier betrachteten Zellmodell zu einer TMZ-Sensitivierung beitragen würde. Besonders p53-defiziente Zelllinien sind auf einen Chk1 vermittelten Zellzyklusarrest angewiesen (Chen *et al.*, 2006a). Für ca. 30 % der primären GBMs liegt eine Mutation des *TP53*-Gen vor (Ohgaki und Kleihues, 2007). Somit wäre auch in einigen Zelllinien in diesem Zellmodell nach Inhibition von Chk1 mit einem gesteigerten Effekt von TMZ zu rechnen. Die Wirksamkeit von Chk1-Inhibitoren in Kombinationstherapie mit einem Chemotherapeutikum konnte bereits in Neuroblastomzellen gezeigt werden (Cole *et al.*, 2011). Des Weiteren wurde dieser Therapieansatz unter anderem in p53-defizienten Zelllinien verschiedener Tumorentitäten erfolgreich erprobt (Chen *et al.*, 2006b). Somit stellt die Chk1-Inhibition ebenfalls eine vielversprechende Therapieoption in der Kombinationstherapie mit TMZ in p53-defizienten humanen GBMs dar.

## 5.5 Ausblick

Die kombinierte Radiochemotherapie mit TMZ stellt seit Stupp *et al.* aufgrund mangelnder Alternativen unverändert den Goldstandard in der Primärtherapie des GBM dar (Stupp *et al.*, 2005). Trotz der Identifikation von MGMT als prognostischer Marker für ein verbessertes Therapieansprechen (Hegi *et al.*, 2005), ist das Überleben von Patienten mit MGMT-negativen Tumoren großen Schwankungen unterworfen. Klinische Daten zeigen ein Überleben in MGMT-negativen Tumoren unter Standardtherapie von ca. 13 bis 20 Monaten (Dunn *et al.*, 2009). Dies verdeutlicht, dass es weiterhin unbedingt erforderlich ist zusätzliche Biomarker zu identifizieren, die das Ansprechen auf die Therapie präziser vorhersagen und darüber hinaus eine Einschätzung etwaiger Alternativtherapien ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde analysiert, ob sich die MMR-Proteinexpression sowie die Expression von DDR- und Replikationsstress-Proteinen in MGMT-negativen GBM-Zelllinien als Biomarker für das Ansprechen auf TMZ eignen. Trotz des fehlenden statistischen Zusammenhangs der MMR-Proteinexpression und der Expression von DDR- und Replikationsstressproteinen in Bezug auf die TMZ-Sensitivität, konnten interessante Zusammenhänge und therapierelevante Tendenzen in dem verwendeten heterogenen Zellmodell beobachtet werden.

Das heterogene Zellmodell repräsentierte hierbei treffend die Diversität des GBM im klinischen Alltag. Es wurde deutlich, dass neben der MMR und dem Replikationsstress eine Vielzahl von Einflussfaktoren wie die Proliferation, die Zellzyklusregulation, Mutationen sowie die DNA-Reparatur die TMZ-Sensitivität beeinflussen können und somit mutmaßlich auch im klinischen Alltag über das Therapieansprechen entscheiden. Daher ist es von essentieller Bedeutung die Erkrankung auf molekularer Ebene zu verstehen um therapierelevante Subgruppen erstellen zu können. Nur auf diese Weise kann es gelingen jedem Patienten die nötige Therapie individualisiert zukommen zu lassen. Um dieses Vorhaben zu realisieren, gilt es weitere Biomarker zu identifizieren mit dem Ziel das Ansprechen auf die aktuelle, in den Leitlinien dargestellte Standard-Radiochemotherapie besser prognostizieren zu können. Darüber hinaus ist die Erprobung von neuen multimodalen Therapiekonzepten in klinischen Studien eine weitere wichtige Aufgabe.



### III. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
2-HG	2-Hydroxy-Glutarat
5-ALA	5-Aminolävulinsäure
53BP1	p53-bindendes Protein
Abb.	Abbildung
ACNU	Nimustin
Akt	Proteinkinase B
Alt-NHEJ	<i>alternative non homologous endjoining</i>
APNG	Alkylpurin-DNA-N-Glykosylase
ATM	<i>ataxia teleangiectasia mutated</i>
ATR	<i>ATM- and Rad3-related</i>
ATR-X	<i>transcriptional regulator ATRX</i>
BCNU	Bis-Chlorethyl-Nitroso-Urea (Carmustin)
BER	Basenexzisionsreparatur
BRCA1	<i>breast cancer early onset 1</i>
BRCA2	<i>breast cancer early onset 2</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCNU	Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitroso-Urea (Lomustin)
CDC25A/C	<i>cell division cycle Phosphatase 25A/C</i>
CDK1/2	<i>cyclind dependent kinase 1/2</i>
CH <sub>3</sub>	Methylgruppe
Chk1	<i>checkpoint kinase 1</i>

Chk2	<i>checkpoint kinase 2</i>
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
D-Loop	Verdrängungsschleife
d.h.	das heißt
DDR	DNA <i>damage response</i> (DNA-Schadensantwort)
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonuclein acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNA-PKcs	DNA-abhängige Proteinkinase ( <i>cs, catalytic subunit</i> )
DSB	<i>double strand break</i> (Doppelstrangbruch)
DXM	Dexamethason
EANO	<i>european association of neuro-oncology</i>
ED50	Effektivdosis 50 %
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGFRvIII	Deletionsmutante des EGFR (Variante III)
<i>et al.</i>	und andere
EXO1	Exonuclease I
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FKS	fötales Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i>
G1	<i>gap 1</i> (1.Lücke) des Zellzyklus
G2	<i>gap 2</i> (2.Lücke) des Zellzyklus
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GBM	Glioblastom
GGR	<i>global genome repair</i>
Gy	Gray
h	Stunde
H2AX	Histon 2A
H <sub>2</sub> O	Wasser
H3-K27M	Mutationsvariante des Histon 3
HCL	Salzsäure
HNPCC	Hereditäres nicht-Polyposis assoziiertes kolorektales Karzinom
HR	<i>homologues recombination</i> (Homologe Reparatur)
ICD	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
IDH 1/2	Isocitrat-Dehydrogenase 1/2
IDL	Insertion- bzw. Deletionsloop
IHC	Immunhistochemie
IR	<i>irradiation</i> (Bestrahlung)
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kHz	Kilohertz
Ku70/80	XRCC6 und XRCC5 Heterodimerkomplex der DSB-DNA-Reparatur
LD10	letale Dosis 10 %
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
M	Molar
Max	Maximum
mg/m <sup>2</sup>	Milligramm pro Quadratmeter
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MGMT	O <sup>6</sup> -mehtylguanin-DNA-Methyltransferase

