

Aus der Klinik für Neurochirurgie
(Prof. Dr. med. V. Rohde)
im Zentrum Neurologische Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Molekulare Mechanismen des radiosensibilisierenden
Effektes von Chloroquin beim Glioblastoma multiforme**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Anne Rübsam
aus
Leipzig

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Giese

II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Emmert

III. Berichterstatter: Prof. Dr. med. dent. Mausberg (Promotor-Vertretung)

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2013

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Fragestellung	8
1.1 Das Glioblastoma multiforme	8
1.1.1 Epidemiologie	8
1.1.2 Neuropathologie	8
1.1.3 Klinische Aspekte des Glioblastoms	10
1.1.4 Hypothesen zur Entstehung und Progression von Glioblastomen.....	11
1.1.5 Therapie des Glioblastoms	13
1.1.6 Experimentelle Therapiekonzepte des Glioblastoms.....	14
1.1.7 Chloroquin als therapeutisches Agens in der Glioblastom-Therapie.....	16
1.2 DNA-Reparatur als Resistenzmechanismus der Glioblastom-Stammzellen gegenüber zytotoxischer Behandlung	19
1.2.1 DNA-Reparaturmechanismen.....	20
1.2.2 H2AX als molekularer Marker des aktivierten DNA-Schadensreparaturweges	22
1.2.3 Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen.....	23
1.3 Fragestellung	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Zellkultur	26
2.1.1 Zelllinien und Antikörper.....	26
2.1.2 Zellkulturmedien und Medienzusätze.....	27
2.1.3 Passagierung von Zellen	27
2.1.4 Bestimmung der Lebendzellzahl.....	28
2.1.5 Beschichtung von Deckgläschen und Lochplatten mit Ornithin.....	28
2.1.6 Bereitstellung von Chloroquin.....	28
2.1.7 Bestrahlung von Zellen mit ionisierender Strahlung	29
2.2 Untersuchung der Zellproliferation	29
2.2.1 Wachstumskurven-Assay.....	30
2.2.2 Neurosphären-Assay.....	30
2.3 DNA-Reparatur-Reporter-Assay	31
2.3.1 Vektoren und Plasmide.....	32
2.3.2 Transiente Transfektion.....	32
2.3.3 Bestimmung der Luciferase-Aktivität.....	33
2.3.4 Proteinquantifizierung nach Bradford	34
2.4 Immunfluoreszenz-Färbung	34
2.4.1 Fixierung adhärenter Zellen mit Paraformaldehyd (PFA)	35
2.4.2 Färbung.....	35
2.5 Genexpressions-Analyse	36
2.6 Statistische Auswertung	36
3 Vorarbeiten	36
3.1 Chloroquin hemmt das Wachstum von Gliomzellen durch Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53	36
4 Ergebnisse	37
4.1 Wirkung von Chloroquin auf das Wachstum der Glioblastomzellen mit mutiertem TP53-Gen	37
4.1.1 Chloroquin hemmt das Wachstum der Glioblastomzelllinie G112.....	37
4.1.2 Nachweis von Stammzeleigenschaften bei der aus der Gliomzelllinie G112 isolierten Sub-Linie G112-BTISC	38
4.1.3 Chloroquin hemmt das Wachstum der G112-BTISC-Sub-Linie mit Stammzeleigenschaften.....	40
4.2 Wirkung der adjuvanten Gabe von Chloroquin auf das Wachstum der Glioblastomzellen nach Bestrahlung	40

4.2.1 Chloroquin erhöht die zytotoxischen Effekte der Bestrahlung auf die Glioblastomzelllinie G112	41
4.2.2 Chloroquin erhöht die zytotoxischen Effekte der Bestrahlung auf die stammzell-ähnlichen G112-BTISC-Zellen	43
4.3 Effekt von Chloroquin auf eine radioresistente Subpopulation von Gliomzellen mit Stammzellattributen	44
4.3.1 Chloroquin erhöht die zytotoxischen Effekte der Bestrahlung auf G112-BTISC-rad-Zellen	45
4.4 Molekularer Mechanismus der Chloroquin-Wirkung	46
4.4.1 Untersuchung des DNA-Reparaturpotenzials mithilfe der immunfluoreszenten Färbung für γ -H2AX.....	46
4.4.2 Ermittlung des DNA-Reparaturpotenzials der G112-BTIC-Zellen mithilfe des Reporter-Gen-Assays	49
4.4.3 Untersuchung des DNA-Reparaturpotenzials von G112-BTISC nach Chloroquin-Behandlung mithilfe des Reporter-Gen-Assays.....	50
4.4.4 Der Einfluss von CLQ auf die Transkription von DNA-Schadensreparatur- relevanten Genen dargestellt mithilfe der Genexpressions-Analyse	51
5 Diskussion	53
6 Zusammenfassung	63
7 Anhang: Abbildungen 18, 19	64
8 Literaturverzeichnis	66
Danksagung	76
Lebenslauf.....	77

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Makroskopische und mikroskopische Pathologie von Glioblastoma multiforme.....	9
Abb. 2: Hierarchisches Entstehungsmodell maligner Gehirntumore.....	13
Abb. 3: Schema der Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen durch PARP-1 und die DNA-Ligase III-XRCC1.....	21
Abb. 4: Übersicht über HR (links) und NHEJ (rechts).....	22
Abb. 5: Prinzip des Luciferase-Assay.....	31
Abb. 6: Schema des DNA-Reparatur-Reporter-Assay.....	32
Abb. 7: Wachstumskurve G112 ST nach CLQ-Behandlung.....	38
Abb. 8: Die Glioblastomzelllinie G112 ST und ihre Subkultur mit Stammzell-Eigenschaften G112-BTISC.....	39
Abb. 9: Wachstumskurve G112 ST nach Bestrahlung.....	41
Abb. 10A: Wachstumskurve G112 ST nach Kombinationsbehandlung.....	42
Abb. 10B: Wachstumskurve G112 ST nach Kombinationsbehandlung.....	43
Abb. 11: Erfassung des Neurosphären-Formations-Potenzials der G112-BTISC-Zellen nach Behandlung mit Chloroquin, Radiatio oder Kombination von CLQ + Radiatio.....	44
Abb. 12: Erfassung des Neurosphären-Formations-Potenzials von G112-BTISC-rad-Zellen nach Behandlung mit Chloroquin, Radiatio oder Kombination von CLQ + Radiatio.....	45
Abb. 13A: Prozentualer Anteil IR-induzierter γ -H2AX positiver G112-BTISC-Zellen in Zeit (min) nach Bestrahlung.....	47
Abb. 13B: Darstellung Bestrahlungs-induzierter DNA-Reparatur-Kapazität.	48
Abb. 14: Quantifizierung der DNA-DSB-Reparaturfähigkeit vder G112-BTISC-Zellen mithilfe des DNA-Reparatur-Reporter-Assay.....	49
Abb. 15: DNA-Reparatur-Kapazität von G112-BTISC.....	51
Abb. 16: Analyse der Beeinflussung der Expression von Genen durch CLQ.....	52
Abb. 17: Übersicht über zelluläre Signalwege, die durch Chloroquin beeinflusst werden	62
Abb. 18: Chloroquin inhibiert das Wachstum und die Lebendigkeit der Glioblastomzellen p53-abhängig.....	64
Abb. 19: CLQ induziert Apoptose in Standard-Glioblastomzelllinien.....	65

Abkürzungsverzeichnis

AKT	Gen für die Proteinkinase B, häufig Onkogen in Tumorzellen
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Ataxia Teleangiectasia Related
BCNU	Bis-Chlorethyl-Nitrose-Harnstoff, Carmustin
BSA	Blockierserum
BTISC	Brain Tumour Initiating Stem-like Cells
CD	Cluster of Differentiation
Chk	Checkpoint Kinase
CLQ	Chloroquin
CMV	Zytomegalievirus
CSC	cancer stem cell
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
<i>de novo</i>	latein., sinngemäß: neu entstehend
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Double-Strand Break
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure bzw. Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EGF-R	Epidermal Growth Factor-Rezeptor
EMEM	Eagles Minimal Essential Medium
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
et al.	latein., sinngemäß: und andere
FCS	Fetales Kälberserum, Fetal bovine serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITCH	Reaktive Isothiocyanat-Form des Fluorescein
GBM	Glioblastoma multiforme
Gy	Gray
H2AX	Histone 2A family member X
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HR	Homologe Rekombination
IF	Immunfluoreszenz
IGF-IR	Insulin-like-Growth-Factor-Rezeptor Typ I
IgG	Immunglobulin G
IL-2	Interleukin-2
<i>in vitro</i>	latein., sinngemäß: im Glas, also im Labor
<i>in vivo</i>	latein., sinngemäß: am lebenden Objekt
IR	Ionizing Radiation
MDR	Multidrug resistance gene
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MRN	Proteinkomplex bestehend aus Mre11, Rad50, NBS1
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NB	Neurobasal Medium
NCIC	National Cancer Institute of Canada
NHEJ	Non Homologous End Joining
NSC	Neural stem cell
PBS	Phosphatpuffer-Lösung, Phosphate buffer solution
pCMV Luc-L	linearisiertes=geschnittenes Plasmid für die Renilla-Luciferase
pCMV Luc-sc	supercoiled=ungeschnittenes Plasmid für die Renilla-Luciferase
PCV	Chemotherapieschema mit Procarbazin, Lomustin und Vincristin
PDGF	Platelet derived Growth Factor
PFA	Paraformaldehyd
PIKK	Phosphatidylinositol-3-Kinase-ähnliche Kinase

RNA	Ribonukleinsäure
RPA	Replication Protein A
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SOX	sex determining region Y-box
SSB	Single-Strand Break
TMZ	Temozolomid
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor-Antibody
VM26	Tenoposid
WHO	World Health Organization
wt-p53	Wildtyp-p53
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Das Glioblastoma multiforme

1.1.1 Epidemiologie

Etwa ein bis zwei Prozent aller Neoplasien des Menschen entstehen im zentralen Nervensystem (ZNS). Für die Bundesrepublik Deutschland wird geschätzt, dass jedes Jahr etwa 8.000 Menschen neu an einem Tumor des Gehirns oder Rückenmarks erkranken (Becker und Wahrendorf 1998). Hierbei bilden die Neoplasien neuroektodermalen Ursprungs, vor allem die Gliome, die größte Gruppe, gefolgt von Meningeomen und Angiomen. Mit etwa zwölf bis 15 Prozent aller hirneigenen Tumoren gilt das Glioblastoma multiforme (GBM) als der am weitesten verbreitete maligne Tumor des zentralen Nervensystems (Davis et al. 2001; Louis et al. 2007).

Es hat eine Inzidenz von sechs bis sieben Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohnern pro Jahr und kann in jeder Altersgruppe mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 45. und dem 70. Lebensjahr auftreten (Black 1991).

1.1.2 Neuropathologie

Makroskopisch zeigt sich ein inhomogenes und vielfältiges Bild (daher: multiforme) mit zahlreichen Nekrosen und Einblutungen. Histologisch ist der Tumor durch ein zellreiches, pleomorphes Bild mit Nekrosen, zahlreichen Mitosen und diffuser Infiltration des reaktiv veränderten Umgebungsgewebes gekennzeichnet. Die Nekrosen sind hierbei von zelldichten Arealen (sog. Pseudopallisaden Abb. 1) umgeben, in denen die Tumorzellen oft nebeneinander aufgereiht erscheinen. Außerdem finden sich Gefäßneubildungen mit abnormal großen und häufig glomerulär angeordneten Kapillaren (Waggener und Beggs 1976). Zur Diagnose eines Glioblastoms WHO Grad IV müssen laut WHO-Klassifikation neben dem Befund eines anaplastischen glialen Tumors die folgenden histopathologischen Kriterien erfüllt sein: Kernatypien, Mitosen, mikrovaskuläre Endothelproliferationen und/oder flächenhafte Nekrosen (Daumas-Duport et al. 1988; Kleihues et al. 2002; Louis 2006).

Bisher konnten für Glioblastome keine reproduzierbaren unabhängigen gewebebasierten prognostischen Marker etabliert werden.

Eine Vorhersage bezüglich der Patientenüberlebenszeit kann derzeit nur mithilfe prognostischer Faktoren wie Lebensalter, Karnofsky-Index (klinischer Index des Gesundheitszustandes des Patienten), Tumorlokalisation und Ausmaß der chirurgischen Resektion des Tumors getroffen werden (Casartelli et al. 2009; Wen und Kesari 2008). Genexpressionsstudien und die morphologische Vielfalt deuten auf eine ausgeprägte Heterogenität und komplexe molekulargenetische Aberationen dieser Tumorentität hin (Mischel und Cloughesy 2006), sodass mit hoher Wahrscheinlichkeit multifaktorielle

Prognosemodelle erforderlich sein werden. Das Glioblastom zeigt nur äußerst selten Fernmetastasen. Innerhalb des ZNS weisen die Tumorzellen jedoch die Eigenschaft zur Infiltration entlang von Blutgefäßen und ausgeprägter Invasion in das umliegende Gewebe auf. Daher ist die von Tumorzellen befallene Hirnmasse meist deutlich größer als in der bildgebenden Diagnostik oder das makroskopisch sichtbare Tumorareal.

Die Ausbreitung von malignen Gliomen erfolgt entlang von Blutgefäßen, Basalmembranstrukturen und myelinisierten Axonen, bevorzugt entlang der Sehstrahlung, durch das Corpus callosum oder die Commissura anterior, wodurch es häufig auch zu einer Ausbreitung auf die kontralaterale Seite kommt (Matsukado et al. 1961). Ein solches bifrontales Wachstum wird auch als Schmetterlingsgliom bezeichnet.

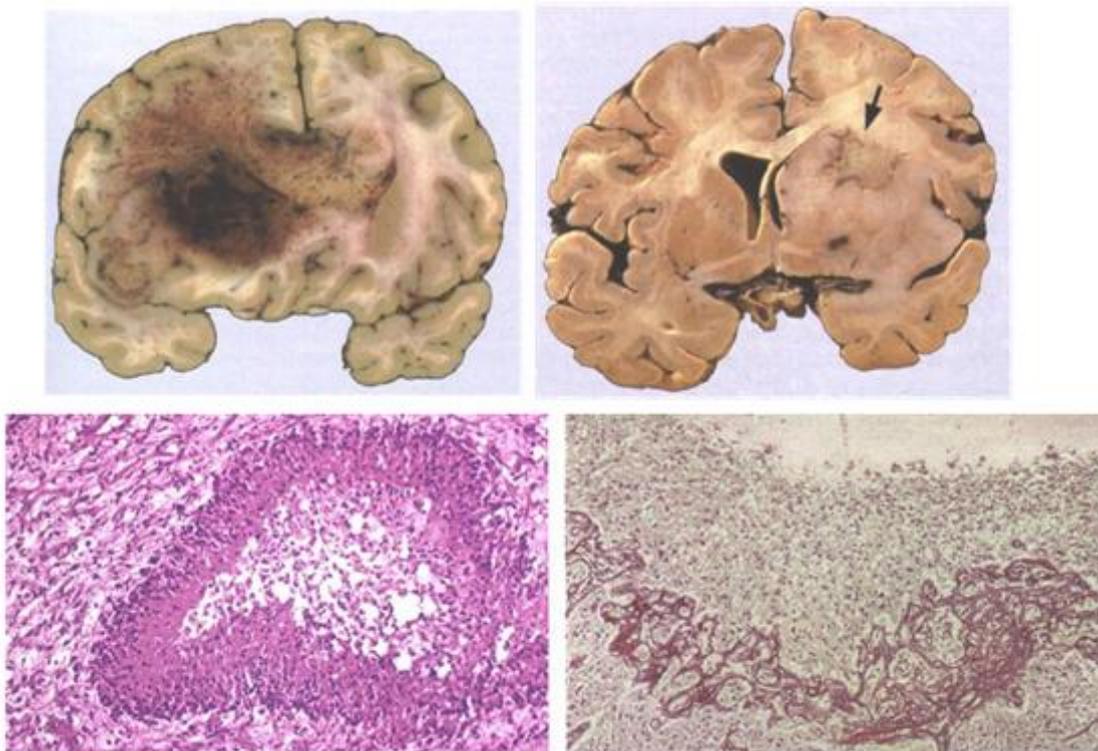


Abb. 1: Makroskopische und mikroskopische Pathologie von Glioblastoma multiforme. Oben links: Hämorrhagisches Glioblastom im linken Frontallappen mit Infiltration des Corpus callosum und Ausbreitung in die kontralaterale Hemisphäre. Oben rechts: Glioblastom der Basalganglien mit umschriebener Nekrosezone (Pfeil). Unten links: HE-Präparat eines Glioblastoms mit zentraler Nekrose und zellreicher Umgebung mit pseudopallisadenförmiger Anordnung. Unten rechts: In der Gomori-Färbung sind zahlreiche Gefäßproliferate um einen Nekroseherd zu erkennen (aus Graham 1997; 894).

1.1.3 Klinische Aspekte des Glioblastoms

Zu den ersten Symptomen gehören unter anderem anhaltende Kopfschmerzen und neu auftretende epileptische Anfälle. Außerdem kann es durch die Raumforderung zu fokalen neurologischen Ausfällen mit Aphasie, Sensibilitätsstörungen, Lähmungen und Sehstörungen kommen. Häufig führen auch Apathie, Persönlichkeitsveränderungen und psychomotorische Verlangsamung den Patienten zum Arzt. Das Auftreten von Hirndruckzeichen wie Übelkeit, Erbrechen, Stauungspapille und Koma als Erstmanifestation spricht für einen ausgedehnten bzw. ungünstig lokalisierten Tumor oder eine akut eingetretene Einblutung und ist häufig mit einem ungünstigen Verlauf assoziiert.

Glioblastome gelten aufgrund ihrer extensiven Invasivität, wie bereits beschrieben, als hoch maligne Tumoren. Dies führt dazu, dass die Tumordinfiltration im Stadium des Auftretens erster klinischer Symptome häufig schon weit in das gesunde Hirngewebe fortgeschritten ist. Die Therapie hat daher einen palliativen Charakter und trotz makroskopisch vollständiger Resektion des umliegenden Gewebes ist eine komplette Entfernung so gut wie nicht möglich (Giese 2003). Es kommt somit praktisch immer zur Rekurrenz der Tumoren und im Gegensatz zu anderen soliden Tumoren metastasieren Glioblastome selten, sodass die Patienten dieser Krankheit fast ausnahmslos durch die Tumorrekurrenz erliegen.

Rekurrente Tumormasse tritt zum einen in der Region des ursprünglichen Tumors, aber auch in weiter Entfernung, z. B. in der gegenüberliegenden Hemisphäre, auf, die infiltrative Natur der Glioblastome beweisend. Die stark ausgeprägte Fähigkeit der Glioblastomzellen zur Migration und Invasion in das umliegende Gewebe stellt eines der Hauptprobleme bei der Therapie dar. Hierdurch ist es kaum möglich, den Tumor operativ komplett zu entfernen, weil sich disseminierte Tumorzellen in aller Regel schon zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in z. T. weiter Entfernung vom Primärtumor befinden. Die Chirurgie ist daher selten kurativ, führt aber durch Dekompression häufig zu einer Linderung der Symptome.