min	Minute
ml	Milliliter
MLH1	DNA <i>mismatch repair protein</i> MLH1
MMR	<i>mismatch repair</i>
MRE11	<i>meiotic recombination 11</i>
MRN	Mre11, Rad50 und NBS1 -Komplex
MRT	Magnetresonanztomographie
MSH2	DNA <i>mismatch repair protein</i> MSH2
MSH3	DNA <i>mismatch repair protein</i> MSH3
MSH6	DNA <i>mismatch repair protein</i> MSH6
MSP	<i>methylation-specific</i> PCR
MTIC	Monomethyl-triazenoimidazol-carboxamid
<i>mut</i>	mutiert
MutL $\alpha$	Heterodimerkomplex der MMR bestehend aus MLH1 und PMS2
MutS $\alpha$	Heterodimerkomplex der MMR bestehend aus MSH2 und MSH6
MutS $\beta$	Heterodimerkomplex der MMR bestehend aus MSH2 und MSH3
N <sup>3</sup> -meA	N <sup>3</sup> -methyl-Adenin
N <sup>7</sup> -meG	N <sup>7</sup> -methyl-Guanin
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	<i>non-homologous endjoining</i> (nicht-homologe Endverknüpfung)
nM	Nanomolar
NOS	<i>not otherwise specified</i>
O <sup>6</sup> -meG	O <sup>6</sup> -methyl-Guanin
OAS	<i>overall survival</i>

p21	CDK-Inhibitor 1
p53	Tumorsuppressorprotein 53 kDa
PARP1	Poly-(ADP-ribose) -Polymerase 1
PBS	<i>phosphat buffered salin</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PCV	Therapieschema: Procarbazin + CCNU + Vincristin
PFS	<i>progression-free survival</i> (Progresionsfreies Überleben)
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIKK	<i>PI3K like kinases</i>
PMS2	<i>mismatch repair endonuclease</i> PMS2
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
qMSP	<i>quantitative methylation-specific PCR</i>
Rad51	DNA-Reparaturprotein der Familie RAD51
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease A
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
RPA	<i>replication protein A</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Insitute</i>
s	Sekunde
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
s.	siehe
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i> (Sodiumdodecylsulfat)
SEM	<i>standard error of the mean</i>
ser	Serin

SF20	<i>survival fraction</i> bei 20 $\mu$ M TMZ
siCyclo	Kontroll siRNA mit Cyclophosphil B
siMSH6	spezifische siRNA für das MMR-Protein MSH6
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SSA	<i>single-strand annealing</i> (Einzelstrangverknüpfung)
SSB	<i>single strand break</i> (Einzelstrangbruch)
SSC	<i>sideward scatter</i>
ssDNA	<i>single stranded DNA</i>
Tab.	Tabelle
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBS-T	<i>tris buffered saline</i> mit Tween <sup>®</sup> 20
TG	Tris-Glycin
TGR	<i>transcription-coupled repair</i>
thr	Threonin
TMZ	Temozolomid
TP53	Tumorsuppressor-Gen von p53
TTF	<i>tumor-treating field</i>
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UV	Ultraviolette Strahlung
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
yH2AX	Phosphoryliertes Histon 2A
z.B.	zum Beispiel
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar
$^{\circ}$ C	Grad Celsius

## 6. Literaturverzeichnis

### 6.1 Literaturquellen

- Adlard, J.W., 2000. Thalidomide in the treatment of cancer: *Anti-Cancer Drugs* 11, 787–791.
- Agarwal, M.L., Agarwal, A., Taylor, W.R., Stark, G.R., 1995. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 8493–8497.
- Agnihotri, S., Gajadhar, A.S., Ternamian, C., Gorlia, T., Diefes, K.L., Mischel, P.S., Kelly, J., McGown, G., Thorncroft, M., Carlson, B.L., Sarkaria, J.N., Margison, G.P., Aldape, K., Hawkins, C., Hegi, M., Guha, A., 2012. Alkylpurine–DNA–N-glycosylase confers resistance to temozolomide in xenograft models of glioblastoma multiforme and is associated with poor survival in patients. *Journal of Clinical Investigation* 122, 253–266.
- Alentorn, A., Hoang-Xuan, K., Mikkelsen, T., 2016. Presenting signs and symptoms in brain tumors, in: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier, pp. 19–26.
- Athanassiou, H., Synodinou, M., Maragoudakis, E., Paraskevaidis, M., Verigos, C., Misailidou, D., Antonadou, D., Saris, G., Beroukas, K., Karageorgis, P., 2005. Randomized Phase II Study of Temozolomide and Radiotherapy Compared With Radiotherapy Alone in Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme. *Journal of Clinical Oncology* 23, 2372–2377.
- Batash, R., Asna, N., Schaffer, P., Francis, N., Schaffer, M., 2017. Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review. *Current Medicinal Chemistry* 24.
- Bianco, J.N., Poli, J., Saksouk, J., Bacal, J., Silva, M.J., Yoshida, K., Lin, Y.-L., Tourrière, H., Lengronne, A., Pasero, P., 2012. Analysis of DNA replication profiles in budding yeast and mammalian cells using DNA combing. *Methods* 57, 149–157.
- Blackford, A.N., Jackson, S.P., 2017. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Molecular Cell* 66, 801–817.
- Bolderson, E., Richard, D.J., Zhou, B.-B.S., Khanna, K.K., 2009. Recent Advances in Cancer Therapy Targeting Proteins Involved in DNA Double-Strand Break Repair. *Clinical Cancer Research* 15, 6314–6320.
- Bondy, M.L., Scheurer, M.E., Malmer, B., Barnholtz-Sloan, J.S., Davis, F.G., Il'yasova, D., Kruchko, C., McCarthy, B.J., Rajaraman, P., Schwartzbaum, J.A., Sadetzki, S., Schlehofer, B., Tihan, T., Wiemels, J.L., Wrensch, M., Buffler, P.A., On behalf of the Brain Tumor Epidemiology Consortium, 2008. Brain tumor epidemiology: Consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer* 113, 1953–1968.
- Brandes, A.A., Tosoni, A., Franceschi, E., Reni, M., Gatta, G., Vecht, C., 2008. Glioblastoma in adults. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 67, 139–152.
- Branzei, D., Foiani, M., 2009. The checkpoint response to replication stress. *DNA Repair* 8, 1038–1046.
- Cahill, D.P., Levine, K.K., Betensky, R.A., Codd, P.J., Romany, C.A., Reavie, L.B., Batchelor, T.T., Futreal, P.A., Stratton, M.R., Curry, W.T., Iafate, A.J., Louis, D.N., 2007. Loss of the Mismatch Repair Protein MSH6 in Human Glioblastomas Is Associated with Tumor Progression during Temozolomide Treatment. *Clinical Cancer Research* 13, 2038–2045.
- Cairncross, G., Wang, M., Shaw, E., Jenkins, R., Brachman, D., Buckner, J., Fink, K., Souhami, L., Laperriere, N., Curran, W., Mehta, M., 2013. Phase III Trial of Chemoradiotherapy for Anaplastic Oligodendroglioma: Long-Term Results of RTOG 9402. *Journal of Clinical Oncology* 31, 337–343.

- Chen, Z., Xiao, Z., Gu, W., Xue, J., Bui, M.H., Kovar, P., Li, G., Wang, G., Tao, Z.-F., Tong, Y., Lin, N.-H., Sham, H.L., Wang, J.Y.J., Sowin, T.J., Rosenberg, S.H., Zhang, H., 2006a. Selective Chk1 inhibitors differentially sensitize p53-deficient cancer cells to cancer therapeutics. *International Journal of Cancer* 119, 2784–2794.
- Chen, Z., Xiao, Z., Gu, W., Xue, J., Bui, M.H., Kovar, P., Li, G., Wang, G., Tao, Z.-F., Tong, Y., Lin, N.-H., Sham, H.L., Wang, J.Y.J., Sowin, T.J., Rosenberg, S.H., Zhang, H., 2006b. Selective Chk1 inhibitors differentially sensitize p53-deficient cancer cells to cancer therapeutics. *International Journal of Cancer* 119, 2784–2794.
- Chinot, O.L., Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., Carpentier, A.F., Hoang-Xuan, K., Kavan, P., Cernea, D., Brandes, A.A., Hilton, M., Abrey, L., Cloughesy, T., 2014. Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *New England Journal of Medicine* 370, 709–722.
- Cimprich, K.A., Cortez, D., 2008. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 616–627.
- Cole, K.A., Huggins, J., Laquaglia, M., Hulderman, C.E., Russell, M.R., Bosse, K., Diskin, S.J., Attiyeh, E.F., Sennett, R., Norris, G., Laudenslager, M., Wood, A.C., Mayes, P.A., Jagannathan, J., Winter, C., Mosse, Y.P., Maris, J.M., 2011. RNAi screen of the protein kinome identifies checkpoint kinase 1 (CHK1) as a therapeutic target in neuroblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 3336–3341.
- Cottarel, J., Frit, P., Bombarde, O., Salles, B., Négrel, A., Bernard, S., Jeggo, P.A., Lieber, M.R., Modesti, M., Calsou, P., 2013. A noncatalytic function of the ligation complex during nonhomologous end joining. *The Journal of Cell Biology* 200, 173–186.
- D’Atri, S., Tentori, L., Lacal, P.M., Graziani, G., Pagani, E., Benincasa, E., Zambruno, G., Bonmassar, E., Jiricny, J., 1998. Involvement of the Mismatch Repair System in Temozolomide-Induced Apoptosis. *Molecular Pharmacology* 54, 334–341.
- Denny, B.J., Wheelhouse, R.T., Stevens, M.F.G., Tsang, L.L.H., Slack, J.A., 1994. NMR and Molecular Modeling Investigation of the Mechanism of Activation of the Antitumor Drug Temozolomide and Its Interaction with DNA. *Biochemistry* 33, 9045–9051.
- Dunn, J., Baborie, A., Alam, F., Joyce, K., Moxham, M., Sibson, R., Crooks, D., Husband, D., Shenoy, A., Brodbelt, A., Wong, H., Liloglou, T., Haylock, B., Walker, C., 2009. Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy. *British Journal of Cancer* 101, 124–131.
- Ensminger, M., Iloff, L., Ebel, C., Nikolova, T., Kaina, B., Löbrich, M., 2014. DNA breaks and chromosomal aberrations arise when replication meets base excision repair. *The Journal of Cell Biology* 206, 29–43.
- Esteller, M., Goodman, S.N., Herman, J.G., 2000. Inactivation of the DNA-Repair Gene MGMT and the Clinical Response of Gliomas to Alkylating Agents. *The New England Journal of Medicine* 5.
- Felsberg, J., Thon, N., Eigenbrod, S., Hentschel, B., Sabel, M.C., Westphal, M., Schackert, G., Kreth, F.W., Pietsch, T., Löffler, M., Weller, M., Reifenberger, G., Tonn, J.C., for the German Glioma Network, 2011. Promoter methylation and expression of MGMT and the DNA mismatch repair genes MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 in paired primary and recurrent glioblastomas. *International Journal of Cancer* 129, 659–670.
- Feng, J., Liang, J., Li, J., Li, Y., Liang, H., Zhao, X., McNutt, M.A., Yin, Y., 2015. PTEN Controls the DNA Replication Process through MCM2 in Response to Replicative Stress. *Cell Reports* 13, 1295–1303.
- Forst, D.A., Nahed, B.V., Loeffler, J.S., Batchelor, T.T., 2014. Low-Grade Gliomas. *The Oncologist* 19, 403–413.
- Friedman, H.S., McLendon, R.E., Kerby, T., Dugan, M., Bigner, S.H., Henry, A.J., Ashley, D.M., Krischer, J., Lovell, S., Rasheed, K., Marchev, F., Seman, A.J., Cokgor, I., Rich, J., Stewart, E., Colvin, O.M., Provenzale, J.M., Bigner, D.D., Haglund, M.M.,