Die Wiederkehr des Tumors wird im MRT oft erst indirekt durch ein vermehrtes Ödem mit Massenverschiebung sichtbar und lässt so einen Wiederanstieg der Tumormasse erkennen (Macdonald et al. 1990). Bei der Rezidiv-Therapie kommen je nach vorausgegangener Therapie Chemotherapie, Radiotherapie und erneute Resektion in Frage, allerdings ist die Prognose mit einer mittleren Überlebenszeit von 25 bis 30 Wochen (Lamborn et al. 2008) in der Rezidiv-Situation schlecht und die gegenwärtigen „*second line*“-Therapien sind größtenteils als palliative Therapieversuche anzusehen (Gorlia et al. 2008; Yung et al. 2000). Neben der invasiven Natur scheint auch die zelluläre Heterogenität des Tumors für das geringe Ansprechen auf derzeit verfügbare Therapiemöglichkeiten ursächlich zu sein. Es gibt inzwischen mehr und mehr Anhaltspunkte dafür, dass eine kleine Gruppe von Glioblastomzellen, die Glioblastom-Stammzellen, für die Resistenz der Tumoren gegenüber Standardtherapien verantwortlich ist. Beweise dafür liefert zum einen die Tatsache, dass

90 Prozent der Tumoren am Ort des Ursprungstumors wieder auftreten (Hochberg und Pruitt 1980). Ferner scheinen, während derzeit angewandte Therapien zur Reduktion der breiten Tumormasse führen, wenige Zellen mit Stammzeleigenschaften übrig zu bleiben, welche in der Lage sind, den Ursprungstumor zu rekapitulieren. Studien zur Biologie von Glioblastomen vor und nach Behandlung stützen diese Theorie und so konnte eine Anreicherung an Zellen, die das Oberflächenantigen CD133 exprimieren, im Gewebe rekurrenter Glioblastome nachgewiesen werden (Bao et al. 2006a; Neman und Jandial 2010; Rich 2007). Bei CD133 handelt es sich um einen etablierten neuronalen Stammzellmarker.

1.1.4 Hypothesen zur Entstehung und Progression von Glioblastomen

Obwohl das Gehirn in seiner strukturellen Integrität wenige Wochen nach der Geburt ausgeformt ist, bleibt die begrenzte Fähigkeit zum Umbau, einschließlich axonalen *Remodelings*, Synaptogenese sowie die Fähigkeit zur Neubildung von Neuronen, Migration und Integration, lebenslang erhalten (Vescovi et al. 2006). Die Subventrikularzone und der Gyrus dentatus des Hippokampus gelten als Hauptorte dieser Neurogenese. Innerhalb des letzten Jahrzehnts fanden sich immer mehr Hinweise auf die Existenz neuraler Stammzellen, die in diesen Bereichen im postnatalen Gehirn residieren und Progenitorzellen mit der Fähigkeit zur Migration produzieren (Dirks 2001).

Bisher ging man davon aus, dass die Entstehung von Glioblastomen ein mehrstufiger Prozess genetischer Alterationen sei, der in der schrittweisen Transformation normaler Astrozyten zu Tumorzellen resultiere (Nowell 1976). Neuere Beweise liefern die Erkenntnis, dass Glioblastome, wie auch die meisten Tumorentitäten, aus wenigen maligne transformierten neuroepithelialen Vorläuferzellen durch Anhäufung genetischer Mutationen entstehen (Grander 1998). Vor allem die häufige Entstehung von Glioblastomen in der Subventrikulärzone und die dortige Lokalisation von Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften unterstützen diese Theorie.

Die Tumor-Stammzell-Hypothese (CSC=cancer stem cell) ist begründet in der Annahme, dass Tumoren einen geringen Anteil von Zellen mit Stammzell-Eigenschaften besitzen, welche über die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Aufrechterhaltung des Tumorwachstums verfügen (Abb. 2). Es kommt dann zur klonalen Vermehrung dieser von der Norm abweichenden Zellen, die klinisch zunehmend aggressives Verhalten aufweisen (Heppner et al. 1998). Diese Zellen, die auch von manchen Autoren vereinfachend „Tumorstammzellen“ (BTISCs=*Brain Tumour Initiating Stem-like Cells*) genannt werden, bilden nur einen kleinen Teil der Tumormasse, sind aber durch den Verlust wachstumsregulierender Mechanismen in der Lage zur nahezu unbegrenzten Teilung sowie Invasion und Zerstörung normaler Gewebe (Hanahan und Weinberg 2000). Tumorstammzellen konnten erstmals in Leukämien identifiziert werden (Buzzeo et al. 2007) und ihre Existenz konnte bis heute bei einer Vielzahl von soliden Tumoren, wie auch in

Glioblastomen (Tysnes und Bjerkvig 2007), nachgewiesen werden. Glioblastom-Tumorstammzellen werden definiert durch ihre Fähigkeit zur (1) Selbsterneuerung, (2) zur Initiierung von Glioblastomen nach Implantierung in die Gehirne immunsupprimierter Mäuse und (3) ihre Multipotenz: die Kapazität zur Differenzierung in Zellen mit neuronalem, astroglialem und oligodendroglialem Phänotyp (Singh et al. 2004). Weiterhin charakteristisch für BTISCs ist die Expression neuronaler Stammzell-Antigene (CD133, Nestin, Mushashi-1, Sox) sowie ihr Wachstum unter experimentellen Bedingungen im serumfreien Medium, nur supplementiert mit *Epidermal Growth Factor* (EGF) und *Fibroblast Growth Factor* (FGF) als nicht-adhärenente dreidimensionale Aggregate, die auch als Neurosphären bezeichnet werden. Das Neurosphärenformationspotenzial gilt als allgemeingültiges Kriterium für die Zuordnung von Tumorzellen zur Stammzell-Fraktion (Singh et al. 2003) und fand auch in dieser Arbeit Anwendung. BTISCs verfügen über zahlreiche molekulare und funktionelle Gemeinsamkeiten mit den normalen neuronalen Stammzellen (NSCs), die Theorie stützend, dass Glioblastome aus mutierten NSCs oder Progenitorzellen entstehen (Galli et al. 2004). Ungeachtet der Frage, ob BTISCs aus maligne transformierten NSCs entstehen, steht fest, dass die BTISCs besondere Eigenschaften aufweisen, die sie von der breiten Tumormasse abheben. Aktuelle Studien lassen darauf schließen, dass Glioblastom-Stammzellen auch der Aufrechterhaltung der Tumoren dienen. So fördern sie durch VEGF-Produktion die Angiogenese in der Umgebung des Tumors (Bao et al. 2006b) und erzeugen so eine tumoreigene vaskuläre Nische (Calabrese et al. 2007).

Die möglichen Ursachen der effizienten Resistenzmechanismen dieser Tumorstammzellen gegenüber konventionellen Therapiemodalitäten sind ein derzeitiger Schwerpunkt der Glioblastom-Forschung (Kang et al. 2008). Eine mögliche Ursache der beobachteten Radioresistenz der Stammzellen scheint aus der bevorzugten Aktivierung von DNA-Schadensreparatur-Signalwegen zu resultieren (Bao et al. 2006a). Strategien zur Erhöhung der lokalen Strahlendosis wie z. B. durch die Brachytherapie (Selker et al. 2002) oder die stereotaktische Radioresektion mittels *Gamma knife* (Souhami et al. 2004; Tsao et al. 2005) führten dabei nicht zur erhofften Steigerung der Überlebensrate.

BTISCs gelten weiterhin als höchst chemoresistent und sind in der Lage, sich nach Chemotherapeutika-Behandlung zu erholen, und zeigen dann ein nahezu uneingeschränktes Wachstum (Eramo et al. 2006). Die Chemoresistenz der Zellen scheint auf der Überexpression der O⁶-methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT), der Hoch-Regulation von *Multidrug* Resistenz Genen (MDR) und der Inhibierung von Apoptose zu beruhen (Dean et al. 2005; Liu et al. 2006). Ob die DNA-Reparatur wie in normalen Stammzellen ein Hauptgrund für die im Rahmen der Therapie induzierten Apoptose ist, stellt immer noch eine offene Frage dar (Frosina 2009; Johannessen et al. 2009). Therapeutische Konzepte, die effektiv auf die Glioblastom-Stammzellen abzielen, sind daher nötig, wenn maligne Gliome

vollständig erradiziert werden sollen. Sie setzen allerdings ein besseres Verständnis der biologischen Unterschiede zwischen normalen und Tumorstammzellen voraus, um selektive Therapien, die normales Hirngewebe schonen, zu entwickeln.

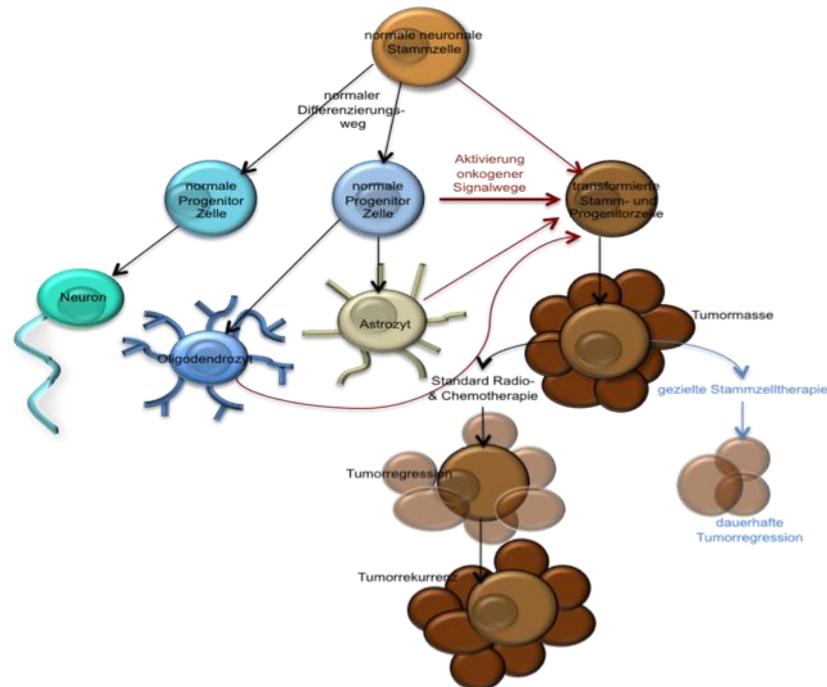


Abb. 2: Hierarchisches Entstehungsmodell maligner Gehirntumore. Normale Neuronale Stammzellen (NSC) erneuern sich selbst und erzeugen multipotente Progenitorzellen, die Neuronen, Oligodendrozyten und Astrozyten bilden. Im Gegensatz zu NSCs gehen BTISCs aus der Transformation von NSC oder Progenitorzellen (rote Pfeile) oder weniger wahrscheinlich aus der De-Differenzierung von Oligodendrozyten oder Astrozyten (dünne rote Pfeile) hervor und führen zur Ausbildung maligner Glioblastome. BTISCs sind relativ resistent gegenüber Standardtherapien, wie Radio- oder Chemotherapie, und sind verantwortlich für das Tumorrezidiv nach Behandlung. Therapien, die auf Stammzellen abzielen, können diese Zellen dezimieren und so möglicherweise zu einer dauerhaften Tumorregression (blaue Pfeile) führen (in Anlehnung an Wen und Kesari 2008; 498).

1.1.5 Therapie des Glioblastoms

Da aufgrund der invasiven Eigenschaften des Tumors eine komplette Resektion kaum möglich ist, erfordert die Therapie des Glioblastoms ein multidisziplinäres Vorgehen und schließt chirurgische Resektion, Radiotherapie und Chemotherapie mit ein.

Je nach Lokalisation und Tumorgöße wird gegenwärtig nach Möglichkeit eine komplette Resektion durchgeführt, die sich in den neuesten Studien als positiver Prädiktor für das Überleben von Glioblastom-Patienten herausgestellt hat (Gorlia et al. 2008). Durch Anwendung neuer Verfahren wie der intraoperativen Fluoreszenzdiagnostik mit 5-Aminolävulinsäure kann intraoperativ das Glioblastomgewebe besser sichtbar gemacht und gezielt reseziert werden (Stummer et al. 2000).

Die adjuvante Strahlentherapie in Dosierungen von 54 bis 60 Gy, nach Möglichkeit 60 Gy (1.8 bis 2 Gy-Fractionen), gehört zur Standardtherapie des Glioblastoms (Laperriere et al.

2002). Die Verlängerung der medianen Überlebenszeit durch diese Therapie beträgt etwa sechs Monate (AWMF 2008).

Bei der Chemotherapie hat sich vor allem die alkylierende Substanz Temozolomid (TMZ, Temodal®), die oral verabreicht wird, als wirksam herausgestellt (Stupp et al. 2001; Stupp et al. 2005) und hat die bisher verwendeten Substanzen Carmustin (BCNU), Tenoposid (VM26) und die sogenannte PCV-Kombinationstherapie (Procarbazin, CCNU, Vincristin) als Standardtherapie abgelöst. Auf Basis der Arbeit der Europäischen Organisation für Forschung und Behandlung von Krebskrankheiten (European Organization for Research and Treatment of Cancer, EORTC) und des Kanadischen Nationalen Krebsinstituts (National Cancer Institute of Canada, NCIC) wurde die kombinierte Radiochemotherapie gefolgt von Chemotherapie mit TMZ zur Standardtherapie für neu diagnostizierte Glioblastome empfohlen (Gorlia et al. 2008; Stupp et al. 2005).

Die mittlere Überlebenszeit der Glioblastom-Patienten ist trotz multimodaler Therapie mit zwölf Monaten weiterhin sehr schlecht. Durch die neue Anwendung von TMZ konnte eine Steigerung der mittleren Überlebenszeit von zwei Monaten auf 14 Monate erreicht werden. Dieser geringe, aber dennoch signifikante Anstieg in der Überlebensrate repräsentiert den größten Fortschritt in der Behandlung des Glioblastoms der letzten vier Jahrzehnte. Leider stellt die Chemotherapie mit TMZ für nur etwa die Hälfte aller Glioblastom-Patienten eine wirksame Alternative dar. So profitierten vor allem jene Patienten von einer Therapie mit Temozolomid, welche eine Methylierung des Promotors des O⁶-methylguanin-DNA-Methyltransferase-Gens (MGMT) aufweisen. MGMT ist ein DNA-Reparaturenzym, das die durch Temozolomid induzierten Alkylierungen repariert und dessen Expression durch die Methylierung der Promoterregion negativ reguliert wird (Hegi et al. 2005).

1.1.6 Experimentelle Therapiekonzepte des Glioblastoms

Aufgrund der oben aufgeführten Schwierigkeiten bei der konventionellen Therapie des Glioblastoms wurde in den letzten Jahren die Aufmerksamkeit auf die interventionelle molekulare Neuroonkologie gerichtet.

Hierbei wird versucht, die entarteten Glioblastomzellen spezifisch auf molekularer Ebene anzugreifen. In Kombination mit herkömmlichen Behandlungsmethoden kann dies zu einer Maximierung des Therapieerfolges führen. Hierbei werden zahlreiche unterschiedliche Ansätze verfolgt, von denen im Folgenden einige kurz beschrieben werden.

1.1.6.1 Gezielte molekulare Therapie

Zahlreiche Signalwege, die zur Proliferation und zum Überleben von Tumoren beitragen, werden durch Wachstumsfaktoren wie den *Epidermal Growth Factor* (EGF) und ihre Rezeptoren vermittelt (Jendrossek et al. 2003). Da Glioblastome den Rezeptor für EGF überexprimieren, stellt die Verwendung von Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Gefitinib einen

vielversprechenden Ansatz dar (Kesari et al. 2006). Derzeit befindet sich die Kombination aus dem *Platelet-derived-Growth-Factor* (PDGF)-Rezeptor Inhibitor Imatinib in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Hydroxyurea in der klinischen Prüfung.

1.1.6.2 Hemmung der Angiogenese

In einem Ansatz wird versucht, die für das Wachstum des Glioblastoms notwendige gesteigerte Angiogenese auf molekularer Ebene zu unterbinden (Machein und Plate 2000). Eine Möglichkeit ist hierbei die Blockade des für die Angiogenese essenziellen VEGF-A (Fong et al. 1999). Eine andere Möglichkeit ist die intratumorale Langzeitapplikation von Endostatin, einem potenten antiangiogenetisch wirksamen Protein (Joki et al. 2001). Auch antiangiogenetische Ansätze wie beispielsweise die Verwendung des oralen Endothelin-A-Rezeptorantagonisten Atrasentan befinden sich derzeit in der klinischen Prüfung (Phuphanich et al. 2008).

1.1.6.3 Immuntherapie

Bei der lokalen Immuntherapie wird versucht, das körpereigene Immunsystem für die Bekämpfung des Tumors zu stimulieren. Durch die lokale Anwendung der Immuntherapie soll zum einen das gesunde Gewebe geschont und zum anderen die Blut-Hirn-Schranke überwunden werden.

Eine Methode der Immuntherapie ist die unspezifische Stimulation des lokalen Immunsystems des Gehirns. Hierbei werden immunmodulatorische Chemokine, wie zum Beispiel Interleukin-2 (IL-2), entweder prä- oder postoperativ stereotaktisch in den Tumorsitus appliziert (Merchant et al. 1992).

Eine andere Methode ist die lokale adaptive Immuntherapie. Dabei werden zunächst Dendritische Zellen aus dem peripheren Blut gewonnen, ex vivo auf bestimmte Tumorantigene geprägt und wieder re-implantiert. In vivo regen die modifizierten Zellen daraufhin die T-Zellen, die B-Zellen sowie weitere Mechanismen des Immunsystems an, die entsprechenden Tumorzellen zu bekämpfen (Vesely et al. 2011).

1.1.6.4 Gentherapie

Neben den oben angeführten experimentellen Therapiekonzepten kommt für die Behandlung des Glioblastoms die Anwendung von Gentherapie in Frage (Alavi und Eck 2001). Darunter versteht man den Versuch, Zielgene mithilfe eines Vektors in Zellen des an Glioblastom erkrankten Individuums einzubringen. Mithilfe der Gentherapie sollen die etablierten Therapien in ihrer Effektivität gesteigert werden.

Zu den Zielgenen gehören sowohl Gene, die wie p53 die Apoptose der Tumorzellen induzieren, als auch solche, die den Körper zu einer effektiveren Immunantwort gegen den Tumor anregen sollen (Ali et al. 2005; Li et al. 1999). Daneben wird auch versucht,

Inhibitoren der Angiogenese wie Angiostatin in die Zielzellen einzubringen (Ma et al. 2002). Die Art der Zielzellen variiert je nach Forschungsrichtung von den Glioblastomzellen selbst über Immunzellen zu Endothelzellen. Weiterhin sollen mithilfe der Gentherapie selektiv Tumorzellen mit konditional zytotoxischen Genen transfiziert werden. Hierbei wird in die Tumorzellen ein Enzym wie die Thymidinkinase eingebracht. Dieses Enzym aktiviert nun ein *Prodrug* wie Ganciclovir spezifisch in der Tumorzelle zu einer toxischen Substanz (Nestler et al. 2004).

Während es *in vitro* zahlreiche Möglichkeiten gibt, die Zielzellen mit den Zielgenen zu transfizieren, eignen sich hierfür im klinischen Bereich vor allem virale Vektoren. Dazu gehören neben Retroviren wie dem Moloney-Murine-Leukemia-Virus und dem HIV-1-*based* Lentiviral-Vektor auch die Adenoviren (Ali et al. 2005).