- Friedman, A.H., Modrich, P.L., 1998. DNA mismatch repair and O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma. *Journal of Clinical Oncology* 16, 3851–3857.
- Frosina, G., 2011. Frontiers in targeting glioma stem cells. *European Journal of Cancer* 47, 496–507.
- Fulton, B., Short, S.C., James, A., Nowicki, S., McBain, C., Jefferies, S., Kelly, C., Stobo, J., Morris, A., Williamson, A., Chalmers, A.J., 2018. PARADIGM-2: Two parallel phase I studies of olaparib and radiotherapy or olaparib and radiotherapy plus temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma, with treatment stratified by MGMT status. *Clinical and Translational Radiation Oncology* 8, 12–16.
- Gaillard, H., García-Muse, T., Aguilera, A., 2015. Replication stress and cancer. *Nature Reviews Cancer* 15, 276–289.
- Gilbert, M.R., Dignam, J.J., Armstrong, T.S., Wefel, J.S., Blumenthal, D.T., Vogelbaum, M.A., Colman, H., Chakravarti, A., Pugh, S., Won, M., Jeraj, R., Brown, P.D., Jaeckle, K.A., Schiff, D., Stieber, V.W., Brachman, D.G., Werner-Wasik, M., Tremont-Lukats, I.W., Sulman, E.P., Aldape, K.D., Curran, W.J., Mehta, M.P., 2014. A Randomized Trial of Bevacizumab for Newly Diagnosed Glioblastoma. *New England Journal of Medicine* 370, 699–708.
- Gilbert, M.R., Wang, M., Aldape, K.D., Stupp, R., Hegi, M.E., Jaeckle, K.A., Armstrong, T.S., Wefel, J.S., Won, M., Blumenthal, D.T., Mahajan, A., Schultz, C.J., Erridge, S., Baumert, B., Hopkins, K.I., Tzuk-Shina, T., Brown, P.D., Chakravarti, A., Curran, W.J., Mehta, M.P., 2013. Dose-Dense Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma: A Randomized Phase III Clinical Trial. *Journal of Clinical Oncology* 31, 4085–4091.
- Glantz, M.J., Cole, B.F., Forsyth, P.A., Recht, L.D., Wen, P.Y., Chamberlain, M.C., Grossman, S.A., Cairncross, J.G., 2000. Practice parameter: Anticonvulsant prophylaxis in patients with newly diagnosed brain tumors: Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 54, 1886–1893.
- Gupta, D., Lin, B., Cowan, A., Heinen, C.D., 2018. ATR-Chk1 activation mitigates replication stress caused by mismatch repair-dependent processing of DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, 1523–1528.
- Hakyemez, B., Erdogan, C., Ercan, I., Ergin, N., Uysal, S., Atahan, S., 2005. High-grade and low-grade gliomas: differentiation by using perfusion MR imaging. *Clinical Radiology* 60, 493–502.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.
- Happold, C., Roth, P., Wick, W., Schmidt, N., Florea, A.-M., Silginer, M., Reifenberger, G., Weller, M., 2012. Distinct molecular mechanisms of acquired resistance to temozolomide in glioblastoma cells: Acquired temozolomide resistance in glioblastoma. *Journal of Neurochemistry* 122, 444–455.
- Hartlerode, A.J., Scully, R., 2009. Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochemical Journal* 423, 157–168.
- He, J., Kang, X., Yin, Y., Chao, K.S.C., Shen, W.H., 2015. PTEN regulates DNA replication progression and stalled fork recovery. *Nature Communications* 6, 7620.
- Hegi, M.E., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Kros, J.M., Mariani, L., Mirimanoff, R.O., Stupp, R., 2005. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *The New England Journal of Medicine* 7.
- Hegi, M.E., Liu, L., Herman, J.G., Stupp, R., Wick, W., Weller, M., Mehta, M.P., Gilbert, M.R., 2008. Correlation of O<sup>6</sup>-Methylguanine Methyltransferase (MGMT) Promoter

- Methylation With Clinical Outcomes in Glioblastoma and Clinical Strategies to Modulate MGMT Activity. *Journal of Clinical Oncology* 26, 4189–4199.
- Hermisson, M., Klumpp, A., Wick, W., Wischhusen, J., Nagel, G., Roos, W., Kaina, B., Weller, M., 2006. O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. *Journal of Neurochemistry* 96, 766–776.
- Herrlinger, U., Schäfer, N., Steinbach, J.P., Weyerbrock, A., Hau, P., Goldbrunner, R., Friedrich, F., Rohde, V., Ringel, F., Schlegel, U., Sabel, M., Ronellenfötsch, M.W., Uhl, M., Maciaczyk, J., Grau, S., Schnell, O., Hänel, M., Krex, D., Vajkoczy, P., Gerlach, R., Kortmann, R.-D., Mehdorn, M., Tüttenberg, J., Mayer-Steinacker, R., Fietkau, R., Brehmer, S., Mack, F., Stuplich, M., Kebir, S., Kohnen, R., Dunkl, E., Leutgeb, B., Proescholdt, M., Pietsch, T., Urbach, H., Belka, C., Stummer, W., Glas, M., 2016. Bevacizumab Plus Irinotecan Versus Temozolomide in Newly Diagnosed O<sup>6</sup>-Methylguanine–DNA Methyltransferase Nonmethylated Glioblastoma: The Randomized GLARIUS Trial. *Journal of Clinical Oncology* 34, 1611–1619.
- Herrlinger, U., Tzaridis, T., Mack, F., Steinbach, J.P., Schlegel, U., Sabel, M., Hau, P., Kortmann, R.-D., Krex, D., Grauer, O., Goldbrunner, R., Schnell, O., Bähr, O., Uhl, M., Seidel, C., Tabatabai, G., Kowalski, T., Ringel, F., Schmidt-Graf, F., Suchorska, B., Brehmer, S., Weyerbrock, A., Renovanz, M., Bullinger, L., Galldiks, N., Vajkoczy, P., Misch, M., Vatter, H., Stuplich, M., Schäfer, N., Kebir, S., Weller, J., Schaub, C., Stummer, W., Tonn, J.-C., Simon, M., Keil, V.C., Nelles, M., Urbach, H., Coenen, M., Wick, W., Weller, M., Fimmers, R., Schmid, M., Hattingen, E., Pietsch, T., Koch, C., Glas, M., 2019. Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA–09): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet* 393, 678–688.
- Hess, C.F., Schaaf, J.C., Kortmann, R.D., Schabet, M., Bamberg, M., 1994. Malignant glioma: patterns of failure following individually tailored limited volume irradiation. *Radiotherapy and Oncology* 30, 146–149.
- Heyer, W.-D., Ehmsen, K.T., Liu, J., 2010. Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes. *Annual Review of Genetics* 44, 113–139.
- Hirose, Y., Berger, M.S., Pieper, R.O., 2001a. p53 Effects Both the Duration of G<sub>2</sub>/M Arrest and the Fate of Temozolomide-treated Human Glioblastoma Cells. *Cancer Res* 61, 1957.
- Hirose, Y., Berger, M.S., Pieper, R.O., 2001b. Abrogation of the Chk1-mediated G<sub>2</sub> Checkpoint Pathway Potentiates Temozolomide-induced Toxicity in a p53-independent Manner in Human Glioblastoma Cells. *Cancer Res* 61, 5843.
- Hosoya, N., Miyagawa, K., 2014. Targeting DNA damage response in cancer therapy. *Cancer Science* 105, 370–388.
- Hsieh, P., 2001. Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. *Mutation Research/DNA Repair* 486, 71–87.
- Jenkins, R.B., Blair, H., Ballman, K.V., Giannini, C., Arusell, R.M., Law, M., Flynn, H., Passe, S., Felten, S., Brown, P.D., Shaw, E.G., Buckner, J.C., 2006. A t(1;19)(q10;p10) Mediates the Combined Deletions of 1p and 19q and Predicts a Better Prognosis of Patients with Oligodendroglioma. *Cancer Research* 66, 9852–9861.
- Jiricny, J., 2006. The multifaceted mismatch-repair system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7, 335–346.
- Karran, P., 2001. Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs. *Carcinogenesis* 22, 1931–1937.
- Kastan, M.B., Bartek, J., 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer 432, 8.

- Kaufman, B., Shapira-Frommer, R., Schmutzler, R.K., Audeh, M.W., Friedlander, M., Balmaña, J., Mitchell, G., Fried, G., Stemmer, S.M., Hubert, A., Rosengarten, O., Steiner, M., Loman, N., Bowen, K., Fielding, A., Domchek, S.M., 2015. Olaparib Monotherapy in Patients With Advanced Cancer and a Germline *BRCA1/2* Mutation. *Journal of Clinical Oncology* 33, 244–250.
- Khuong-Quang, D.-A., Buczkowicz, P., Rakopoulos, P., Liu, X.-Y., Fontebasso, A.M., Bouffet, E., Bartels, U., Albrecht, S., Schwartzentruber, J., Letourneau, L., Bourgey, M., Bourque, G., Montpetit, A., Bourret, G., Lepage, P., Fleming, A., Lichter, P., Kool, M., von Deimling, A., Sturm, D., Korshunov, A., Faury, D., Jones, D.T., Majewski, J., Pfister, S.M., Jabado, N., Hawkins, C., 2012. K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathologica* 124, 439–447.
- Kitange, G.J., Carlson, B.L., Schroeder, M.A., Grogan, P.T., Lamont, J.D., Decker, P.A., Wu, W., James, C.D., Sarkaria, J.N., 2009. Induction of MGMT expression is associated with temozolomide resistance in glioblastoma xenografts. *Neuro-Oncology* 11, 281–291.
- Kitao, H., Iimori, M., Kataoka, Y., Wakasa, T., Tokunaga, E., Saeki, H., Oki, E., Maehara, Y., 2018. DNA replication stress and cancer chemotherapy. *Cancer Science* 109, 264–271.
- Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M., Hocesvar, B.A., 2010. Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. *Toxicologic Pathology* 38, 96–109.
- Kostron, H., Rössler, K., 2006. Neurochirurgische Therapie maligner Gliome. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 156, 338–341.
- Koul, D., 2008. PTEN Signaling pathways in glioblastoma. *Cancer Biology & Therapy* 7, 1321–1325.
- Krokan, H.E., Bjoras, M., 2013. Base Excision Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5, a012583–a012583.
- Krokan, H.E., Nilsen, H., Skorpen, F., Otterlei, M., Slupphaug, G., 2000. Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Letters* 476, 73–77.
- Kunkel, T.A., Erie, D.A., 2005. DNA MISMATCH REPAIR. *Annual Review of Biochemistry* 74, 681–710.
- Laura Annovazzi, Marta Mellai, Davide Schiffer, 2017. Chemotherapeutic Drugs: DNA Damage and Repair in Glioblastoma. *Cancers* 9, 57.
- Leibeling, D., Laspe, P., Emmert, S., 2006. Nucleotide excision repair and cancer. *Journal of Molecular Histology* 37, 225–238.
- Li, J., 1997. PTEN, a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer. *Science* 275, 1943–1947.
- Li, Y.M., Suki, D., Hess, K., Sawaya, R., 2016. The influence of maximum safe resection of glioblastoma on survival in 1229 patients: Can we do better than gross-total resection? *Journal of Neurosurgery* 977–988.
- Li, Z., Pearlman, A.H., Hsieh, P., 2016. DNA mismatch repair and the DNA damage response. *DNA Repair* 38, 94–101.
- Liu, D., Keijzers, G., Rasmussen, L.J., 2017. DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 773, 174–187.
- Liu, Y., Fang, Y., Shao, H., Lindsey-Boltz, L., Sancar, A., Modrich, P., 2010. Interactions of Human Mismatch Repair Proteins MutSa and MutLa with Proteins of the ATR-Chk1 Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 285, 5974–5982.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B.W., Kleihues, P., 2007. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica* 114, 97–109.

- Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., Ellison, D.W., 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica* 131, 803–820.
- Louvel, G., Metellus, P., Noel, G., Peeters, S., Guyotat, J., Duntze, J., Le Reste, P.-J., Dam Hieu, P., Faillot, T., Litre, F., Desse, N., Petit, A., Emery, E., Voirin, J., Peltier, J., Caire, F., Vignes, J.-R., Barat, J.-L., Langlois, O., Menei, P., Dumont, S.N., Zanello, M., Dezamis, E., Dhermain, F., Pallud, J., 2016. Delaying standard combined chemoradiotherapy after surgical resection does not impact survival in newly diagnosed glioblastoma patients. *Radiotherapy and Oncology* 118, 9–15.
- Luciani, M.G., 2004. Characterization of a novel ATR-dependent, Chk1-independent, intra-S-phase checkpoint that suppresses initiation of replication in *Xenopus*. *Journal of Cell Science* 117, 6019–6030.
- Malmström, A., Grønberg, B.H., Marosi, C., Stupp, R., Frappaz, D., Schultz, H., Abacioglu, U., Tavelin, B., Lhermitte, B., Hegi, M.E., Rosell, J., Henriksson, R., 2012. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 13, 916–926.
- Marras, L.C., Geerts, W.H., Perry, J.R., 2000. The risk of venous thromboembolism is increased throughout the course of malignant glioma: An evidence-based review. *Cancer* 89, 640–646.
- McEllin, B., Camacho, C.V., Mukherjee, B., Hahm, B., Tomimatsu, N., Bachoo, R.M., Burma, S., 2010. PTEN Loss Compromises Homologous Recombination Repair in Astrocytes: Implications for Glioblastoma Therapy with Temozolomide or Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors. *Cancer Research* 70, 5457–5464.
- McFaline-Figueroa, J.L., Braun, C.J., Stanciu, M., Nagel, Z.D., Mazzucato, P., Sangaraju, D., Cerniauskas, E., Barford, K., Vargas, A., Chen, Y., Tretyakova, N., Lees, J.A., Hemann, M.T., White, F.M., Samson, L.D., 2015. Minor Changes in Expression of the Mismatch Repair Protein MSH2 Exert a Major Impact on Glioblastoma Response to Temozolomide. *Cancer Research* 75, 3127–3138.
- Newlands, E.S., Stevens, M.F.G., Wedge, S.R., Wheelhouse, R.T., Brock, C., 1997. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treatment Reviews* 23, 35–61.
- Nobusawa, S., Watanabe, T., Kleihues, P., Ohgaki, H., 2009. IDH1 Mutations as Molecular Signature and Predictive Factor of Secondary Glioblastomas. *Clinical Cancer Research* 15, 6002–6007.
- Ohgaki, H., Kleihues, P., 2013. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clinical Cancer Research* 19, 764–772.
- Ohgaki, H., Kleihues, P., 2007. Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *Am J Pathol* 170, 1445–1453.
- Ohgaki, H., Kleihues, P., 2005a. Population-Based Studies on Incidence, Survival Rates, and Genetic Alterations in Astrocytic and Oligodendroglial Gliomas. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 64, 479–489.
- Ohgaki, H., Kleihues, P., 2005b. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathologica* 109, 93–108.
- Ohnishi, T., Mori, E., Takahashi, A., 2009. DNA double-strand breaks: Their production, recognition, and repair in eukaryotes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 669, 8–12.
- Omuro, A., 2013. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas: A Clinical Review. *JAMA* 310, 1842.

- Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C.-H., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.-M., Gallia, G.L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B.A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D.A., Tekleab, H., Jr, L.A.D., Hartigan, J., Smith, D.R., Strausberg, R.L., Marie, S.K.N., Shinjo, S.M.O., Yan, H., Riggins, G.J., Bigner, D.D., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V.E., Kinzler, K.W., 2008. An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme 321, 7.
- Patel, M., McCully, C., Godwin, K., Balis, F.M., 2003. Plasma and Cerebrospinal Fluid Pharmacokinetics of Intravenous Temozolomide in Non-human Primates. *Journal of Neuro-Oncology* 61, 203–207.
- Pegg, A.E., 2000. Repair of O6-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 462, 83–100.
- Peña-Díaz, J., Jiricny, J., 2012. Mammalian mismatch repair: error-free or error-prone? *Trends in Biochemical Sciences* 37, 206–214.
- Portnow, J., Badie, B., Chen, M., Liu, A., Blanchard, S., Synold, T.W., 2009. The Neuropharmacokinetics of Temozolomide in Patients with Resectable Brain Tumors: Potential Implications for the Current Approach to Chemoradiation. *Clinical Cancer Research* 15, 7092–7098.
- Quiros, S., Roos, W.P., Kaina, B., 2011. Rad51 and BRCA2 - New Molecular Targets for Sensitizing Glioma Cells to Alkylating Anticancer Drugs. *PLoS ONE* 6, e27183.
- Quiros, S., Roos, W.P., Kaina, B., 2010. Processing of O<sup>6</sup>-methylguanine into DNA double-strand breaks requires two rounds of replication whereas apoptosis is also induced in subsequent cell cycles. *Cell Cycle* 9, 168–178.
- Reardon, D.A., Omuro, A., Brandes, A.A., Rieger, J., Wick, A., Sepulveda, J., Phuphanich, S., de Souza, P., Ahluwalia, M.S., Lim, M., Vlahovic, G., Sampson, J., 2017. OS10.3 Randomized Phase 3 Study Evaluating the Efficacy and Safety of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: CheckMate 143. *Neuro-Oncology* 19, iii21–iii21.
- Reifenberger, G., Wirsching, H.-G., Knobbe-Thomsen, C.B., Weller, M., 2016. Advances in the molecular genetics of gliomas — implications for classification and therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* 14, 434–452.
- Roos, W., Baumgartner, M., Kaina, B., 2004. Apoptosis triggered by DNA damage O6-methylguanine in human lymphocytes requires DNA replication and is mediated by p53 and Fas/CD95/Apo-1. *Oncogene* 23, 359–367.
- Roos, W.P., Batista, L.F.Z., Naumann, S.C., Wick, W., Weller, M., Menck, C.F.M., Kaina, B., 2007. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene* 26, 186–197.
- Roos, W.P., Kaina, B., 2013. DNA damage-induced cell death: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Letters* 332, 237–248.
- Rye, P.T., Delaney, J.C., Netirojjanakul, C., Sun, D.X., Liu, J.Z., Essigmann, J.M., 2008. Mismatch repair proteins collaborate with methyltransferases in the repair of O6-methylguanine. *DNA Repair* 7, 170–176.
- Sanai, N., Berger, M.S., 2008. GLIOMA EXTENT OF RESECTION AND ITS IMPACT ON PATIENT OUTCOME. *Neurosurgery* 62, 753–766.
- Schackert, G., Kirsch, M., Knobbe, C.B., Reifenberger, G., Engenhardt-Cabillic, R., Schlegel, U., 2006. Niedriggradige Gliome. *Der Onkologe* 12, 518–532.
- Scharer, O.D., 2013. Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5, a012609–a012609.
- Schärer, O.D., 2003. Chemie und Biologie der DNA-Reparatur. *Angewandte Chemie* 115, 3052–3082.