1.1.7 Chloroquin als therapeutisches Agens in der Glioblastom-Therapie

Chloroquin (CLQ) ist ein weitverbreitetes effektives und sicheres anti-Malaria- und anti-Rheumatisches Therapeutikum. Es wurde 1934 als „Resochin“ von Andersag und seinen Mitarbeitern in den Bayer-Laboratorien entwickelt. Ironischerweise wurde CLQ danach für über ein Jahrzehnt ignoriert, weil es als zu toxisch für die Anwendung beim Menschen galt. Erst während des Zweiten Weltkrieges wurde es in Amerika im Laufe der Entwicklung von anti-Malaria-Mitteln „wiederentdeckt“. Von der US-Regierung gesponserte klinische Studien zeigten damals unzweifelhaft, dass CLQ einen hohen therapeutischen Stellenwert als anti-Malaria-Mittel hat. Daraufaufgehend erhielt CLQ 1947 die Zulassung für die Anwendung in der Praxis als Prophylaxe-Behandlung der Malaria (*Plasmodium vivax, ovale und malariae*). CLQ stellt bis zum heutigen Tag das Mittel der Wahl bei der medikamentösen Behandlung der Malaria dar, da es hoch effizient, preiswert und gut verträglich für den Menschen ist (Breckenridge und Winstanley 1997; Wiesner et al. 2003). Biochemische Untersuchungen zur Wirkungsweise von CLQ konnten nachweisen, dass es in die sauren Vakuolen des Parasiten eintritt und dort das Wachstum durch Komplexbildung mit Hämatin inhibiert (Dorn et al. 1995; Pandey et al. 2001; Sullivan et al. 1996).

Weiterhin findet CLQ heutzutage breite Anwendung in der Behandlung der Rheumatoiden Arthritis (Augustijns et al. 1992; Titus 1989), des Lupus Erythematodes (Meinao et al. 1996) und der Amöben Hepatitis (Conan 1948). Die anti-inflammatorischen Eigenschaften des CLQ werden durch Verhinderung der Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine in den Blutstrom hervorgerufen. Neben der Wirkung auf chronische Entzündungszustände gilt dessen Wirkung auch bei Symptomlinderung von akuten bakteriellen Infektionen (Karres et al. 1998). Klinische Studien erproben ebenfalls die Anwendung als potenzielles Virostatikum bei Patienten mit HIV-Infektion (Savarino et al. 2003; Savarino et al. 2006).

1.1.7.1 Neue Anwendungsmöglichkeiten und Wirkprinzipien von CLQ in der antineoplastischen Therapie

In der letzten Zeit stehen zunehmend die potenziellen antineoplastischen Eigenschaften von Chloroquin im Vordergrund. Kumulative Berichte lassen vermuten, dass CLQ in der Lage ist, Tumorzellen selektiv für die zellschädigenden Effekte von Strahlentherapie (Beierwaltes et al. 1968; Zhao et al. 2005), Chemotherapeutika oder deren Kombinationstherapie (Carew et al. 2006; Degtyarev et al. 2008; Hagihara et al. 2000; Hu C et al. 2008) zu sensibilisieren.

Die lysosomotrophe Wirkungsweise von CLQ scheint dabei eine Rolle für die Steigerung der Effizienz und Spezifität zu spielen und es kommt über diesen Wirkmechanismus zur selektiven Verstärkung etablierter Chemotherapeutika. Es wird so vermutet, dass Variationen im pH-Wert für die Selektivität von CLQ für Tumorzellen verantwortlich sind. Der intrazelluläre pH-Wert der Tumorzellen ist ähnlich dem normaler Zellen, jedoch herrscht in der Umgebung solider Tumoren eine höhere Azidität im Vergleich zu normalem Gewebe (Boyer und Tannock 1992; Vaupel et al. 2002). Jensen und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass diese selektive Toxizität für Zellen in saurer Umgebung auch bei Kombination mit anderen Chemotherapeutika (Etoposid) erhalten bleibt, während Zellen in normaler Umgebung von der Chemotherapeutika-Wirkung verschont blieben. Das erscheint wichtig, da Etoposid und das verwandte Tenoposid in der Therapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms in maximal tolerablen Dosen verabreicht werden müssen und die Anwendung oft an dosisimitierenden Nebenwirkungen scheitert (Jensen et al. 1994). Lee und seine Mitarbeiter zeigten weiterhin, dass CLQ durch Anhebung des endosomalen pH-Wertes die therapeutische Effizienz von Chemotherapeutika mit basischen pH wie Doxorubizin und Mitoxantron durch Erhöhung ihrer Toxizität (Verhindern der Sequestration in den Endosomen) sowie deren Gewebegängigkeit in soliden Tumoren verstärkt (Lee CM und Tannock 2006).

Eine eigene zytotoxische Wirkung des CLQ gegenüber verschiedenen humanen Tumorzelllinien wurde mehrfach bewiesen (Boya et al. 2003; Boya et al. 2005; Gurova et al. 2005). Durch seinen lysosomotropen Mechanismus scheint CLQ sowohl auf die Apoptose als auch auf die Nekrose von Tumorzellen Einfluss zu nehmen. Diese Vermutung bestätigen neuere Untersuchungen, die zeigen, dass CLQ in Maus-Fibroblasten die Apoptose durch lysosomale Proteindegradation verstärkt (Amaravadi et al. 2005). Die Vermittlung des lysosomalen Zelltodes durch CLQ konnte auch bei Mammakarzinomzellen nachgewiesen werden (Boya et al. 2005). Neuere Untersuchungen legen des Weiteren die Vermutung nahe, dass CLQ Tumorzellen durch seinen lysosomotropen Effekt effektiv für zelltoxische Therapien wie Chemotherapie oder Bestrahlung sensibilisieren kann (Solomon und Lee H 2009). Hu und seine Mitarbeiter demonstrierten in diesem Zusammenhang die Effektivität von CLQ als tumorspezifischem Sensitizer bei der Kombination mit Akt-Signalweg-

Inhibitoren (Hu C et al. 2008). Ebenfalls bei Mammakarzinomzellen konnte eine durch den Lysosomotrophismus medierte Nekrose zusätzlich zu der durch Bestrahlung ausgelösten Apoptose beobachtet werden (Zhao et al. 2005).

Weiterhin führt Chloroquin zur Verhinderung von Autophagie durch Anreicherung in Lysosomen und Autophagosomen und induziert so indirekt die Aktivierung des p53-abhängigen Zelltodes. Zhou et al. zeigten, dass Chloroquin so, über Auslösung von DNA-Schäden, zu einer Induktion von p53-vermittelter Differenzierung und Zellzyklusarrest führt. Bei Versuchen mit MCF-7-Brustkrebszellen kam es zu einer sechzigprozentigen Reduktion des Tumorwachstums in vitro (Zhou et al. 2002).

Die über Chloroquin vermittelte apoptotische Wirkung zeigt in In-vitro-Versuchen präventive Wirkung auf die Entstehung von Burkitt-Lymphomen und *Ataxia Teleangiectasia* und so kam es, dass die Inzidenz für Burkitt-Lymphome durch Chemoprophylaxe mit Chloroquin um 75 Prozent gesenkt werden konnte (Macleane et al. 2008). Retrospektiv wird dieses Ereignis zunehmend mit einer präventiven Wirkung des Chloroquins in Verbindung gebracht, so auch von der Forschergruppe um Maclean und Kastan. Eine Behandlung des manifesten Malignoms wird nicht beschrieben.

Über die Verhinderung der Entwicklung therapieresistenter Klone erklärten Briceño und Reyes das Ansprechen von C6-Glioma-Zellen auf die Chloroquingabe zusätzlich zu Carmustin (Briceno et al. 2003).

Physiochemische Untersuchungen legen nahe, dass CLQ einen Komplex mit der DNA bilden kann (Haworth et al. 1983). Chatterjee und Kollegen vermuteten, dass die langkettige N-Diethyl-amino-Seitenkette des CLQ möglicherweise für die DNA-Interkalation verantwortlich ist (Chatterjee et al. 1998). Neuere Studien zeigen, dass CLQ ATM via Autophosphorylierung an Serin 1981 aktivieren kann und so zu einer Aktivierung von p53 an Serin 15 in Fibroblasten führt (Bakkenist und Kastan 2003). Weiterhin ist bekannt, dass CLQ und andere Mitglieder der Quinolon-Sulfonamid-Familie sowohl einen Zellzyklusarrest und eine Ausdifferenzierung von Mammakarzinomzellen der MCF-7-Reihe in vitro als auch eine p53-abhängige Apoptose in vivo induzieren können. Im Rahmen der Versuche wurden intrazellulär konzentrationsabhängig erhöhte Aktivitäten von p21 und p53 und p27 gemessen. Weiterhin kam es zu einem Zellzyklusarrest in der G1/G0-Phase (Zhou et al. 2002). So wird postuliert, dass Chloroquin aufgrund DNA-interkalierender Eigenschaften und damit verbundener Hemmung der Topoisomerase II durch DNA-Schädigung p53 aktiviert (Snyder und Arnone 2002).

Im Zuge der wachsenden Erfahrung im experimentellen Umgang mit CLQ galt es in einem nächsten Schritt, den potenziellen anti-tumoralen Effekt von CLQ auch im Rahmen klinischer Studien zu untersuchen. Mit diesem Ziel erfolgen aktuell verschiedene Studien, die CLQ als Adjuvans bei der Behandlung von Mamma-, Bronchialkarzinomen und hämatologischen

Malignomen untersuchen (<http://clinicaltrials.gov>). Sotelo et al. veröffentlichten bereits erste Erfahrungsberichte zur Anwendung von CLQ bei Glioblastoma multiforme und konnten vielversprechende Erfolge durch die adjuvante CLQ-Gabe zur Standardtherapie bei Patienten mit GBM zeigen (Briceno et al. 2007; Briceno et al. 2003; Sotelo et al. 2006).

Obwohl noch weitere Studien zur genauen Wirkungsweise von CLQ durchgeführt werden müssen, gilt es somit schon jetzt als einer der sichersten und effektivsten *Sensitizer* in der modernen anti-tumoralen Therapie.

1.2 DNA-Reparatur als Resistenzmechanismus der Glioblastom-Stammzellen gegenüber zytotoxischer Behandlung

Die DNA einer Zelle stellt den Bauplan für alle von der Zelle für ihren Stoffwechsel benötigten Proteine dar und ermöglicht die Aufrechterhaltung des zellulären Stoffwechsels. Gleichzeitig dient sie als Träger des Erbgutes zur Weitergabe dieses „Bauplans“ an folgende Generationen. Beide Funktionen erfordern die Sicherung der Stabilität der DNA und der von ihr kodierten Informationen. Die DNA einer Zelle liegt nicht isoliert vom übrigen Stoffwechselgeschehen vor. Sie ist innerhalb des Zellkerns ständig den direkten oder indirekten Einflüssen von Stoffwechselfvorgängen ausgesetzt, die geeignet sind, ihre molekulare Struktur zu verändern (Friedberg 2006; Friedberg 1995). Teilweise sind solche Veränderungen für die Aufrechterhaltung oder Erfüllung der Funktion der DNA notwendig, zum Beispiel bei der kurz nach der Replikation durchgeführten Methylierung einzelner Basen (Holliday und Ho 2002), der Einfügung von transienten Strangbrüchen bei der Reifung von antikörperproduzierenden Zellen (Schrader et al. 2005) oder durch Topoisomerasen bei der Replikation (Degrassi et al. 2004). Der Großteil solcher Veränderungen entsteht jedoch nicht als notwendiges oder vorgesehenes Ereignis, sondern ist als Grundlage von Mutationen potenziell für die Zelle oder den Gesamtorganismus bedrohlich und stellt daher einen DNA-Schaden dar (Lindahl und Nyberg 1974; Nakamura et al. 1998; Rydberg und Lindahl 1982). DNA-Schäden können sowohl exogen, d. h. durch äußere Einflüsse auf die DNA, z. B. Strahlung oder mutagene Chemikalien, als auch endogen, z. B. durch Stoffwechselprodukte, entstehen (Friedberg 2006). Die Induktion von Zelltod über die exogene Auslösung von DNA-Strangbrüchen stellt den Hauptmechanismus der Wirkung moderner anti-tumoraler Therapien, wie Bestrahlung oder Chemotherapeutika, dar. Dabei haben die einzelnen Therapiemodalitäten unterschiedliche Ansatzpunkte an der DNA und führen so, z. B. wie das in der Glioblastom-Therapie eingesetzte Temodal®, zur Veränderung einzelner Basen.

Die DNA-Interkalation von Zytostatika stellte eine nicht kovalente Wechselwirkung dar und es kommt durch Einlagerung zwischen benachbarten Basenpaaren zur Vergrößerung der DNA-Helix-Struktur. Dieser energetisch günstige Prozess verläuft spontan. Die Watson-Crick-Wasserstoffbrücken werden dabei nicht gestört, aber durch Entwinden der DNA an der

Bindungsstelle wird die reguläre helikale Struktur verändert und als dessen Folge die Funktion der DNA-bindenden Enzyme, wie DNA-Polymerasen und Topoisomerasen, beeinflusst.

Durch Bestrahlung mit ionisierender Strahlung (Röntgen- oder γ -Strahlen) wiederum kommt es zu einer Vielzahl von Veränderungen der DNA. Sie geben beim Eindringen in Zellen und Geweben Energie ab. Die Wirkung auf Bestandteile der Zelle kann direkt sein, wenn Strahlen unmittelbar auf ein Makromolekül wie die DNA treffen, oder indirekt, wenn sie zuerst mit Wassermolekülen in der Zelle reagieren und Hydroxyl-Radikale bilden (Friedberg 2006). Ionisierende Strahlung kann direkt zu Einzel- oder Doppelstrangbrüchen führen (Lobrich et al. 1996). Aber auch neue kovalente Verknüpfungen können entstehen, etwa zwischen Nukleotiden in den komplementären DNA-Strängen (*cross links*). Die durch ionisierende Strahlung verursachten Veränderungen treten in höchst unterschiedlichem Maße auf, wobei vor allem die Auslösung von DNA-Doppelstrangbrüchen die letale Wirkung auf die Zellen ausübt (Ward JF 1988).

Die vermehrte Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen nach zytotoxischer Behandlung stellt somit einen Resistenzmechanismus der Tumorzellen dar und die relevanten DNA-Reparaturmechanismen sollen im Folgenden kurz beschrieben werden.

1.2.1 DNA-Reparaturmechanismen

DNA-Reparaturmechanismen kann man grob in drei Bereiche unterteilen. Zunächst gibt es Mechanismen, die den entstandenen Schaden direkt rückgängig machen, wie dies beispielsweise durch DNA-Photolyasen oder die O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase geschieht. Einer weiteren Gruppe von Mechanismen – wie der Nukleotid-Exzisionsreparatur oder der Basen-Exzisionsreparatur – ist gemein, dass sie die schadhafte Stelle und teilweise ihre direkte Umgebung aus dem betroffenen Strang herausschneidet und ersetzt. Darüber hinaus gibt es eine Gruppe von Reparaturmechanismen, die Strangbrüche repariert. Eine weitere Methode von Zellen, mit DNA-Schäden zu verfahren, ist die sogenannte Schadenstoleranz. Darunter versteht man Mechanismen, die DNA-Schäden bei der Transkription und Replikation zu überspringen helfen und so unter Inkaufnahme von Basenfehlpaarungen einen etwaigen Block an der betreffenden Stelle übergehen (Friedberg 2006).

1.2.1.1 Reparatur von DNA-Strangbrüchen

Ionisierende Strahlung kann wie bereits beschrieben direkt zu Einzel- oder Doppelstrangbrüchen führen.

Für die Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen (SSB für „*single-strand break*“) ist von Bedeutung, dass der nicht unterbrochene Strang zum einen den unterbrochenen Strang in Position hält und zum anderen gleichzeitig als Matrize für die Synthese etwaig fehlender

Basen fungieren kann. Tritt ein SSB auf, so kommt es nach erfolgter Erkennung der Läsion durch RPA (*replication protein A*) zur Phosphorylierung der ATR-Kinase, welche wiederum eine Reihe von Reparaturproteinen sowie für die Zellzykluskontrolle (Chk1) verantwortliche Proteine aktiviert (siehe Abb. 3).

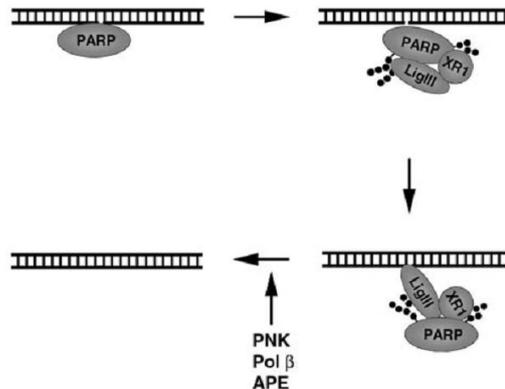


Abb. 3: Schema der Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen durch PARP-1 und die DNA-Ligase III-XRCC1 (aus Leppard et al. 2003; 5926). Die Bindung von PARP-1 an einen DNA-Einzelstrangbruch aktiviert die PARP-1's Polymerase, welche in einer Automodifikation zu poly-ADP-ribosylierter PARP-1 und Dissoziation vom Strangbruch resultiert. Der DNA-Ligase III (LigIII)-XRCC1 (XR1)-Komplex bindet an die poly-ADP-ribosylierte PARP-1 in der Nähe des DNA-Strangbruches und über die DNA-Ligase III kommt es zu einer spezifischen Bindung an diesen. Weitere Reparaturfaktoren wie die Polynukleotid-Kinase (PNK), Pol β und die AP-Endonuklease (APE), welche beschädigte DNA-Enden prozessieren, werden durch Interaktion mit XRCC1 rekrutiert. Nach der Bildung bindungsfähiger Enden werden die Enden durch die DNA-Ligase III wieder verbunden.

DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) besitzen sowohl ein hohes genotoxisches als auch zytotoxisches Potenzial (Dikomey et al. 1998; Lips und Kaina 2001).

DSBs werden abhängig von der Zellzyklusphase durch zwei verschiedene Reparaturwege prozessiert. In niederen Eukaryoten stellt die Homologe Rekombination (HR) den Hauptweg der Reparatur dar und läuft in allen Zellzyklusphasen ab (Wyman et al. 2004). In höher entwickelten Eukaryoten unterscheidet sich der Reparaturweg innerhalb der Zellzyklusphasen. Die HR kann nur bei Vorlage homologer Sequenzen wie den Schwesterchromatiden stattfinden. Daher ist die HR auf die S- und die G2-Phase beschränkt (Friedberg 2006). Das *Non-Homologous-End Joining* (NHEJ) ist dagegen im gesamten Zellzyklus verfügbar. Es dominiert jedoch in der G1- und G2-Phase (Cromie et al. 2001; Haber 2000) (genaue Mechanismen siehe Abb. 4).

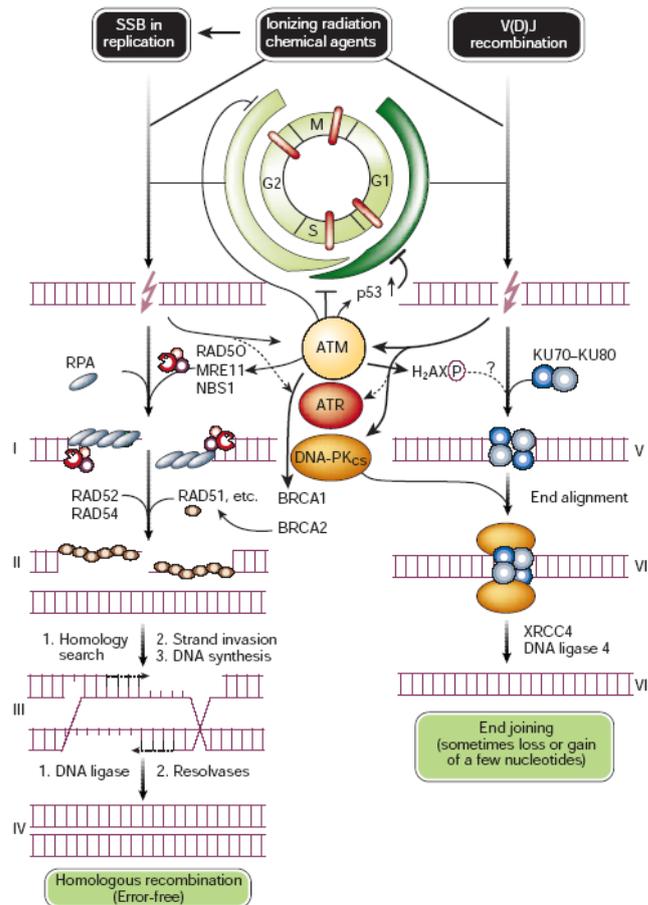


Abb. 4 : Übersicht über HR (links) und NHEJ (rechts) (aus Hoeijmakers 2001; 371).

Ein DSB ist unter bestimmten Bedingungen auch potenzieller Auslöser eines Zellzyklusarrests oder von Apoptose (Jackson 2001). Einige Proteine wie z. B. ATM überwachen die Balance zwischen Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur und Apoptose in der Zelle (Bernstein et al. 2002; Dasika et al. 1999). So phosphoryliert ATM über die Effektor kinase *Checkpoint* Kinase 2 (Chk 2) den Transkriptionsfaktor p53, der dann eine Reihe von Genen (unter anderem das für p21) aktiviert. Das p21-Protein wiederum spielt eine Schlüsselrolle in der Zellzyklusregulation, da es den Eintritt von Zellen in die S-Phase hemmt und die DNA so verstärkt präreplikativ repariert werden kann. Chk 2 führt wiederum über Cyclin-abhängige Phosphatasen zu einer Zellzyklusprogression (Frosina 2009). Ist die DNA-Schädigung sehr stark, so erfolgt über p53 eine Aktivierung der Apoptose über verstärkte Expression des Fas-Rezeptors.

1.2.2 H2AX als molekularer Marker des aktivierten DNA-Schadensreparaturweges

Die DNA-DSB-Schadensantwort muss schnell und präzise sein. Dies wird durch die Seronin-Threonin-Kinase ATM (*Ataxia Teleangiectasia Mutated*) gewährleistet. Dieses nukleäre Protein fungiert als Hauptsignalüberträger der DNA-DSB-Schadensantwort. ATM ist ein Mitglied der Phosphatidylinositol-3-Kinase-ähnlichen Kinasen (PIKK), zu denen weitere

Proteine, die für die genomische Stabilität verantwortlich sind, gehören (Shiloh 2003). Die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung oder anderen DNA-DSB induzierenden Agenzien triggert einen sofortigen Anstieg der ATM-Kinase-Aktivität. Dies geschieht durch Autophosphorylierung des Serin-Restes an Position 1981, wodurch es zur Dissoziation des inaktiven ATM-Komplexes zu katalytisch aktiven ATM-Monomeren kommt (Bakkenist und Kastan 2003). Eine Voraussetzung für diese Autophosphorylierung scheint die Bindung des MRN-Komplexes (bestehend aus Mre11-Rad50 und NBS1), der die gespaltenen DNA-Enden erkennt, zu sein (Lee JH und Paull 2005). Phosphoryliertes ATM führt so zu einer Reihe von Aktivierungen, wie die bereits beschriebene Aktivierung von Zellzyklusarrest und Apoptose (Goodarzi et al. 2008). Eine dabei wichtige Phosphorylierung ereignet sich an der Histonvariante H2AX, wodurch die Zugänglichkeit anderer Reparaturproteine an die geschädigte DNA ermöglicht und die Weiterleitung des Schadenssignals in der Zelle unterstützt wird.

Die an Serin 139 phosphorylierte Form von H2AX wird in der Literatur als γ -H2AX, in einigen Veröffentlichungen auch als H2AXS139ph oder phospho-H2AX, bezeichnet (Foster und Downs 2005; Pilch et al. 2003; Rogakou et al. 1999; Rogakou et al. 2000; Ward IM und Chen J 2001). Im Folgenden wird die üblichere Bezeichnung γ -H2AX verwendet. H2AX macht etwa zehn Prozent der H2A-Population innerhalb des Chromatins aus und scheint innerhalb des Chromatins gleichmäßig verbreitet zu sein (Mannironi et al. 1989). Entsteht in einem DNA-Strang ein Doppelstrangbruch, so werden innerhalb einiger Minuten mit einem maximalen Anstieg nach 30 bis 60 Minuten mehrere Tausend H2AX-Proteine zu γ -H2AX phosphoryliert (Pilch et al. 2003; Rogakou et al. 1998; Rothkamm und Lobrich 2003; Takahashi und Ohnishi 2005). Dabei scheint die Phosphorylierung in der unmittelbaren Umgebung des Strangbruches initiiert zu werden und sich dann radial auszubreiten, sodass schließlich H2AX-Moleküle bis zu einigen Megabasen Entfernung von dem Strangbruch phosphoryliert werden (Rogakou et al. 1999). γ -H2AX bildet zusammen mit Reparaturproteinen und Proteinen, welche im Zellzyklus als Checkpoint-Proteine fungieren, nachweisbare Komplexe in Form nukleärer Foki.

Die Quantifizierung von γ -H2AX hat sich als verlässlicher Marker der DNA-Reparatur-Kapazität von Zellen erwiesen (Fernandez-Capetillo et al. 2003).

1.2.3 Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen

DNA-Doppelstrangbrüche können durch eine Reihe von Methoden quantifiziert werden. Zu diesen gehören der neutrale Comet-Assay (Fairbairn et al. 1995), die Pulsfeldgelelektrophorese (Whitaker et al. 1991) oder die TUNEL-Methode (Hewitson et al. 2006). All diese Methoden sind nicht sehr sensitiv im Bereich von wenigen Doppelstrangbrüchen pro Zelle. So liegt die Grenze, ab der Doppelstrangbrüche sicher vom

Hintergrund unterschieden werden können, beim neutralen Comet-Assay bei einer Strahlendosis von etwa 4 Gy (Lobrich und Kiefer 2006). Bei dieser Strahlendosis werden pro Zelle bereits etwa 160 DNA-Doppelstrangbrüche verursacht (Friedberg 2006). Durch die Arbeiten von Rothkamm und Lobrich 2003 konnte gezeigt werden, dass eine Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch Darstellung von γ -H2AX-Foki mittels Immunfluoreszenz möglich ist. Dabei stimmen die darstellbaren Foki nach Bestrahlung mit ionisierender Photonenstrahlung und nach Bestrahlung mit schweren Ionen sowohl mit der erwarteten Anzahl als auch mit dem erwarteten Ort der DNA-Doppelstrangbrüche überein (Jakob et al. 2003; Lobrich und Kiefer 2006; Rothkamm und Lobrich 2003). Diese Methode zur Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen ist sensitiv genug, um bereits im mGy-Bereich DNA-Doppelstrangbrüche zu detektieren. In diesem Bereich liegt die Zahl der zu erwartenden DNA-Doppelstrangbrüche bei etwa 0,05 pro bestrahltem Zellkern (Lobrich und Kiefer 2006; Rothkamm und Lobrich 2003; Ward JF 1988). Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode verwendet, um DNA-Schäden nach Einwirkung ionisierender Strahlung zu beurteilen.

1.3 Fragestellung

Neueste Erkenntnisse auf dem Gebiet der Grundlagenforschung liefern den Beweis, dass die NSCs der Ursprung der Plastizität und Reparaturfähigkeit des maturaen Gehirns sind. Sie konnten zeigen, dass NSCs und Tumor-initiiierende Zellen (BTISCs) viele phänotypische Merkmale teilen. Betrachtet man unser derzeitiges Wissen dieser distinktiven Zellpopulationen, müssen wir feststellen, dass noch viele Fragen bezüglich ihrer biologischen Eigenschaften bestehen. Dies resultiert aus der Tatsache, dass die heute angewandten Behandlungsstrategien gegen die BTISCs wahrscheinlich auch die NSCs beeinflussen und es so zu einer ZNS-Funktionsbeeinträchtigung als Langzeitfolge der zytotoxischen Behandlung kommt. Des Weiteren konnten bisher nur unwesentliche Fortschritte in der Behandlung von GBM erzielt werden, was vor allem auf die seit kurzem bekannte außergewöhnliche Radio- und Chemoresistenz der BTISCs zurückzuführen ist.

Therapeutischer Fortschritt kann entweder durch Limitierung Behandlungs-assoziiierter Toxizität erreicht werden oder – da GBM selten Fernmetastasen bildet – durch Verbesserung der lokalen Tumorkontrolle. Die Kombination beider Ziele wäre dabei wünschenswert.

Die derzeit effektivste Behandlungsmodalität für Patienten mit GBM stellt die Radiotherapie dar. Zahlreiche Ansätze zur Verbesserung der Wirksamkeit der Radiotherapie existieren, wobei die adjuvante und konkomitante Temozolomidgabe derzeit die einzig effektive Kombinationstherapie darstellt. Jedoch profitiert nur etwa die Hälfte der Patienten von einer TMZ-Therapie, da diese Methylierungen in der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) voraussetzt.

Chloroquin hat in ersten Versuchen eine extensive Toxizität gegen eine Vielzahl solider Tumoren, wie beim Kolon- (Zheng et al. 2009) oder Bronchialkarzinom (Fan et al. 2006), sowie in der klinischen Anwendung beim GBM gezeigt (Sotelo et al. 2006). Bereits publizierte Daten zeigen, dass die Aktivierung des p53-Signalweges ein Mechanismus des CLQ-medierten anti-tumoralen Effektes bei GBM ist (Kim EL et al. 2010). Ob CLQ auch p53-unabhängige zytotoxische Wirkungen hat, ist derzeit nicht bekannt. Ebenso wenig ist bekannt, ob die GBM-Tumorstammzellen sensibel auf die CLQ-Gabe reagieren. Die Auseinandersetzung mit dieser Fragestellung galt als Zielsetzung dieser Arbeit. Wir widmeten uns speziell folgenden Themen:

1. Wirkt CLQ auch gegen Gliomzellen mit mutiertem TP53-Gen?
2. Wirkt CLQ auch gegen Gliomzellen mit Stammzell-Eigenschaften, den sogenannten BTISCs?
3. Unterscheidet sich die Wirkung von CLQ bei der alleinigen Anwendung gegenüber der Kombination mit Bestrahlung?
4. Sind DNA-assoziierte Aspekte von CLQ auch für die neoplastische Wirkungsweise verantwortlich?

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden bei 37 °C in einem Inkubator (Forma Scientific, Marietta, USA) unter einer fünfprozentigen CO₂-Atmosphäre und bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 Prozent kultiviert. Alle Arbeiten der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Werkbank mit laminärer Strömung (Baker Company, Sanford, USA) durchgeführt, um eine mikrobielle Kontamination zu vermeiden.

2.1.1 Zelllinien und Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendete, aus humanem Glioblastom stammende Zelllinie G112 wurde im Neuroonkologischen Labor des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf etabliert. Sie zeigen ein typisches adhärentes Wachstumsmuster und bilden fest auf dem Untergrund haftende netzartige Strukturen. Die Zellen zeigen exponentielles Wachstum mit einer Kolonieverdopplungszeit alle fünf bis sieben Tage in *Eagles Minimum Essential Medium* (EMEM) (Gibco, Rockville USA).

Im Neuroonkologischen Labor des Universitätsklinikums Göttingen unter Leitung von Frau Dr. rer. nat. habil. Ella Kim wurde aus der Gliomzelllinie G112 (Westphal et al. 1994) eine Subpopulation G112-BTISC mit stammzellähnlichen Attributen isoliert. Dies erfolgte durch Sub-Kultivierung in serumfreiem Medium, welches im Gegensatz zu Gliomzellen ohne Stammzeleigenschaften stimulierend auf das Wachstum dieser distinktiven Sub-Kultur wirkt (Galli et al. 2004). Die Zellen werden aufgrund ihrer Fähigkeit zur Initiierung von malignen Glioblastomen nach Implantation in Gehirne immunsupprimierter Mäuse (NMRI, Charles River) als BTISCs (*Brain Tumour Initiating Stem-like Cells*) bezeichnet. BTISCs sind im Gegensatz zu normalen Glioblastom-Linien in der Lage, unter Minimalbedingungen, das bedeutet, nur supplementiert mit den Wachstumsfaktoren *Epidermal Growth Factor* (EGF) und *Fibroblast Growth Factor* (FGF), als Neurosphären zu wachsen. Die Wachstumsdauer, welche zur Bildung von klonalen Neurosphären mit einem Durchmesser von durchschnittlich 100 µm benötigt wird, beträgt ca. 14 bis 21 Tage. Bei der selektierten Sub-Linie G112-BTISC konnten diverse weitere stammzellähnliche Eigenschaften nachgewiesen werden. Sie besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung nach Vereinzelnung des Neurosphärenverbandes und als weiteres Merkmal die Expression der für Stammzellen typischen Oberflächenantigene CD133, Nestin und Vimentin.

Als zweite Zelllinie wurde in dieser Arbeit eine nach wiederholter Bestrahlung selektierte Subpopulation der Tumorstammzelllinie G112-BTISC namens G112-BTISC-rad verwendet.

Sie zeigt ebenfalls die zuvor beschriebenen Stammzellmerkmale, wie Wachstum als Neurosphären und Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Darüber hinaus zeigt sie nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung als Zeichen ihrer Radioresistenz ein vermehrtes Wachstum.

Zur Markierung der Zellen, die DNA-Reparatur betreiben, wurde der monoklonale Kaninchen-Antikörper gegen aktiviertes H2AX, das an der Aminosäure Ser139 phosphoryliert ist (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA), verwendet. Zur Markierung des Zytoskelettes der Gliomzellen verwendeten wir anti-Nestin (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA), einen monoklonalen IgG-Antikörper aus Mäusen, der das Intermediärfilament Nestin, ein spezifisches Oberflächenantigen neuronaler Stammzellen, markiert.

Als sekundäre Antikörper dienten Alexa Fluor 555 (Molecular probes, Karlsruhe) als anti-Kaninchen-Antikörper sowie FITC (Dako, Glostrup, Dänemark) als anti-Maus-Antikörper.

2.1.2 Zellkulturmedien und Medienzusätze

Adhärenz G112Gliomzellen wurden in EMEM kultiviert. Dabei wurden dem EMEM zehn Prozent FCS (Gibco, Rockville, USA) und 5 ml 100x Natriumpyruvat und 5 ml L-Glutamin (Gibco, Rockville, USA) beigefügt. Als Neurosphären-Kulturmedium für die BTISC-ähnliche Kultur G112-BTISC verwendeten wir serumfreies Neurobasal-Medium (Gibco, Rockville, USA), das mit B27 (Gibco, Rockville, USA), EGF (20 ng/ml; Gibco, Rockville, USA) und FGF (10 ng/ml; Gibco, Rockville, USA) versetzt wurde.

2.1.3 Passagierung von Zellen

Die Zelllinien wurden in 25-cm²-Gewebekulturflaschen kultiviert, wobei sie bei Erreichen von einer achtzigprozentigen Konfluenz nach vier bis fünf Tagen passagiert wurden. Die Zellen wurden wie folgt passagiert: Nach Absaugen des verbrauchten Mediums wurden verbliebenes Medium und Zellreste durch zweimaliges Waschen der Zellschicht mit PBS-Puffer entfernt. Zum proteolytischen Ablösen der adhärenz Zellen wurden diese mit Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco, Rockville, USA) überschichtet und für fünf bis zehn Minuten bei 37 °C inkubiert. Wenn unter mikroskopischer Kontrolle ein Abrunden der Zellen sichtbar wurde, konnten die Zellen durch Klopfen abgelöst, in frischem Medium aufgenommen und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren dispergiert werden. Für routinemäßiges Subkultivieren wurden die Zellen in einer 1:5- bis 1:10-Verdünnung in neue Zellkulturgefäße überführt.

Das Umsetzen der Neurosphären-Kultur G112-BTISC erfolgte nach dem gleichen Prinzip alle 14 bis 21 Tage. Um Zellverlust zu vermeiden, da diese Zellen nicht auf ihrer Unterlage haften, erfolgte zunächst die Transferierung der Zellen in Eppendorf-Gefäße. Nach Zentrifugation sammelten sich die Zellen als Pellet am Boden des Eppendorf-Gefäßes. Das

alte Medium konnte mithilfe einer Pipette abgesaugt und die Zellen anschließend mit Trypsin vereinzelt werden. Die so gewonnenen Einzelzellen wurden dann in definierten Zellzahlen zwischen 1×10^4 und $1,5 \times 10^5$ Millionen in neue 25-cm^2 - bzw. 75-cm^2 -Kulturflaschen umgesetzt.

2.1.4 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Zellzahl wurde mithilfe einer Neubauer *improved*® Zählkammer unter dem Inversmikroskop (Zeiss AG, Feldbach, Schweiz) bestimmt. Dazu wurde aus einer suspendierten und entsprechend verdünnten Zellkultur steril ein Aliquot von ca. $20\ \mu\text{l}$ entnommen und 1:1 mit Trypanblau (Serva GmbH, Heidelberg) gemischt und bei aufgelegtem Deckglas seitlich in die Zählkammer pipettiert. Bei lebenden Zellen ist die Zellwand intakt und somit nimmt diese Zelle diesen Farbstoff nicht auf und erscheint im Gegenlicht des Mikroskops heller als tote Zellen.

Unter dem Mikroskop wurden vier Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert errechnet. Da ein Großquadrat eine Fläche von $1\ \text{mm}^2$ und bei plan aufliegendem Deckglas eine Kammerhöhe von $0,1\ \text{mm}$ hat, ergibt sich ein Rauminhalt von $0,1\ \text{mm}^3$. Zur Berechnung der Zellzahl pro Milliliter wird der Mittelwert der Zellzahl mit 10^4 und dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

2.1.5 Beschichtung von Deckgläschen und Lochplatten mit Ornithin

Für sämtliche Experimente musste die Neurosphärenkultur G112-BTISC zunächst durch Beschichtung der Platten zur Adhärenz gebracht werden. Dazu wurde in jede Vertiefung der Platten $1\ \text{ml}$ fertig gelöste Poly-L-Ornithin-Lösung in der Konzentration von $15\ \mu\text{g/ml}$ in steriler Phosphat-Pufferlösung (PBS) (Gibco, Rockville USA) pipettiert und über Nacht bei $37\ ^\circ\text{C}$ inkubiert. Zur Beschichtung von Deckgläschen für die immunfluoreszente Färbung wurden vor Zugabe von $0,5\ \text{ml}$ Poly-L-Ornithin-Lösung sterile Deckgläschen in die Vertiefungen von 24-Lochplatten verteilt.

Die Platten wurden am darauf folgenden Tag dreimal mit sterilem PBS gewaschen und über Nacht bei $37\ ^\circ\text{C}$ inkubiert. Dieses Prozedere wurde ein weiteres Mal wiederholt und die Platten nach dem dritten Waschschrift mit Klebeband abgeklebt und bei $+4\ ^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

2.1.6 Bereitstellung von Chloroquin

Das Chloroquin wurde in Form des Chloroquin-Diphosphat (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) verwendet und für jede Behandlung frisch angefertigt. Bei einer molaren Masse des Moleküls von $515,90\ \text{g/mol}^{-1}$ wurden zur Herstellung einer 1000fach konzentrierten Lösung $80\ \text{mg}$ abgewogen und in $5\ \text{ml}$ destilliertem Wasser suspendiert. Zur Ausbildung einer makroskopisch homogenen Verteilung wurde die Lösung auf der höchsten Stufe des Vortex-Schüttelmixers (Neolab, Heidelberg) durchmischt. Anschließend wurde die Flüssigkeit mit

einer Spritze aufgezogen und steril durch einen Porenfilter in ein steriles Falcon-Röhrchen (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) abgepresst, luftdicht verschlossen und zum Schutz vor Lichteinstrahlung mit Alufolie umwickelt.