- Sedelnikova, O.A., Pilch, D.R., Redon, C., Bonner, W.M., 2003. Histone H2AX in DNA Damage and Repair 233–235.
- Sedelnikova, O.A., Rogakou, E.P., Panyutin, I.G., Bonner, W.M., 2002. Quantitative Detection of <sup>125</sup>IdU-Induced DNA Double-Strand Breaks with  $\gamma$ -H2AX Antibody. *Radiation Research* 158, 486–492.
- Shibata, A., Jeggo, P.A., 2014. DNA Double-strand Break Repair in a Cellular Context. *Clinical Oncology* 26, 243–249.
- Shinsato, Y., Furukawa, T., Yunoue, S., Yonezawa, H., Minami, K., Nishizawa, Y., Ikeda, R., Kawahara, K., Yamamoto, M., Hirano, H., Tokimura, H., Arita, K., 2013. Reduction of MLH1 and PMS2 confers temozolomide resistance and is associated with recurrence of glioblastoma. *Oncotarget* 4.
- Sinha, R.P., Häder, D.-P., 2002. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical & Photobiological Sciences* 1, 225–236.
- Spivak, G., 2015. Nucleotide excision repair in humans. *DNA Repair* 36, 13–18.
- Stojic, L., Brun, R., Jiricny, J., 2004. Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair* 3, 1091–1101.
- Struve, N., 2015. Bedeutung der EGFRvIII-Expression für die Radio- und Chemosensitivität von humanen Glioblastomzellen. Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg, Hamburg.
- Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O.D., Zanella, F., Reulen, H.-J., 2006. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *The Lancet Oncology* 7, 392–401.
- Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., 2009. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial 10, 8.
- Stupp, R., Hottinger, A., Hegi, M.E., Weller, M., 2013. Diagnostik und Therapie von Gliomen. *Swiss Medical Forum – Schweizerisches Medizin-Forum* 13.
- Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A., Read, W., Steinberg, D.M., Lhermitte, B., Toms, S., Idbaih, A., Ahluwalia, M.S., Fink, K., Di Meco, F., Lieberman, F., Zhu, J.-J., Stragliotto, G., Tran, D.D., Brem, S., Hottinger, A.F., Kirson, E.D., Lavy-Shahaf, G., Weinberg, U., Kim, C.-Y., Paek, S.-H., Nicholas, G., Bruna, J., Hirte, H., Weller, M., Palti, Y., Hegi, M.E., Ram, Z., 2017. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 318, 2306.
- Stupp, R., Weller, M., Belanger, K., Bogdahn, U., Ludwin, S.K., Lacombe, D., Mirimanoff, R.O., 2005. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *The New England Journal of Medicine* 10.
- Suchorska, B., Weller, M., Tabatabai, G., Senft, C., Hau, P., Sabel, M.C., Herrlinger, U., Ketter, R., Schlegel, U., Marosi, C., Reifenberger, G., Wick, W., Tonn, J.C., Wirsching, H.-G., 2016. Complete resection of contrast-enhancing tumor volume is associated with improved survival in recurrent glioblastoma—results from the DIRECTOR trial. *Neuro-Oncology* 18, 549–556.
- Szilard, R.K., Jacques, P.-É., Laramée, L., Cheng, B., Galicia, S., Bataille, A.R., Yeung, M., Mendez, M., Bergeron, M., Robert, F., Durocher, D., 2010. Systematic identification of fragile sites via genome-wide location analysis of  $\gamma$ -H2AX. *Nature Structural & Molecular Biology* 17, 299–305.
- Taylor, W.R., Stark, G.R., 2001. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20, 1803–1815.
- Tham, K.-C., Kanaar, R., Lebbink, J.H.G., 2016. Mismatch repair and homeologous recombination. *DNA Repair* 38, 75–83.