Um eine Chloroquin-Konzentration von 40 µg/ml Medium zu erhalten, wurden 60 ml EMEM mit 60 µl der 1000fach konzentrierten Lösung versetzt und abermals auf der höchsten Stufe des Vortex-Schüttelmixers durchmischt. 20 ml dieser Suspension wurden mit der gleichen Menge an Medium verdünnt und durchmischt, um 20 µg/ml Chloroquin-Lösung zu erhalten. So erfolgte in weiteren Schritten die Herstellung aller benötigten Konzentrationen.

2.1.7 Bestrahlung von Zellen mit ionisierender Strahlung

Für Experimente, bei denen eine Bestrahlung der Zellen mit ionisierender Strahlung (IR) vorgesehen war, wurden die Zellen in einem Röntgenapparat (Abteilung für Strahlentherapie und Radioonkologie, Universitätsmedizin Göttingen) mit ⁶⁰Co-Quelle mit einer Dosisleistung von 1 Gy/min bei Raumtemperatur bestrahlt. Die Bestrahlung fand unter Rotation zur Vermeidung von Ungleichmäßigkeiten bei der Strahlungsverteilung statt. Damit etwaige Einflüsse durch Transport und Temperaturabsenkung von 37 °C auf RT (durch Entnahme aus dem Brutschrank) nicht zu Unterschieden zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben führen können, wurden die unbestrahlten Kontrollproben ebenfalls mit an die Bestrahlungsplätze transportiert.

2.2 Untersuchung der Zellproliferation

Das In-vitro-Wachstum von G112-Zellen spiegelt die Möglichkeit der Untersuchung des Effektes von Chloroquin auf Glioblastom-Zellen wider. Wir wählten verschiedene Methoden zur Bestimmung der Zellproliferation: Wachstumskurven für adhärent wachsende G112-Zellen in serumhaltigen (MEM) und serumfreien (NB) Medien sowie den Neurosphären-Assay zur Untersuchung des Wachstums der frei schwebenden Neurosphärenkultur G112-BTISC. Durch die Anwendung von verschiedenen Kulturbedingungen konnten wir zum einen biologische Störfaktoren auf die Ergebnisse ausschließen. Gleichzeitig bot sich mit dem Neurosphären-Assay die Möglichkeit des Nachweises stammzellähnlicher Attribute von G112-BTISC-Zellen, da als eine Fähigkeit von BTISCs die Formation von Neurosphären unter Minimalbedingungen gilt. Des Weiteren hat man so die Möglichkeit, die in vivo in GBM vorkommende Tumorzellkonfirmation zu untersuchen.

Die Zellproliferationsexperimente wurden anhand des etablierten Protokolls durchgeführt, bei welchem bereits eine Sensibilität der konventionellen Serum-benötigenden Gliomzelllinien für Chloroquin-Konzentrationen zwischen 10 und 40 µg/ml Chloroquin (Kim EL et al. 2010) und eine Strahlensensibilität zwischen 2,5 und 10 Gy nachgewiesen werden konnte (Schauff et al. 2009). Wir übernahmen dieses etablierte Protokoll und legten die

Chloroquinkonzentration (2,5–20 µg/ml) und die Bestrahlung auf die geringst mögliche effektive Dosis von 2,5 Gy fest.

2.2.1 Wachstumskurven-Assay

Die adhärent wachsenden G112-Zellen wurden in Einzelzellsuspension disaggregiert und die Zellzahl, wie bereits beschrieben, bestimmt. Dann wurden die Zellen in der Dichte von $2,5 \times 10^3$ Zellen pro Vertiefung in Poly-L-Ornithin-behandelte 96-Lochplatten ausgesät, welche serumhaltiges MEM oder serumfreies NB *complete* Medium enthielten.

Als Behandlung erfolgte 48 Stunden später die Zugabe von Chloroquin-Diphosphat in Konzentrationen zwischen 2,5 µg, 5 µg, 10 µg, 15 µg und 20 µg/ml verdünnt im jeweiligen Medium (MEM oder Nb *complete*). Dabei wurden engere Intervalle bei den Konzentrationen unter 10 µg gewählt, da wir dort die effektive Konzentration erwarteten.

Vier Stunden nach Chloroquinzugabe und somit von uns erwarteter erfolgter Interkalation von Chloroquin in die DNA der Gliomzellen erfolgte die Bestrahlung der Hälfte der Platten mit 2,5 Gy ionisierender Strahlung, sodass wir für die oben genannte Chloroquinkonzentration eine unbestrahlte und eine bestrahlte Kondition erhielten.

Nach 24 Stunden Inkubation der Zellen mit Chloroquin wurden die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und mit frischem Medium wieder aufgefüllt. Es folgte nun die Fixierung je einer Reihe der 96-Lochplatte alle 24 Stunden an acht konsekutiven Tagen. Dazu wurden jeweils vier Replikate pro Kondition für 15 Minuten bei Raumtemperatur in dreiprozentigem Glutaraldehyd fixiert. Die Fixierung wurde unter der Werkbank bei geöffneten Platten durchgeführt. Um eine Intoxikation unfixierter Zellen mit Glutaraldehyd zu vermeiden, wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen.

Nach acht Tagen erfolgte die Zellfärbung aller fixierter Reihen mit 100 µl 0,1-prozentigem Kristallviolett (Merck KGaA, Darmstadt) für 30 Minuten. Die Zellen wurden erneut mit PBS gespült, luftgetrocknet und in einprozentigem Natriumlaurylsulfat (SDS, Sodium Dodecyl Sulfate)-Lösungspuffer gelöst. Die Absorption zur Bestimmung des Proteingehaltes im Zelllysat wurde bei einer Wellenlänge von 562 nm mithilfe eines Spektrometers (Tecan AG, Männedorf, Schweiz) bestimmt.

2.2.2 Neurosphären-Assay

G112-BTISC-Zellen wurden zunächst in der Konzentration von $2,5 \times 10^4$ /ml NB Medium in 25- cm²-Flaschen ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von Chloroquin-Diphosphat in Konzentrationen zwischen 2,5 und 7,5 µg/ml zu den Zellen. Vier Stunden nach Chloroquin-Behandlung bestrahlten wir je eine 25-cm²-Flasche pro Chloroquinkonzentration mit ionisierender Strahlung, um so bestrahlte Zellen, die mit verschiedenen Chloroquinkonzentrationen vorbehandelt waren, zu erhalten. 14 bis 21 Tage nach Ansetzen der Flaschen wurde diese auf die Bildung von Neurosphärenkolonien mit

einer entsprechenden Mindestgröße von 100 µm Durchmesser überprüft und mithilfe einer Rasterfolie zur späteren Auswertung unter dem Mikroskop bei 2,5facher Vergrößerung fotografiert. Zur Auswertung der Bilder verwendeten wir Image J Software (entwickelt von Wayne Rasband, NIH, Bethesda, MD National Health Institute, USA). Jeder Versuch wurde pro Zelllinie dreimal durchgeführt und die Mittelwerte der Einzelversuche wurden zur Auswertung verwendet.

2.3 DNA-Reparatur-Reporter-Assay

Die DNA-Reparatur-Kapazität von Zellen kann durch einfache Methoden durch die Verwendung von Reporter-Genen quantifiziert werden. Es handelt sich hierbei um Gene oder Gen-Fragmente, die mit anderen Genen gekoppelt werden, um deren Aktivitäten nachweisbar zu machen. Der Vorteil ihrer Verwendung liegt darin, dass ihre Expression einfach, schnell und ohne Verwendung von radioaktiv-markierten Substanzen quantifiziert werden kann (Qiao et al. 2002).

Direkte Investigation von DNA-Reparatur-Systemen ist möglich, indem Zellen mit Plasmiden, die einen Doppelstrangbruch (DSB) im Firefly-Luciferase-Gen haben, transfiziert werden. Das Firefly-Luciferase-Gen kann nur exprimiert werden, wenn die Zellen in der Lage sind, den Bruch zu reparieren und die Integrität des Firefly-Luciferase-Gens wiederherzustellen.

Für die Reporter-Gen-Analysen wurde das Dual-LuciferaseTM Reporter-Assay System Kit (Promega, Madison, USA) verwendet. In einer zweistufigen Reaktion wird Luciferin durch Katalyse mit Luciferase sowie unter Verbrauch von ATP und Sauerstoff zu Oxyluciferin oxidiert (Abb. 5). Bei dieser Reaktion werden Photonen im sichtbaren Spektralbereich abgestrahlt (Chemolumineszenz).

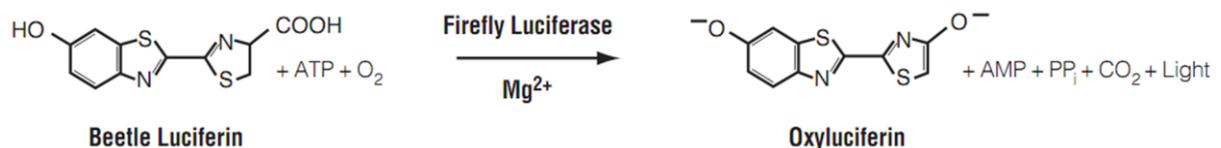


Abb. 5: Prinzip des Luciferase-Assay (Promega Corporation 2011; 3)

Diese Lichtemission kann im Luminometer als Lichtemissionen pro Sekunde (*relative light units*) gemessen werden. Die Chemolumineszenz tritt sofort zu Beginn der Reaktion auf und ist nur von sehr kurzer Dauer. Nach einer Minute kann nur noch zehn Prozent der Anfangsaktivität gemessen werden.

Zur Messung der Transfektionseffizienz wird beim Dualen-Luciferase-System ein weiteres Luciferase-Enzym, die Renilla-Luciferase, verwendet. Die Chemolumineszenz entsteht durch die Reaktion von Coelenterazin mit Sauerstoff durch die Katalyse von Renilla-Luciferase. Beide Enzyme, Firefly- und Renilla-Luciferase, sind getrennt messbar.

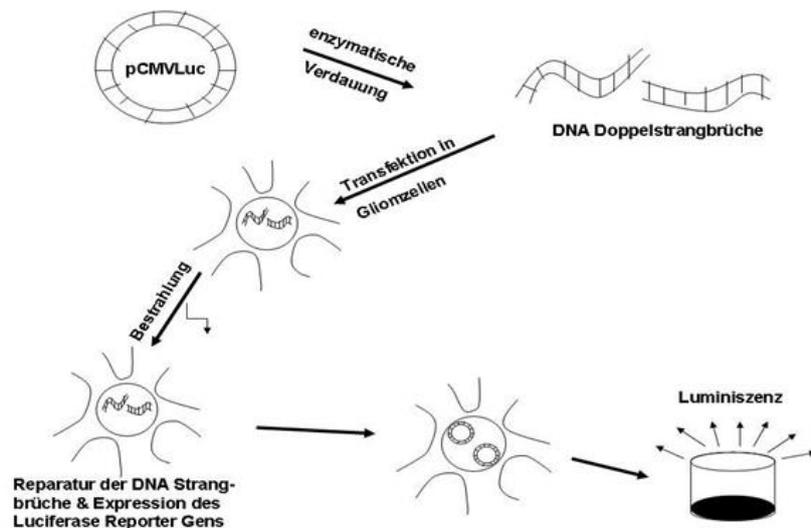


Abb. 6: Schema des DNA-Reparatur-Reporter-Assay: Das Reporter-Gen-Plasmid pCMV Luc-sc wird linearisiert durch Verdauung durch das Enzym Ehe1. Es resultieren DNA-Doppelstrangbrüche. Beschädigte Plasmid-DNA pCMV Luc-L wird in G112-Zellen transfiziert und Zellen werden 24 Stunden nach Transfektion bestrahlt. Die zelluläre Reparatur-Kapazität wird nach 48 Stunden durch Erholung der Reporter-Gen-Expression indirekt als Enzym-Aktivität des Firefly-Luciferase-Reporter-Gens gemessen (Abbildung Adaptation aus Thoms et al. 2007; 3).

2.3.1 Vektoren und Plasmide

Die in dieser Arbeit zur Transfektion verwendeten Plasmide wurden uns von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. S. Emmert (Abteilung für Dermatologie und Venerologie, Universitätsmedizin Göttingen) zur Verfügung gestellt: zum einen der Plasmid pCMV Luc, der das Gen für die Expression von Firefly-Luciferase enthält, zum anderen der Kontroll-Plasmid pRL-CMV, mit dem Gen für die Expression von Renilla-Luciferase. Zur Kontrolle der Transfektion enthalten sie einen CMV-Promoter (Abb. 6).

2.3.2 Transiente Transfektion

Transfektion ist die generelle Bezeichnung für Verfahren zur Einschleusung von DNA in Zellen. Von transienter Transfektion spricht man, wenn die in die Wirtszellen eingeschleusten Gene nur vorübergehend vorhanden sind und im Verlaufe weiterer Zellteilungen wieder verlorengehen. Die eingeschleuste DNA wird nicht in das Chromosom der Empfängerzelle eingebaut oder kann sich extrachromosomal nicht vermehren.

Die Transfektion der humanen Gliomzellen erfolgte mithilfe des Effectene™ Transfection Kit (Quiagen, Hilden). Zur Transfektion wurden humane Gliomzellen in ornithinisierten 6-Lochplatten in einer Dichte von 100.000 Zellen pro Vertiefung ausgesetzt und 48 Stunden inkubiert.

Es wurden zwei unterschiedliche Transfektionsansätze angesetzt. Ein Transfektionsansatz enthielt die Plasmide für die Firefly-Luciferase pCMV Luc in ungeschnittener (*supercoiled*) Form. Der zweite Ansatz enthielt die zuvor durch das Enzym Ehe1 (Fermentas, St. Leon-Rot) geschnittene (linearisierte) Form des Plasmides pCMV Luc. Beide Ansätze enthielten den Kontrollplasmid für die Renilla-Luciferase pRL-CMV.

Zur Herstellung der Ansätze wurde die jeweilige Menge an Plasmid-DNA (120 ng pCMV Luc, 30 ng pRL-CMV) mit 3,2 µl Enhancer® (Quiagen, Hilden) in 100 µl EC-Buffer® (Quiagen, Hilden) nach Vortexen fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl Effectene® (Quiagen, Hilden) wurde der Transfektionsansatz erneut gut durchmischt und fünf bis zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Ansätze mit frischem Medium versetzt und zur gleichmäßigen Verteilung unter vorsichtiger Bewegung der Platte zu den zwischenzeitlich zweimal mit PBS gewaschenen Zellen gegeben.

2.3.3 Bestimmung der Luciferase-Aktivität

Nach Entfernung des Zellkulturmediums wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 250 µl Passive Lysis Buffer® pro Loch der 6-Lochplatten zugegeben und gleichmäßig über die Zellen verteilt. Nach 15 Minuten Inkubationszeit erfolgte die Abnahme der lysierten Zellen vom Plastikboden mittels eines Zellschabers und das Zelllysate wurde in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße überführt. Alle Lysate wurden kurz durchmischt und 30 Sekunden bei 4 °C (13.000 U/min-1) zentrifugiert.

Für die eigentliche Bestimmung der Luciferase-Aktivität wurden je 20 µl der Zelllysate eingesetzt und in die Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte überführt. Die verbleibende Lysatmenge wurde bei -80 °C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt zur Proteinquantifizierung herangezogen.

Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte dann am automatischen GloMax™ 96 Microplate Luminometer (Promega, Madison, USA) im Labor der Abteilung für Dermatologie und Venerologie der Universitätsmedizin Göttingen und das Dual-Luciferase™ Reporter-Assay-System wurde, wie vom Hersteller angegeben, verwendet. Die Messzeit der Reporter-Gen-Aktivitäten betrug jeweils zehn Sekunden. Für weitere Berechnungen wurde die relative Luciferase-Aktivität (RLA) berechnet. Die RLA ist das Verhältnis der Firefly-Luciferase-Aktivität des jeweiligen Reporter-Gen-Konstrukts zu der Aktivität einer kotransfizierten Renilla-Luciferase.

Zur Optimierung der funktionellen DNA-Reparatur-Analyse für die G112-BTISC-Sub-Zelllinie ermittelten wir zunächst den optimalen Zeitpunkt der Messung sowie die benötigte Menge an Plasmid-DNA. Es zeigte sich, dass die Werte bei Lysierung und Messung 48 Stunden nach Transfektion deutlich über den erhaltenen Werten bei Messung 24 Stunden nach Transfektion lagen (1000fach erhöht), sodass davon ausgegangen werden kann, dass dies

die benötigte Zeitspanne für Einbau, Reparatur und Expression der Luciferase ist. Messungen bezüglich des Hintergrundleuchtens von Zellen und Medium sind aufgrund niedrigerer Werte vernachlässigbar und wurden hier nicht aufgeführt.

Zur Ermittlung der DNA-DSB-Reparatur-Kapazität wurde der pCMV Luc Plasmid zunächst mittels Spaltung innerhalb des Luciferase-Gens durch das Restriktionsenzym Ehe1 linearisiert. Wir transfizierten linearisiertes (pCMV Luc-L) oder ungeschnittenes Plasmid (pCMV Luc-sc) zusammen mit dem unbehandelten Renilla-Luciferase-Plasmid in die Zellen. Beim Renilla-Luciferase-Plasmid handelt es sich um einen Kontrollplasmid, der zum Ausgleich eventueller Schwankungen in der Transfektionseffizienz kotransfiziert wird. Danach setzten wir, um etwaige Differenzen in der Zellzahl auszugleichen, die erhaltene relative Konzentration an Firefly-Luciferase (Firefly-Luciferase/Renilla-Luciferase) zum jeweiligen Proteingehalt der Proben in Beziehung.

So kann die Reparatureffizienz der Zellen (entsprechend der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur) bestimmt werden

2.3.4 Proteinquantifizierung nach Bradford

Diese Methode basiert auf der Bindung von Proteinen an den Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Diese Bindung verursacht eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nach 595 nm, die photometrisch detektiert werden kann. Für die Messung werden jeweils 1 ml Bradford-Lösung (BioRad Inc., München) mit einem entsprechenden Aliquot (5–10 µl) der zu messenden Proteinlösung vermischt, fünf Minuten, bei RT inkubiert und anschließend die Absorption bei 595 nm im Spektralphotometer (LKB, Pharmacia) ermittelt. Als Referenz dient eine Eichkurve aus verschiedenen Konzentrationen von Rinderserumalbumin.

2.4 Immunfluoreszenz-Färbung

Um Proteine innerhalb einer Zelle zu lokalisieren, wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung (IF) durchgeführt. Hierbei werden epitopspezifische primäre Antikörper, welche das zu detektierende Protein erkennen, und fluoreszenzfarbstoffmarkierte sekundäre Antikörper, welche artspezifisch den primären Antikörper erkennen, zur Hilfe genommen.

Die IF wurde in 24-Lochplatten in einer Größenordnung von 1×10^3 Zellen vorgenommen. Hierfür wurden diese vorher auf ornithinisierte 10-mm-Deckgläschen ausgesetzt. 48 Stunden nach Inkubation unter Standardbedingungen im Brutschrank erfolgte ein Medienwechsel, die Zugabe von frisch hergestelltem Chloroquin in einer Konzentration 10 µg/ml und vier Stunden später die Bestrahlung der Zellen mit 2,5 Gy ionisierender Strahlung.

2.4.1 Fixierung adhärenter Zellen mit Paraformaldehyd (PFA)

Für die indirekte IF wurden die Zellen zuvor mit PFA (Merck KGaA, Darmstadt) fixiert. Dies erfolgte zu festgelegten Zeitpunkten zwischen einer halben und zwei Stunden nach Bestrahlung. Hierfür wurden die Zellkulturen zunächst dreimal mit PBS gewaschen und danach durch Zugabe von PFA (3,7 % in PBS, 5 min bei RT) auf dem Deckglas fixiert. Das PFA wurde dann durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Sollten die Zellen erst zu einem späteren Zeitpunkt weiter behandelt werden, so konnten sie an dieser Stelle mit einer -20 °C kalten Aceton-Methanol-Lösung (1:1) überschichtet werden und für längere Zeit bei -20 °C gelagert werden. Nach dieser Lagerung wurden die Zellen durch erneutes Waschen mit PBS vorbereitet.

2.4.2 Färbung

Um eine intrazelluläre Bindung der Antikörper zu ermöglichen, wurde bei den fixierten Zellen durch Zugabe einer 0,3 %-Triton-X-100-Lösung (0,3 % Triton X-100 in 1x PBS, 10 min bei RT) die Zellmembran permeabilisiert. Nach wiederholtem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Blockierserum (BSA) für 30 Minuten geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen auszuschließen. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern γ -H2AX (verdünnt 1:1000) und anti-Nestin (1:400) in der entsprechenden Verdünnung in Blockierserum bei 4 °C über Nacht oder für 90 bis 180 Minuten bei RT in einer feuchten Kammer. Um überschüssige primäre Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, bevor die sekundären Antikörper FITC (1:10) und Alexa 555 (1:500) in der entsprechenden Verdünnung in BSA hinzugegeben und für 30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert wurden. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS zum Entfernen des überschüssigen sekundären Antikörpers wurden die Zellen mit DAPI-Arbeitslösung (1:100) für zehn Minuten inkubiert. Bei DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, USA) handelt es sich um einen Farbstoff, der die Detektion von Zellkernen unter dem Mikroskop möglich macht. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS wurden die Deckgläschen auf ca. 5 μ l Trägersubstanz auf einen Objektträger umgelagert. Nach mindestens 30 Minuten war das *Mounting Medium* getrocknet und die Zellen so versiegelt, dass diese unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden konnten. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nur mit dem Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper behandelt wurden. Visualisierung und Dokumentation der Fluoreszenzsignale erfolgten mittels Fluoreszenzmikroskopie und digitaler Bildaufnahme. Die Aufnahmen spezieller Vergrößerungen erfolgten mithilfe eines konfokalen Mikroskops (Leica Microsystems, Wetzlar) im Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen.

2.5 Genexpressions-Analyse

Die Genexpressionsmuster in G112-BTISCs, entweder unbehandelt oder mit CLQ versetzt, wurden durch *Microarray*-Analyse verglichen. Die Genexpressions-Analyse wurde in Zusammenarbeit mit dem Transkriptom Labor des UMG unter Verwendung des GeneChip HuGene 1.0 ST array® (Affymetrix) durchgeführt.

2.6 Statistische Auswertung

Von allen in den biologischen Assays gewonnenen Werten wurde jeweils der Mittelwert mit den Standardabweichungen berechnet. Statistische Unterschiede zwischen Kontroll- und Experimentgruppe wurden mit dem ungepaarten t-Test verglichen. Wahrscheinlichkeitswerte (p) < 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet. Zur statistischen Auswertung wurde das Programm Sigma Plot (Systat Software Inc., Chicago, USA) benutzt.

3 Vorarbeiten

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente wurden im Neuroonkologischen Labor der Universität zu Lübeck und später im Neuroonkologischen Labor der Universitätsmedizin Göttingen in der AG für die Experimentelle Neuroonkologie (Prof. Dr. med A. Giese/ PD Dr. rer. nat. E. Kim) durchgeführt. Die erhobenen Ergebnisse dienen als Grundlage für die in dieser Doktorarbeit durchgeführten Versuchsanordnungen und sollen daher kurz beschrieben werden.

3.1 Chloroquin hemmt das Wachstum von Gliomzellen durch Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53

Der Verlust der Funktionalität von p53 ist eine typische Alteration in der Entwicklung von Glioblastomen, welche bei mehr als 30 Prozent der primären oder de novo Glioblastome mutiert ist (Oghaki und Kleihus 2005). Das Tumorsuppressorgen p53 gilt als potenzieller Inhibitor des Zellwachstums durch Induktion einer transienten oder permanenten Wachstumsblockade sowie durch die Auslösung des apoptotischen Zelltodes als Antwort auf verschiedene Stressfaktoren für die Zelle und hat sich dadurch als potenzieller Angriffspunkt in der Tumortherapie etabliert. In diesem Zusammenhang wurden in früheren Versuchen zur Wirkung von CLQ auf Glioblastomzellen Gliomzelllinien mit unterschiedlichem funktionellem p53-Status bezüglich ihres Wachstumsverhaltens nach CLQ-Gabe untersucht (Kim EL et al. 2010).

4 Ergebnisse

4.1 Wirkung von Chloroquin auf das Wachstum der Glioblastomzellen mit mutiertem TP53-Gen

4.1.1 Chloroquin hemmt das Wachstum der Glioblastomzelllinie G112

Auffällig in den bisherigen Versuchen zur Chloroquin-Wirkung auf konventionelle Glioblastomzelllinien war, dass es nach CLQ-Behandlung zusätzlich zur offensichtlichen p53-abhängigen Wirkung auch zu einer Wachstumshemmung von Zelllinien mit mutiertem oder deletiertem p53 kam, wenngleich auch weniger effektiv im Vergleich zu den Zelllinien mit Wildtyp (=wt) p53. P53-unabhängige Wirkungen von CLQ sind bereits in einer Vielzahl von Studien beschrieben worden (Lee CM und Tannock 2006; Solomon und Lee H 2009). Als Konsequenz stellt sich daher die Frage, welcher Mechanismus zu der bei Glioblastomzelllinien mit mutiertem p53 beobachteten Proliferationshemmung führt, sowie nach dem Zusammenhang zwischen p53-abhängiger und p53-unabhängiger CLQ-Wirkung. Zur Untersuchung des p53-unabhängigen Effektes der CLQ-Wirkung wählten wir die Zelllinie G112, in welcher das TP53-Gen durch Mutation inaktiviert ist.

Um den zytotoxischen Effekt von CLQ zu untersuchen, wurde zuerst die konventionelle G112-Zelllinie mithilfe des Wachstumskurvenassays untersucht. Es zeigt sich, dass CLQ das Zellwachstum dosisabhängig supprimiert (Abb. 7). Bei der maximalen CLQ-Konzentration von 20 µg/ml zeigt sich eine starke Reduktion (76 Prozent) der Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle an Tag 7. Die CLQ-Gabe von 2,5 µg/ml oder 5 µg/ml lässt keinen Einfluss auf das Zellwachstum erkennen. Die Werte am Ende der Plateauphase gleichen hier annähernd denen für die unbehandelte Kontrolle. Nach Gabe von 10 µg/ml zeigt sich eine diskrete Proliferationshemmung. So liegt das gemessene Absorptionsmaximum als Parameter für die vorhandene Zellzahl an Tag 7 bei 10 µg/ml etwas unter den Werten für die unbehandelte Kontrolle (19-prozentige Reduktion). Bei CLQ in der Dosierung von 15 µg/ml verbleiben etwa 50 Prozent der absoluten Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

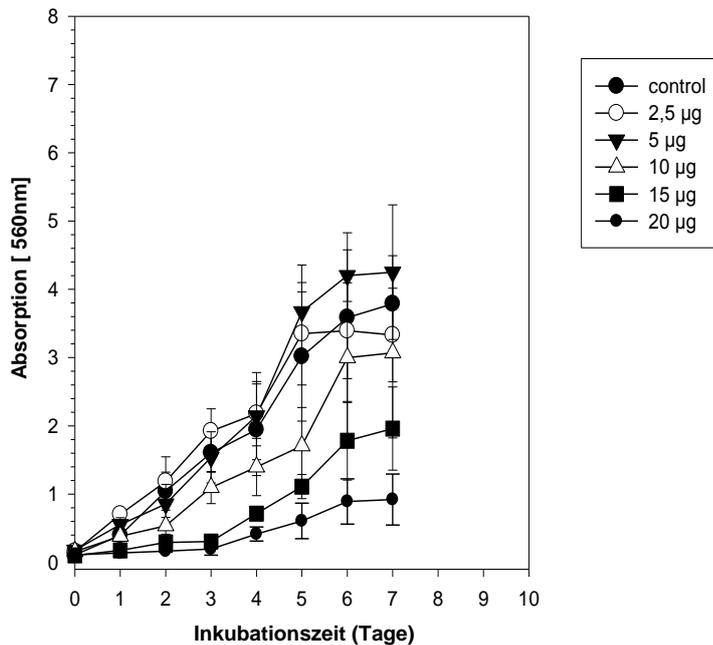


Abb. 7: Wachstumskurve G112 ST nach CLQ-Behandlung: Dosisabhängiger Effekt von CLQ auf das Wachstum von Glioblastomzellen unter Serum-supplementierten Bedingungen.

4.1.2 Nachweis von Stammzeleigenschaften bei der aus der Gliomzelllinie G112 isolierten Sub-Linie G112-BTISC

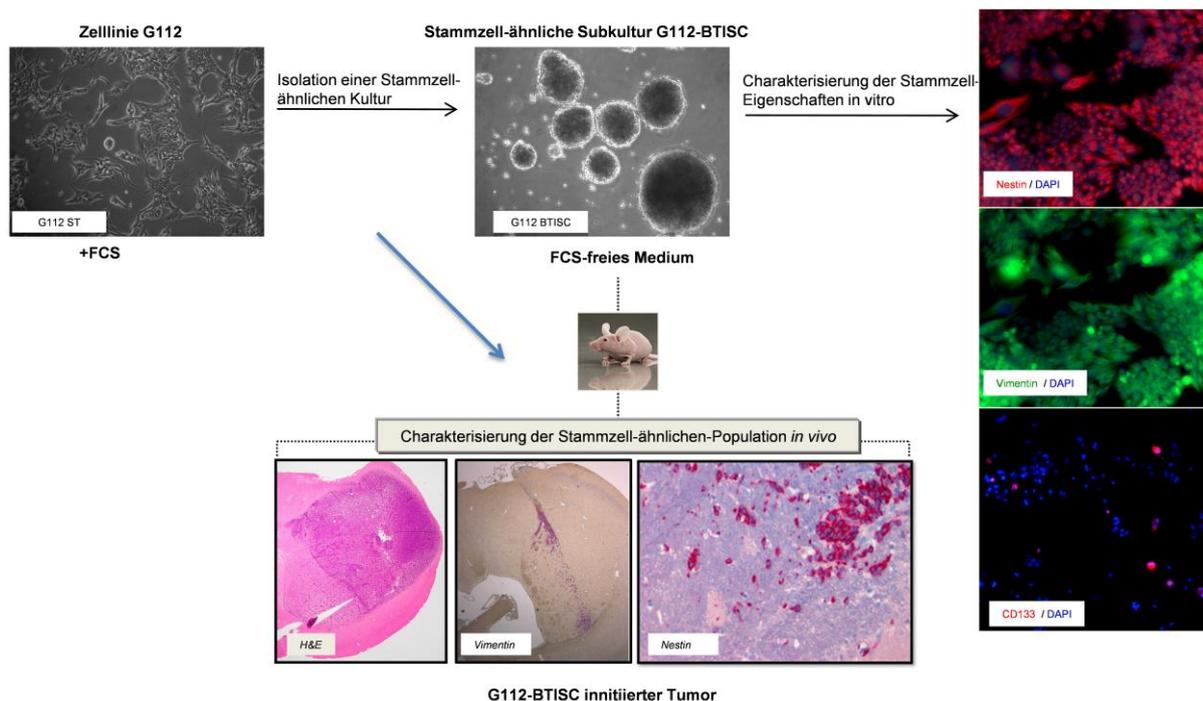
Wie bereits beschrieben, gelten GBM-Stammzellen als ursächliche Zellpopulation für die beobachtete intrinsische Radio- und Chemoresistenz der Tumore. Die Zelllinie G112 erlaubt durch das Vorhandensein einer solchen Subpopulation von Glioblastomzellen mit Stammzeleigenschaften (G112-BTISC) ein adäquates experimentelles Design für die Untersuchung bekannter Behandlungsmodalitäten und Entwicklung selektiver neuer Ansätze zur Überwindung der Resistenzmechanismen dieser Zellen. G112-BTISC-Zellen wurden dabei zunächst von der parentalen Zelllinie G112 selektiert und im Hinblick auf Glioblastom-Stammzeleigenschaften *in vivo* und *in vitro* charakterisiert.

Zusätzlich zur Tumor-Initiierungsfähigkeit wachsen G112-BTISC *in vitro*, im Gegensatz zu den normalen GBM-Zelllinien, auch unter Minimalbedingungen (Abb. 8 oben). Diese Neurosphären als spezifische Formationsform neuronaler Stammzellen sind zur Selbsterneuerung über viele Passagen hinweg fähig und es kommt nach Vereinzelung der Zellen zur Ausbildung identischer neuer Neurosphären. Als weiteres Charakteristikum konnte die Expression der gesichert neuronalen Stammzellmarker Nestin, Vimentin und CD133 nachgewiesen werden (Abb. 8 rechtes Panel).

Bezüglich ihrer Strahlenbiologie zeigen auch G112-BTISC-Zellen als Beweis ihrer Zugehörigkeit zum Stammzellkompartiment einen radioresistenten Phänotyp. Sowohl von uns durchgeführte *in-vitro*-Zellkulturexperimente als auch die Bestrahlung nach Implantation

im Tierexperiment *in vivo* (bisher nicht publizierte Daten) konnten das resistente Verhalten gegenüber konventionellen Dosen Radiotherapie belegen.

In unserem Labor durchgeführte *in-vivo*-Versuche zeigen, dass G112-BTISC-Zellen fähig sind, nach Implantation in Gehirne immunsupprimierter Mäuse Glioblastome zu bilden. Die histologische Aufarbeitung der gebildeten G112-Xenograft-Tumoren ergab dabei den Nachweis, dass diese in ihrem Wachstumsmuster histopathologisch durch das Vorhandensein zahlreicher Nekrosen und Pseudopallisaden den humanen Glioblastomen des Menschen sehr ähneln. Interessanterweise zeigen G112-Xenograft-Tumore einen sehr



aggressiven Tumortypus durch ein sehr heterogenes Wachstumsmuster sowie eine hohe Tendenz zum invasiven Wachstum (Abb. 8 unteres Panel).

Abb. 8: Die Glioblastomzelllinie G112 ST und ihre Subkultur mit Stammzeleigenschaften G112-BTISC. H&E Abbildungen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Schulz-Schaeffer (Abt. für Neuropathologie UMG).

4.1.3 Chloroquin hemmt das Wachstum der G112-BTISC-Sub-Linie mit Stammzeleigenschaften

Um den zytotoxischen Effekt von CLQ auf G112-BTISC-Zellen zu untersuchen, werteten wir (gemäß dem Wachstumsmuster der stammzellartigen Zellen als Neurosphären) die Anzahl an gebildeten Neurosphären pro Versuchsbedingung aus. Es erfolgte die identische Behandlung wie bei der konventionellen Zelllinie G112.

Es zeigte sich, wie bei der parenteralen Zelllinie G112, dass die Gabe von 2,5 µg/ml CLQ nur zu einer geringfügigen Hemmung des Zellwachstums und der klonalen Selbsterneuerung führt (1698 vs. 2002 selbsterneuernde Neurosphären, $p=0,07$ mit Signifikanzniveau $\alpha<0,05$) (Abb. 11A). Die Behandlung mit CLQ in der Dosierung von 7,5 µg/ml CLQ über einen Zeitraum von 14 Tagen führt dagegen zu einer signifikanten Abnahme (56-prozentige Reduktion) der Anzahl von Neurosphären (887 vs. 2002; $p=0,003$). Die Tatsache, dass CLQ hier bereits in dieser niedrigen Dosierung zu einer signifikanten Wachstumshemmung führt, erweckt den Anschein, als seien die Stammzellen sensibler gegenüber einer CLQ-Behandlung. Dies ist jedoch nicht der Fall. Die Wachstumshemmung bei dieser niedrigen Dosierung lässt sich durch den unterschiedlich gewählten Versuchsaufbau bei den beiden Zelllinien erklären. Die konventionelle Zelllinie G112 wächst adhärent und wurde nur 48 Stunden mit CLQ inkubiert. Nach dieser Zeit wurde CLQ durch Mediumwechsel wieder entfernt. Bei der selektierten Stammzelllinie G112-BTISC war dieses Behandlungsregime nicht möglich. Sie wachsen als frei schwebende kugelförmige Aggregate selbsterneuernder Zellklone (Neurosphären) und ein erneuter Mediumwechsel wäre nicht ohne großen Zellverlust möglich gewesen. Daher waren die Stammzellen 14 Tage ununterbrochen dem CLQ ausgesetzt.

4.2 Wirkung der adjuvanten Gabe von Chloroquin auf das Wachstum der Glioblastomzellen nach Bestrahlung

Die in unserem Labor im Vorfeld durchgeführten Bestrahlungsexperimente mit der Zelllinie G112 zeigen, dass die Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen ionisierender Strahlung (1,25–10 Gy) die Zellen erst bei hohen Dosen in ihrer Proliferation hemmt (Abb. 9).

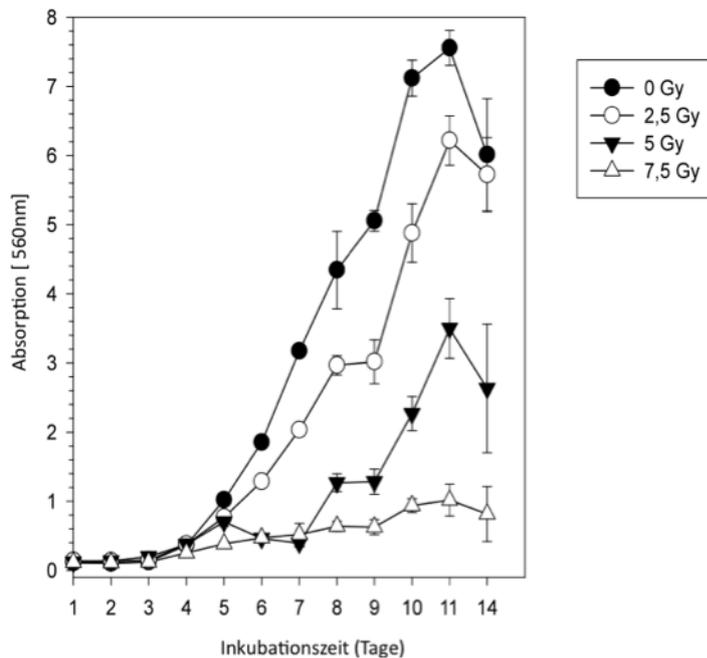


Abb 9. Wachstumskurve G112 ST nach Bestrahlung. Dosis-abhängiger Effekt der Bestrahlung auf das Wachstum von Glioblastomzellen unter Serum-supplementierten Bedingungen.