- Thon, N., Kreth, S., Kreth, F.W., 2013. Personalized treatment strategies in glioblastoma: MGMT promoter methylation status. *OncoTargets and Therapy* 1363.
- Toledo, L.I., Altmeyer, M., Rask, M.-B., Lukas, C., Larsen, D.H., Povlsen, L.K., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Bartek, J., Lukas, J., 2013. ATR Prohibits Replication Catastrophe by Preventing Global Exhaustion of RPA. *Cell* 155, 1088–1103.
- van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J.B., Brandes, A.A., Menten, J., Stupp, R., Frenay, M., Chinot, O., Kros, J.M., van der Rijt, C.C.D., Vecht, Ch.J., Allgeier, A., Gorlia, T., 2003. Phase II Study of First-Line Chemotherapy With Temozolomide in Recurrent Oligodendroglial Tumors: The European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group Study 26971. *Journal of Clinical Oncology* 21, 2525–2528.
- van Gent, D.C., van der Burg, M., 2007. Non-homologous end-joining, a sticky affair. *Oncogene* 26, 7731–7740.
- van Nifterik, K.A., van den Berg, J., van der Meide, W.F., Ameziane, N., Wedekind, L.E., Steenbergen, R.D.M., Leenstra, S., Lafleur, M.V.M., Slotman, B.J., Stalpers, L.J.A., Sminia, P., 2010. Absence of the MGMT protein as well as methylation of the MGMT promoter predict the sensitivity for temozolomide. *British Journal of Cancer* 103, 29–35.
- Wang, J.Y.J., Edelmann, W., 2006. Mismatch repair proteins as sensors of alkylation DNA damage. *Cancer Cell* 9, 417–418.
- Watanabe, T., Nobusawa, S., Kleihues, P., Ohgaki, H., 2009. IDH1 Mutations Are Early Events in the Development of Astrocytomas and Oligodendrogliomas. *The American Journal of Pathology* 174, 1149–1153.
- Weller, M., Stupp, R., Wick, W., 2012. Epilepsy meets cancer: when, why, and what to do about it? *The Lancet Oncology* 13, e375–e382.
- Weller, M., Tonn, J.C., Ernemann, U., Wiestler, O.D., Bamberg, M., 2009. Glioblastome: Aktuelle Standards bei Diagnostik und Therapie. *best practice onkologie* 4, 4–11.
- Weller, M., Tonn, J.C., Ernemann, U., Wiestler, O.D., Bamberg, M., 2006. Diagnostik und Therapie des Glioblastoms: Standards und neue Entwicklungen. *Der Onkologe* 12, 500–507.
- Weller, M., van den Bent, M., Tonn, J.C., Stupp, R., Preusser, M., Cohen-Jonathan-Moyal, E., Henriksson, R., Rhun, E.L., Balana, C., Chinot, O., Bendszus, M., Reijneveld, J.C., Dhermain, F., French, P., Marosi, C., Watts, C., Oberg, I., Pilkington, G., Baumert, B.G., Taphoorn, M.J.B., Hegi, M., Westphal, M., Reifenberger, G., Soffietti, R., Wick, W., 2017. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *The Lancet Oncology* 18, e315–e329.
- Wirsching, H.-G., Galanis, E., Weller, M., 2016. Glioblastoma, in: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier, pp. 381–397.
- Wirsching, H.-G., Weiss, T., Roth, P., Weller, M., 2018. Grundlagen zur Diagnose und Therapie von Gliomen. *Der Nervenarzt* 89, 692–698.
- Wood, R.D., 1997. Nucleotide Excision Repair in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry* 272, 23465–23468.
- Xu, W., Yang, H., Liu, Y., Yang, Y., Wang, Ping, Kim, S.-H., Ito, S., Yang, C., Wang, Pu, Xiao, M.-T., Liu, L., Jiang, W., Liu, J., Zhang, J., Wang, B., Frye, S., Zhang, Y., Xu, Y., Lei, Q., Guan, K.-L., Zhao, S., Xiong, Y., 2011. Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate Is a Competitive Inhibitor of  $\alpha$ -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases. *Cancer Cell* 19, 17–30.
- Yip, S., Miao, J., Cahill, D.P., Iafrate, A.J., Aldape, K., Nutt, C.L., Louis, D.N., 2009. MSH6 Mutations Arise in Glioblastomas during Temozolomide Therapy and Mediate Temozolomide Resistance. *Clinical Cancer Research* 15, 4622–4629.

- Zeman, M.K., Cimprich, K.A., 2014. Causes and consequences of replication stress. *Nature Cell Biology* 16, 2–9.
- Zhang, J., Dai, Q., Park, D., Deng, X., 2016. Targeting DNA Replication Stress for Cancer Therapy. *Genes* 7, 51.
- Zhang, J., Stevens, M.F.G., Bradshaw, T.D., 2012. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance 13.
- Zhang, J., Stevens, M.F.G., Laughton, C.A., Madhusudan, S., Bradshaw, T.D., 2010. Acquired Resistance to Temozolomide in Glioma Cell Lines: Molecular Mechanisms and Potential Translational Applications. *Oncology* 78, 103–114.
- Zou, L., 2003. Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes. *Science* 300, 1542–1548.

## 6.2 Internetquellen

Hofer S, Bullinger L, Dierlamm L, Grosu AL, Hau P, Hense J, Preusser M, Proescholdt M, Pukrop T, Rushing EJ, Wörmann (2017) Onkopedia Leitlinien: Gliome im Erwachsenenalter <https://www.dgho.de/aktuelles/news/newsarchiv/2017/neu-onkopedia-leitlinie-gliome>  
(Stand: 12.02.2019, 15:30 Uhr)

Zentrum für Krebsregisterdaten – Robert Koch Insitut (RKI)  
[https://www.krebsdaten.de/Krebs/SiteGlobals/Forms/ErgebnisAnsicht/ErgebnisAnsicht\\_form.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/SiteGlobals/Forms/ErgebnisAnsicht/ErgebnisAnsicht_form.html)  
(Stand: 13.02.2019, 14:40 Uhr)



## 7. Danksagung

Besonders herzlichen Dank möchte ich an meine Betreuerin, Dr. Nina Struve, für die umfangreiche Einarbeitung, die hervorragende Betreuung meiner Arbeit und für die allzeit ermutigende Unterstützung richten. Die Zusammenarbeit hat mir große Freude bereitet. Außerdem bin ich sehr dankbar für viele neue Denkanstöße, das geweckte Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten und die Geduld in manchen Situationen mit mir als Nicht-Biochemiker.

Großer Dank gilt auch PD Dr. Malte Kriegs für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit. Vielen Dank für die vielen hilfreichen Anregungen, die neuen Ideen und den inspirierenden Austausch.

Bei Prof. Dr. Kai Rothkamm möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken dieses interessante Thema in seinem Labor bearbeiten zu dürfen. Vielen Dank auch für die Unterstützung bei meinem kleinen Weiterbildungsvorhaben an der Universität Stockholm.

Konstantin Hoffer möchte ich ebenfalls sehr für seine Unterstützung danken. Seine hilfsbereite Art und stets gute Laune trug zu einer tollen Laborzeit mit bei.

Ich danke allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern, sowie den anderen Doktoranden des Labors für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie sowohl für Ihre Hilfe in vielen Bereichen des täglichen Laborlebens als auch für die freundliche Aufnahme und das angenehme Arbeitsklima.

Dank gilt auch der Werner-Otto-Stiftung für die finanzielle Förderung meines Promotionsvorhabens.

Zuletzt und ganz besonders danke ich meinen Eltern für die bedingungslose Unterstützung und Ermutigung während meines Studiums und meiner Doktorarbeit. Ein erfolgreicher Abschluss dieses Kapitels meiner Ausbildung wäre ohne euer Zutun nicht möglich gewesen.

## 8. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.



## 9. Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

Unterschrift: .....

Justus Maximilian Müller-Goebel