Wir wiederholten dieses Experiment mit der klinisch relevanten und bei diesen Zellen gesichert subeffektiven Dosierung von 2,5 Gy und konnten abermals als Zeichen der Radioresistenz nachweisen, dass die Bestrahlung mit 2,5 Gy nur zu einer geringen Wachstumsreduktion der G112-Zellen führt (Abb. 10A und B).

In einem nächsten Schritt untersuchten wir den Effekt von 2,5 Gy ionisierender Strahlung auf die Glioblastomzelllinie mit Stammzellattributen G112-BTISC. Auch bei G112-BTISC zeigte sich, dass die Bestrahlung mit 2,5 Gy einen eher moderaten Effekt auf die absolute Anzahl an Neurosphären hat (1669 vs. 2002; 17-prozentige Reduktion) (Abb.11A). Die Wachstumshemmung erfolgte dabei in ähnlicher Größenordnung wie bei der parenteralen Zelllinie G112. Die erwirkte Hemmung durch alleinige Bestrahlung erreicht jedoch nicht das Level statistischer Signifikanz ($p=0,06$ für G112-BTISC) und kann somit als ineffektive Behandlung gewertet werden.

4.2.1 Chloroquin erhöht die zytotoxischen Effekte der Bestrahlung auf die Glioblastomzelllinie G112

Die Untersuchung des kombinatorischen Effektes von CLQ-Gabe und Radiotherapie geschah aus zwei Gründen. Zum einen wussten wir nun aus unseren Versuchen, dass CLQ eine zytotoxische Wirkung auf Glioblastomzellen und auch auf Glioblastom-Stammzellen hat (Abb. 7 und 9). Bekanntermaßen löst die Bestrahlung mit ionisierender Strahlung wie bereits beschrieben DNA-Doppelstrangbrüche aus. Es ist bereits bekannt, dass CLQ durch Interkalation in die DNA-Helix die DNA-Topologie verändern kann. Die Integrität der DNA-Struktur und die Wiederherstellung der DNA-Funktion durch DNA-Schadensreparatur

Bestrahlungs-induzierte DNA-DSBs ist für alle weiteren mit der DNA-Funktion verknüpften Prozesse notwendig. Wir postulierten daher, dass CLQ additiv zur Radiotherapie über die Beeinflussung der DNA-Schadens-Reparatur-Antwort wirkt. Um den von uns vermuteten radiosensibilisierenden Effekt von CLQ zu untersuchen, wurden die Hälfte der G112-Zellen mit 2,5 Gy als Einzelbehandlung oder in Kombination mit der CLQ-Gabe behandelt. Die CLQ-Zugabe wurde vier Stunden vor der Bestrahlung initiiert. So erhielten wir für jede der oben aufgeführten CLQ-Konzentrationen eine bestrahlte und eine unbestrahlte Kondition. Die Ergebnisse zeigen, dass die Gabe von CLQ vor der Bestrahlung bei der G112-Zelllinie zu einer deutlichen Reduktion des Zellwachstums im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 10A) führt. Im Vergleich dazu zeigen die Einzelbehandlungen (Gabe von 2,5 µg/ml CLQ oder Bestrahlung der Zellen mit 2,5 Gy), wie bereits beschrieben, einen weniger ausgeprägten Effekt auf die Hemmung der Zellproliferation (Abb.10A).

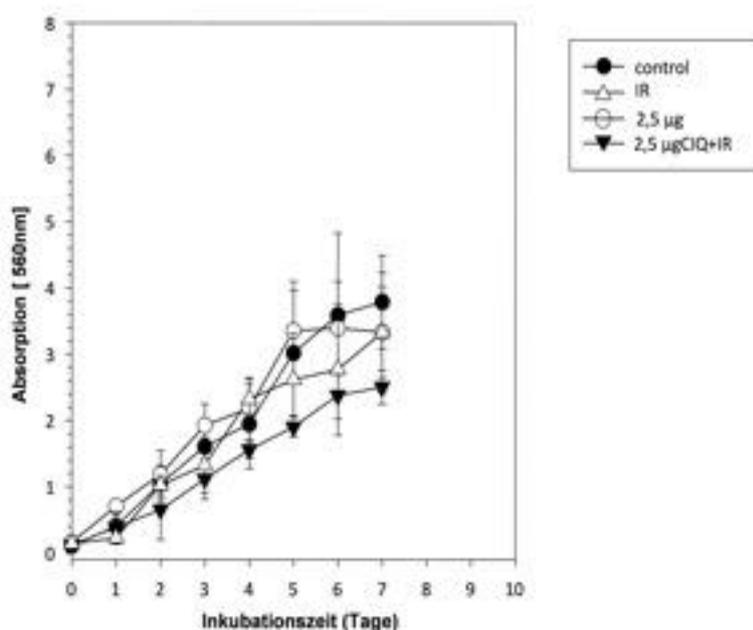


Abb.10A Wachstumskurve G112 ST nach Kombinationsbehandlung.

Vergleich von Bestrahlung (IR), Chloroquingabe (2,5 µg/ml) sowie Kombinationsbehandlung (2,5 µg/ml CLQ+IR) auf das Wachstum von G 112 ST Zellen

Auch bei den höheren CLQ-Konzentrationen (5 und 10 µg/ml) konnte eine Radiosensibilisierung durch CLQ beobachtet werden. Wie bereits beschrieben führt die alleinige Applikation von 5 und 10 µg/ml CLQ nicht oder kaum zur Wachstumshemmung von Gliomzellen. Die adjuvante Gabe dieser subeffektiven Dosen zur Bestrahlung mit 2,5 Gy zeigt im Vergleich mit den bestrahlten Zellen für 5 µg/ml und für 10 µg/ml eine deutliche Reduktion des Wachstums im Vergleich zu den Einzelbehandlungen (Abb. 10B).

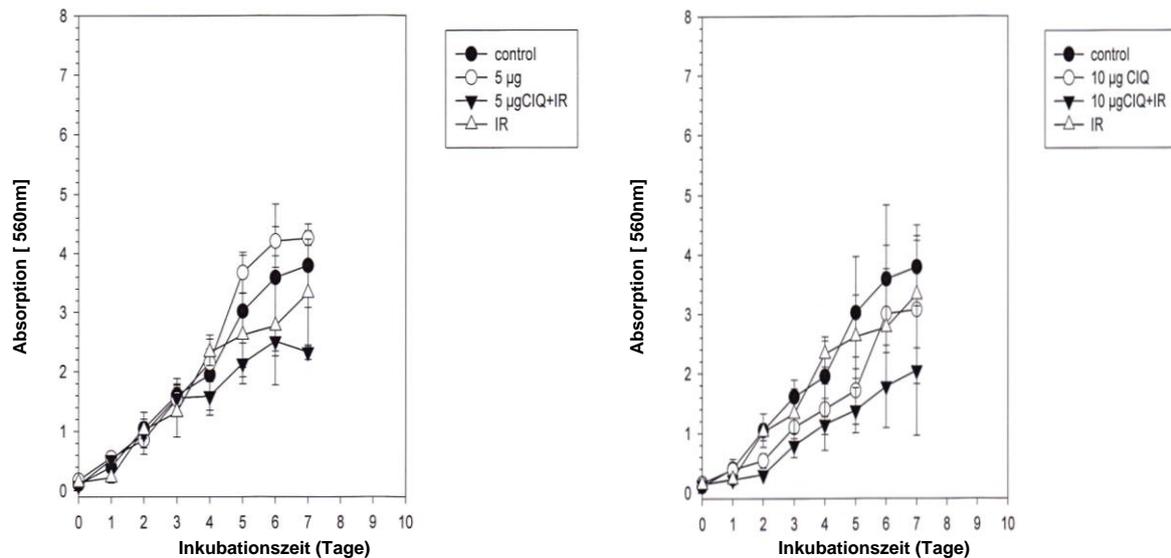


Abb. 10B: Wachstumskurve G112 ST nach Kombinationsbehandlung. Vergleich von Bestrahlung (IR), Chloroquingabe (5 µg/ml bzw. 10 µg/ml) sowie Kombinationsbehandlung (5 µg/ml bzw. 10 µg/ml CLQ +IR) auf das Wachstum von G112 ST-Zellen.

4.2.2 Chloroquin erhöht die zytotoxischen Effekte der Bestrahlung auf die stammzell-ähnlichen G112-BTISC-Zellen

In einem nächsten Schritt wollten wir untersuchen, ob CLQ auch radiosensibilisierende Wirkung auf Glioblastomzellen mit stammzellartigem Charakter hat. Hierzu bestrahlten wir je eine Kulturflasche, welche CLQ in Dosierungen von 2,5, 5 oder 7,5 µg/ml enthielt, mit 2,5 Gy ionisierender Strahlung vier Stunden nach CLQ-Applikation. Es zeigte sich als Beweis der radiosensibilisierenden Wirkung von CLQ, wie bereits bei der Standardzelllinie G112, dass die adjuvante Gabe von 2,5 µg/ml CLQ vor ionisierender Strahlung zu einem signifikanten Abfall der Neurosphärenanzahl (1085 vs. 2002; $p=0,001$) führt. Die Applikation höherer CLQ-Konzentrationen (5 und 7,5 µg/ml) führte in unserem Experiment schon singular appliziert zu einer deutlichen Neurosphärenanzahlreduktion (dargestellt für 7,5 µg/ml, Abb. 11A). So kommt es zu einer 64-prozentigen Reduktion der Neurosphärenzahl (691 vs. 2002, $p=0,001$). Im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung ergibt sich durch die adjuvante CLQ-Gabe eine deutliche Reduktion der Anzahl an Neurosphären. Allerdings weist der Unterschied bei diesen beiden Konzentrationen zwischen den Gruppen CLQ und CLQ+IR keine statistische Signifikanz auf ($p=0,16$).

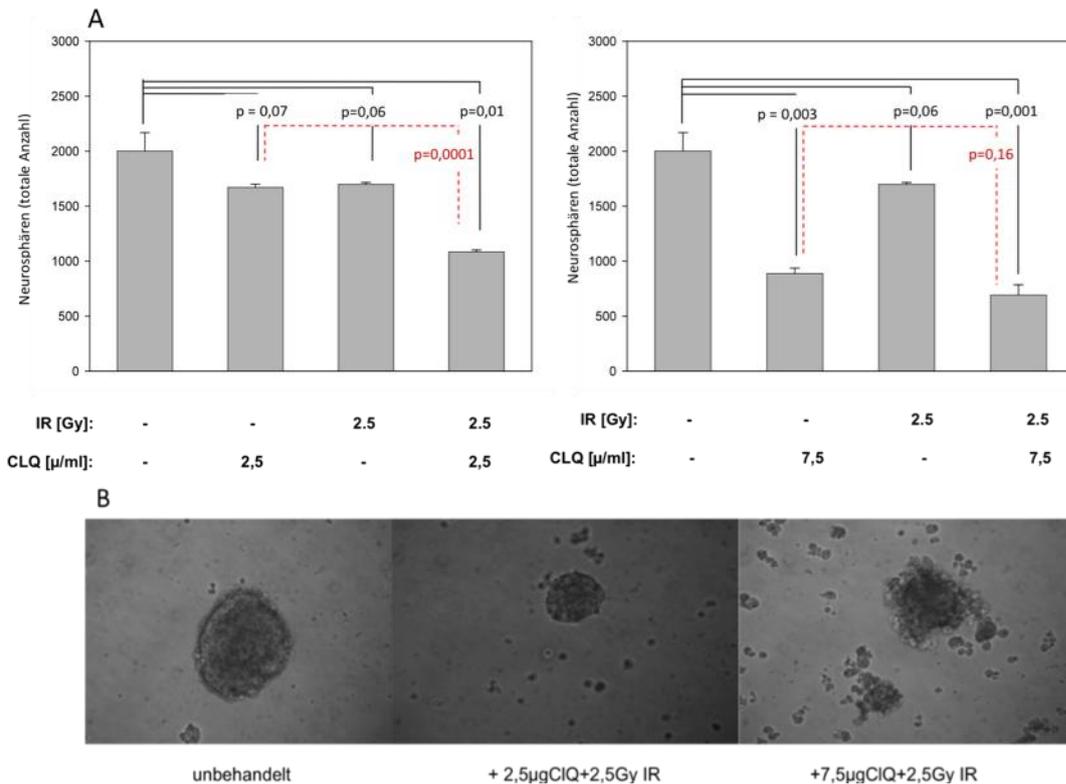


Abb. 11: Erfassung des Neurosphären-Formations-Potenzials der G112-BTISC-Zellen nach Behandlung mit Chloroquin, Radiatio oder Kombination von CLQ + Radiatio. A: In der statistischen Auswertung der einzelnen Gruppen zeigt sich eine signifikante Abnahme der Kolonienbildung bei alleiniger Gabe von 7,5 µg/ml CLQ sowie der Kombinationsbehandlung von CLQ (2,5 oder 7,5 µg/ml)+ Radiatio bei den G112-BTISC-Zellen. B: repräsentatives Bild der Neurosphären.

4.3 Effekt von Chloroquin auf eine radioresistente Subpopulation von Gliomzellen mit Stammzellattributen

Wir untersuchten im Hinblick auf die Anwendung von CLQ im klinischen Alltag einen möglichen radiosensibilisierenden Effekt von CLQ bei einer gesichert radioresistenten Subpopulation von G112-BTISC, die bereits mehrere Zyklen Radiotherapie überlebt hat, G112-BTISC-rad. Es handelt sich, wie im Methodikteil bereits erwähnt, um selektierte Zellen der Stammzelllinie G112-BTISC, die nach sieben Zyklen Bestrahlung mit 2,5 Gy ionisierender Strahlung als überlebende Zellen gewonnen und weiter propagiert wurden.

Da die Zelllinie G112-BTISC-rad ebenfalls als Neurosphären im serumfreien Medium wächst, wählten wir auch hier die Untersuchung des Neurosphären-Formations-Potenzials zur Untersuchung der CLQ-Wirkung auf die Zellproliferation. Der Versuchsaufbau glich exakt dem für die Zelllinie G112-BTISC; Dosierung und Zeitpunkt der CLQ-Zugabe sowie die Bestrahlung wurden nicht variiert.

Wie erwartet führt CLQ in der Dosierung von 2,5 µg/ml auch hier nicht zur signifikanten Hemmung des Zellwachstums (2700 vs. 2611, $p=0,53$). Die Größenordnung, in der CLQ bei dieser Konzentration einen zytotoxischen Effekt auslöst, liegt sogar unter dem bei G112 und

G112-BTISC beobachteten Effekt und es zeigt sich nur ein geringer Effekt der CLQ-Behandlung (vierprozentige Zellreduktion). Auch CLQ in höherer Dosierung von 7,5 µg/ml führt bei dieser resistenten Zelllinie im Unterschied zu den beiden zuvor getesteten Zelllinien nicht zu einer signifikanten Wachstumshemmung (2700 vs. 2508 p=0,17) (Abb.12).

4.3.1 Chloroquin erhöht die zytotoxischen Effekte der Bestrahlung auf G112-BTISC-rad-Zellen

Die Auswertung der Neurosphärenanzahl nach Bestrahlung mit 2,5 Gy zeigt ein vermehrtes Zellwachstum in Form einer höheren Anzahl an Neurosphären (2700 vs. 2914 p=0,14). Sie zeigen somit als Beweis ihrer Radioresistenz nach Applikation von 2,5 Gy ionisierender Strahlung kein Ansprechen auf die Behandlung.

In einem nächsten Schritt galt es auch hier, in Hinblick auf die Anwendung von CLQ als Adjuvans in der Behandlung von GBM und auch nach Rezidiven von GBM den Effekt von CLQ-Gabe in Kombination mit nachfolgend durchgeführter Bestrahlung zu untersuchen.

Die adjuvante Gabe von 2,5 µg/ml CLQ vor Bestrahlung führt auch bei G112-BTISC-rad zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl an Neurosphären (2700 vs. 2291, p=0,001). Der Effekt zeigt sich hier etwas weniger drastisch als bei den Zelllinien G112 und G112-BTISC. Verglichen mit den Einzelbehandlungen mit CLQ und vor allem mit der alleinigen Bestrahlung zeigt sich hier jedoch erstmals eine signifikante Hemmung der Zellproliferation dieser resistenten Zelllinie. Die adjuvante Gabe von CLQ in der Dosierung von 7,5 µg/ml führt ebenfalls zu einer signifikanten Hemmung der Anzahl an Neurosphären (2700 vs. 2226, p=0,003). Damit zeigt sich, dass die alleinige Radiatio der Zellen oder Behandlung mit CLQ keinen ausreichend zytotoxischen Effekt auf diese resistenten Zellen haben, lediglich die adjuvante Gabe von CLQ vor Bestrahlung führt, wenn auch weniger drastisch im Vergleich zu den zuvor getesteten Zelllinien, über einen additiven Effekt zu einer Proliferationshemmung. Dieses Experiment gibt somit einen Ausblick auf den Vorteil, der mit der Kombination beider Einzelbehandlungen erreicht werden kann.

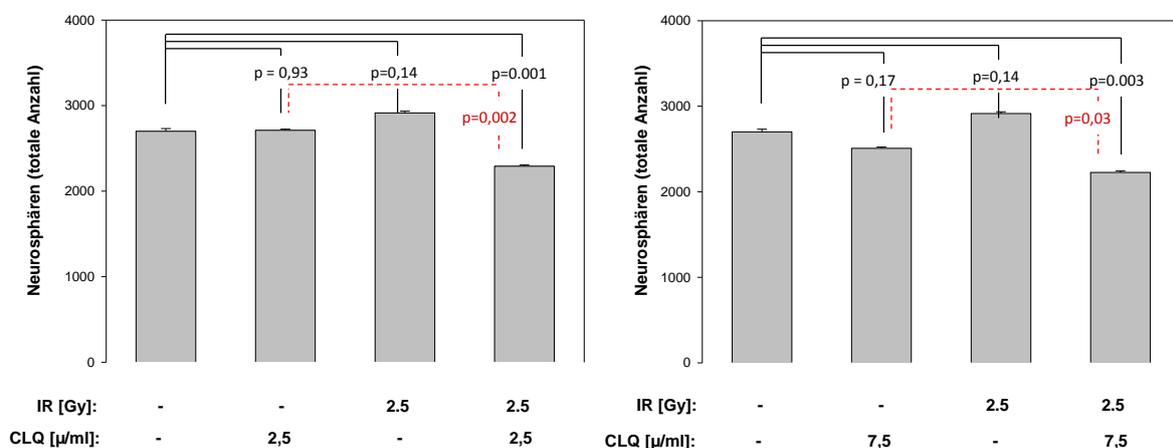


Abb. 12: Erfassung des Neurosphären-Formations-Potenzials der G112-BTISC-rad-Zellen nach Behandlung mit Chloroquin, Radiatio oder Kombination von CLQ + Radiatio. In der statistischen Auswertung zeigt sich bei den G112-BTISC-rad-Zellen eine statistisch signifikante Abnahme der Anzahl an gebildeten Kolonien bei der Kombinationsbehandlung (CLQ+Radiatio) im Gegensatz zu den Einzelbehandlungen.

4.4 Molekularer Mechanismus der Chloroquin-Wirkung

Obwohl ionisierende Strahlung (IR) Tumorzellen auf verschiedene Weise schädigt, beruht die letale Wirkung von IR hauptsächlich auf der Auslösung von DNA-Schäden. Daher spielen DNA-Schadensreparatur-Signalwege eine entscheidende Rolle bei der beobachteten Radioresistenz der BTISCs (Bao et al. 2006a). Wie bereits beschrieben führt Ionisierende Strahlung in Zellen zu DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen. Die sich im Verlauf anschließenden DNA-Reparatur-Prozesse verursachen die Phosphorylierung von H2AX zu γ -H2AX mit Bildung diskreter nukleärer Reparatur-Foki. Die Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen ist durch Darstellung von γ -H2AX-Foki mittels Immunfluoreszenz möglich. Spezielle Informationen bezüglich der initialen Schritte des komplexen Prozesses der DNA-DSB-Reparatur können durch Quantifizierung der γ -H2AX-Foki gewonnen werden. Um die Rolle des DNA-Schadensreparaturweges als möglichen Mechanismus der Radiosensibilisierung durch CLQ zu eruieren, untersuchten wir den Effekt von CLQ auf die Fähigkeit von BTISCs, DNA-Schäden, ausgelöst durch die Bestrahlung mit ionisierender Strahlung, zu reparieren.

4.4.1 Untersuchung des DNA-Reparaturpotenzials mithilfe der immunfluoreszenten Färbung für γ -H2AX

Um zu untersuchen, ob CLQ einen Einfluss auf die DNA-DSB-Reparatur in GBM-Stammzellen hat, bestimmten wir durch Erfassung der γ -H2AX positiven Zellen den Anteil von DNA-Schadens-Reparatur-Prozessen, welche durch ionisierende Strahlung induziert wurden, in An- oder Abwesenheit von CLQ .

Im Rahmen der Etablierung dieser Methode in unserem Labor wurde zunächst der Zeitpunkt der maximalen durch ionisierende Strahlung induzierten DNA-Reparatur gesucht, welche sich aus der Zunahme der Anzahl an γ -H2AX-positiven Zellen ergibt. Die Schädigung und Reparatur von DNA findet, wie auch die Phosphorylierung von H2AX, im Zellkern statt. Um sicherzustellen, dass das erhaltene H2AX-Signal intranukleär lokalisiert ist, wurde die Färbung mit DAPI, einem spezifischen Marker von Zellkernbestandteilen, verwendet.

Die entsprechende Zeit-Wirkungskurve ist in Abbildung 13A dargestellt. Ionisierende Strahlung induziert bereits eine halbe Stunde nach Bestrahlung die Bildung von γ -H2AX-Foki, dabei liegt der Anteil der Zellen, die eine halbe Stunde nach Bestrahlung eine signifikante γ -H2AX-Signalanreicherung aufweisen, bei ca. 75 Prozent. Die Anzahl der

positiven Zellen nimmt im weiteren zeitlichen Verlauf nach zwei Stunden wieder Kontrollniveau an. Die Tatsache, dass DNA-Reparatur-Prozesse auch in den Zellen zur Aufrechterhaltung des zellulären Stoffwechsels stattfinden, wird durch den Prozentsatz an γ -H2AX positiven Zellen in der unbehandelten Kontrollgruppe repräsentiert. Auffällig ist neben der Tatsache, dass bei den bestrahlten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine deutliche Mehranreicherung an positivem Signal vorhanden war, auch das Verteilungsmuster des intranukleären H2AX-Signals. In den unbestrahlten Zellen zeigt sich eine gleichmäßige nukleäre Signalanreicherung, während bei den bestrahlten Zellen, durch DNA-Schäden verursacht, eine Kondensierung von Chromatin zu beobachten ist. Dies wird sichtbar gemacht durch eine deutlich signalintensivere Verteilung der γ -H2AX-Färbung im Zellkern.

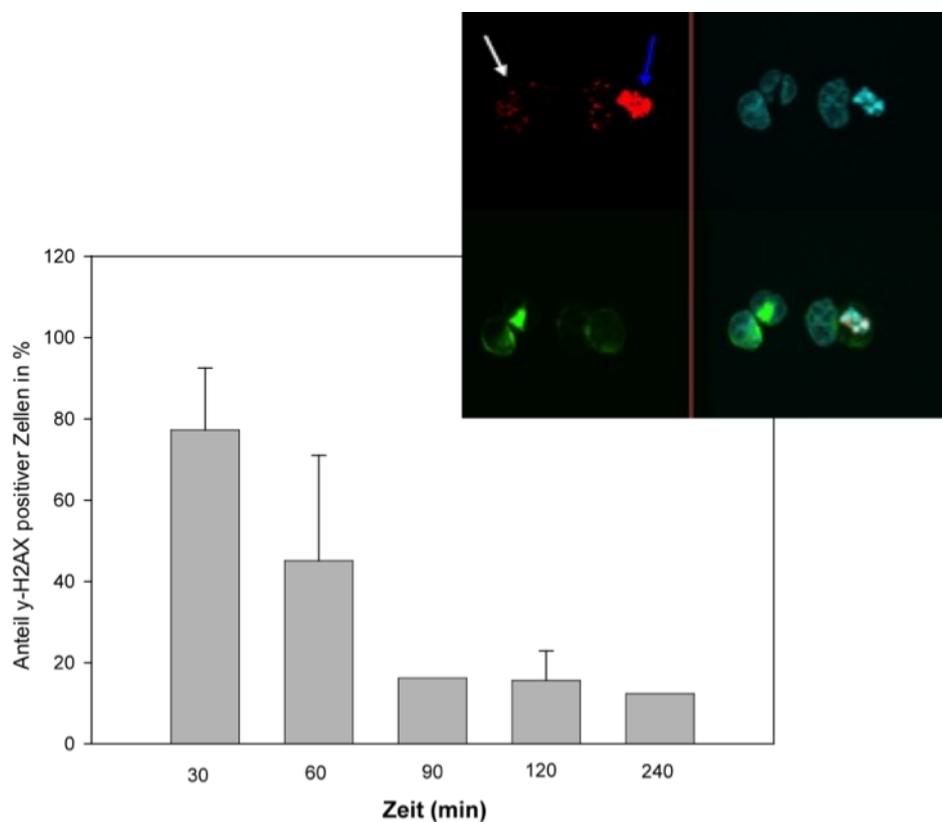


Abb. 13A: Prozentualer Anteil IR-induzierter γ -H2AX positiver G112-BTISC-Zellen in Zeit (min) nach Bestrahlung. Links im Bild eine konfokale Mikroskopie-Aufnahme bestrahlter G112-BTICs mit zwei unterschiedlichen γ -H2AX-Färbungsmustern (rot) in der immunfluoreszenten Färbung: Zellen, die DNA-Reparaturvorgänge betreiben, können durch ihr „gepunktetes“ Muster der Zellkernfärbung abgegrenzt werden, welches die γ -H2AX-DSB-Foki darstellt (weißer Pfeil). Apoptotische Zellen mit den charakteristischen nukleären Blasen, mit einer starken Anfärbbarkeit für γ -H2AX, sind ebenfalls abgebildet (blauer Pfeil). Rechts im Bild Färbung mit DAPI (türkis). Unteres Panel: Färbung für Nestin (grün), einen spezifischen Marker für GBM-Stammzellen.

Um die Wirkung von CLQ an DNA-Reparatur-Prozessen zu untersuchen, wurden G112-BTISC-Zellen mit CLQ vorbehandelt und anschließend mit Gamma-Strahlung bestrahlt. Wie in Abbildung 13B dargestellt, zeigt CLQ allein eine minimale Veränderung der Anzahl an γ -H2AX-positiven Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kontrolle: $3,64\% \pm 1,3$ vs. CLQ: $7,87\% \pm 2,4$). Dies zeigt, dass CLQ zwar die DNA interkaliert, jedoch ohne selbst als DNA-schädigendes Agens zu wirken. Wie bereits beschrieben finden 30 Minuten nach Bestrahlung die Reparatur-Prozesse in höchstem Maß statt, repräsentiert durch den hohen Prozentsatz an γ -H2AX-positiven Zellen ($77,26 \pm 15,3$). Im Gegensatz dazu ist die Anzahl der Zellen, die DNA-Reparatur betreiben, in der mit CLQ vorbehandelten Gruppe signifikant erniedrigt (IR: $77,26 \pm 15,3$ vs. IR+CLQ: $23,2\% \pm 9,9$). Der Vergleich mit der unbestrahlten Kontrollgruppe indiziert, dass CLQ die Bildung der DNA-Reparatur-Foki an DNA-Doppelstrangbrüche, die durch Bestrahlung mit ionisierender Strahlung induziert werden, inhibiert oder verzögert.

Im weiteren zeitlichen Verlauf kommt es nach zwei Stunden zum Angleichen der Werte für bestrahlte Zellen an die Kontrollgruppe sowie die mit CLQ vorbehandelten Zellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass CLQ die durch ionisierende Strahlung induzierbare Erhöhung an γ -H2AX-Foki reduziert und dass CLQ Zellen für Radiatio sensibilisiert, indem es die nach Bestrahlung ablaufenden Reparatur-Prozesse hemmt. Als Folge kann die Reparatur von durch Radiatio induzierten DNA-Schäden in Zellen, die mit CLQ behandelt wurden, selbst bei intaktem endogenen DN-Reparatur-Apparat nicht so effektiv ablaufen.

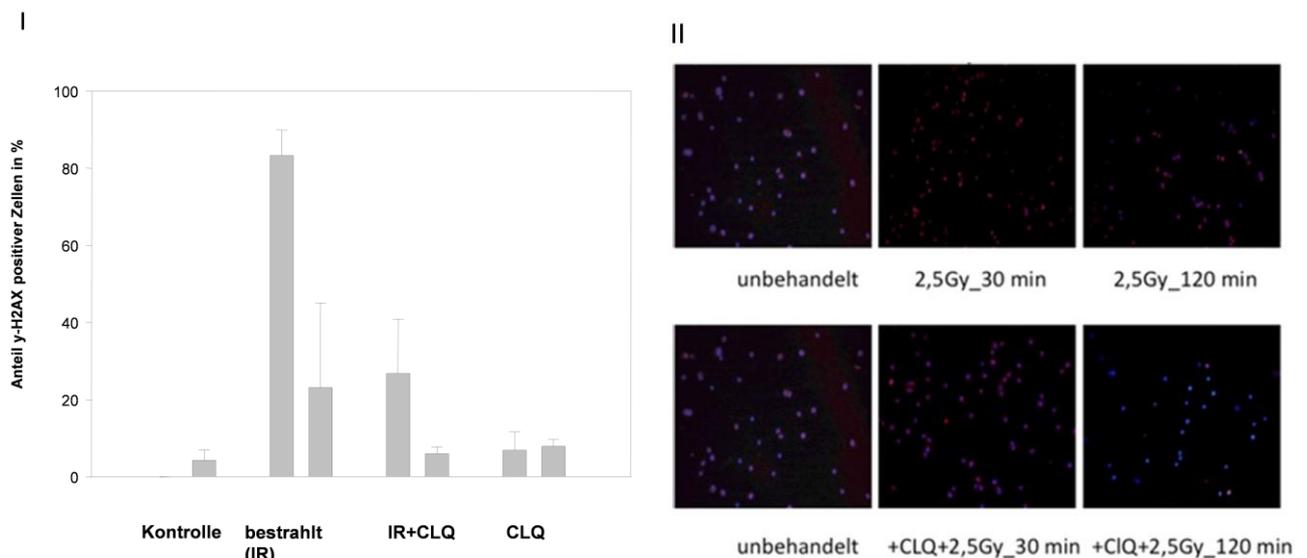


Abb. 13B: Darstellung Bestrahlungs-induzierter DNA-Reparatur-Kapazität. I, Quantifizierung Bestrahlungs-induzierter γ -H2AX-DNA-Reparatur-Foki in G112-BTICs II, immunfluoreszente Färbung für γ -H2AX (rot) und DAPI (blau) in G112-BTICs, die bestrahlt (IR) wurden, mit oder ohne adjuvante CLQ-Gabe.

4.4.2 Ermittlung des DNA-Reparaturpotenzials der G112-BTIC-Zellen mithilfe des Reporter-Gen-Assays

Wir untersuchten die Funktionsfähigkeit der DNA-Reparatur-Kapazität in G112-BTISC-Zellen, die bekanntermaßen zur Tumorgenerierung fähig sind. Zur Beantwortung der Frage, ob die Resistenzbildung gegenüber Strahlentherapie *in vivo* auf einer erhöhten DNA-Reparatur-Kapazität der Zellen beruht, verglichen wir mithilfe des Reporter-Assays das DNA-Reparatur-Potenzial von G112-BTISC-Zellen, die entweder mit dem intakten Plasmid pCMV Luc-sc oder mit dem geschnittenen Plasmid pCMV Luc-L transfiziert wurden. Um die DNA-Reparatur-Aktivität zu aktivieren, setzten wir eine Hälfte der transfizierten Zellen 24 Stunden nach Transfektion 2,5 Gy ionisierender Strahlung aus, während die anderen Zellen unter gleichen experimentellen Bedingungen keine Behandlung erhielten. Wie erwartet waren die konstitutiven Level der Reporter-Gen-Expression der bestrahlten und der unbehandelten G112-BTISC-Zellen nahezu identisch. Beide Zellgruppen wurden mit der nicht-linearisierten pCMV Luc-sc DNA transfiziert, welche keine DSBs aufweist (Abbildung 14, Säulen der Reihe pCMV Luc-sc). Im Vergleich dazu steht die Messung der Reparaturfähigkeit der G112-BTISC-Zellen nach Bestrahlung, die mit dem linearisierten pCMV Luc-L, welches DSBs aufweist, transfiziert wurden (Abbildung 14, Säulen der Reihe pCMV Luc-L).

Durch die Wiederherstellung der Reporter-Gen-Aktivität (38,5 %) konnte bewiesen werden, dass die G112-BTISC-Zellen über die Fähigkeit zur funktionellen DNA-Reparatur verfügen und so in der Lage sind, DNA-Defekte in Form von DSBs zu reparieren.

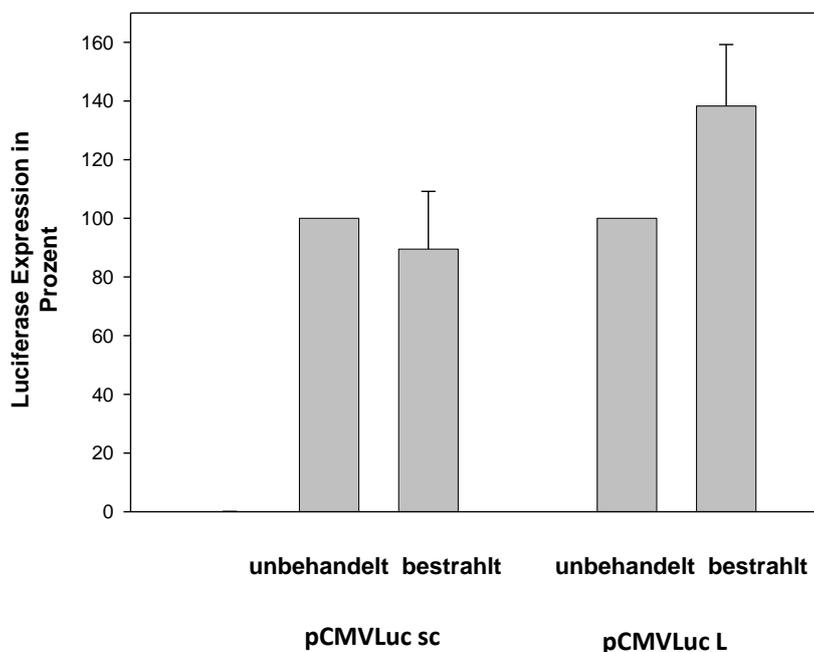


Abb. 14: Quantifizierung der DNA-DSB-Reparaturfähigkeit von G112-BTISC mithilfe des DNA-Reparatur-Reporter-Assay. Es zeigt sich eine deutlich erhöhte Expression von Luciferase nach Bestrahlung der Zellen, die mit dem geschnittenen Plasmid (pCMV Luc-L) transfiziert wurden, im Sinne einer erfolgten Reparatur der DNA-

DSBs. Beim intakten Kontrollplasmid pCMV Luc-sc zeigt sich kein Anstieg der Luciferase-Expression nach Bestrahlung.

4.4.3 Untersuchung des DNA-Reparaturpotenzials von G112-BTISC nach Chloroquin- Behandlung mithilfe des Reporter-Gen-Assays

Wie bereits beschrieben, ist CLQ zur Interkalation mit Doppelstrang-DNA fähig, ohne sie dabei zu schädigen. Da DNA-Interkalation auch zu Störungen und Konformationsänderungen der Chromatinstruktur führen kann, welche eine wichtige Rolle bei den komplexen Abläufen des DNA-Reparatur-Prozesses spielt (diskutiert auf Seite 16), untersuchten wir in einem weiteren Schritt, ob die Behandlung mit CLQ einen Einfluss auf die Reparatur-Kapazität von G112-BTISC hat.

Um die Auswirkung von CLQ auf die Reparaturvorgänge in G112-BTISC zu untersuchen, versetzten wir die Zellen 24 Stunden nach Transfektion mit dem Plasmid mit CLQ in einer Dosierung von 10 und 20 µg/ml. Weitere 24 Stunden nach CLQ-Gabe bestrahlten wir die Hälfte der Zellen mit 2,5 Gy ionisierender Strahlung zur Erhaltung von DNA-Doppelstrangbrüchen. Die Messergebnisse zeigen, dass die Zellen, im Sinne einer Aktivierung, nach Bestrahlung wiederum in der Lage sind, vermehrt ihre DNA-DSBs zu reparieren (Anstieg der Luciferase nach Bestrahlung pCMV Luc-L Kontrolle vs. pCMV Luc-L +IR: 22-prozentige Erhöhung) (Abb. 15). Vergleicht man die unbehandelte mit der linearisierten Gruppe (mit induzierten DNA-DSBs), fällt weiterhin auf, dass auch die alleinige CLQ-Behandlung, unabhängig von der Bestrahlung oder eingebauten DNA-DSBs, bereits zu einer Erhöhung der Luciferase-Aktivität führt (siehe pCMV Luc-sc +CLQ: 130 % bei 10 µg/ml CLQ, 156 % bei 20 µg/ml CLQ). Es kommt somit unabhängig von der durch Radiatio oder durch enzymatische Spaltung hervorgerufenen Anzahl an vorhandenen DNA-DSBs zu einer Aktivierung der Luciferase-Aktivität.

Auch im Vergleich der Bestrahlung (pCMV Luc-L) mit der unbehandelten Gruppe (pCMV Luc-sc) erscheint es unerwartet, dass es zu einer erhöhten Luciferase-Aktivität kommt, gleichbedeutend mit einer erhöhten Genaktivität von DNA-Reparaturenzymen in beiden Gruppen.

Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass der von CLQ medierte Effekt nicht nur auf der direkten Hemmung der DNA-DSB-Reparatur beruht und dass CLQ einen bedeutenden Einfluss auf die Expression des Reporter-Gens unabhängig von der Aktivierung der DNA-Schadensantwort hat. Daher scheint der Reporter-Gen-Assay wenig geeignet für die molekulare Untersuchung der CLQ-Wirkung. Allerdings erwecken diese Ergebnisse den Eindruck, dass CLQ nicht nur über direkten Weg die DNA-Reparaturvorgänge in Zellen zu hemmen vermag, sondern möglicherweise auch die Genexpression beeinflussen kann. In einem nächsten Versuch untersuchten wir daher, ob CLQ möglicherweise auch einen Einfluss auf die Genexpression hat.

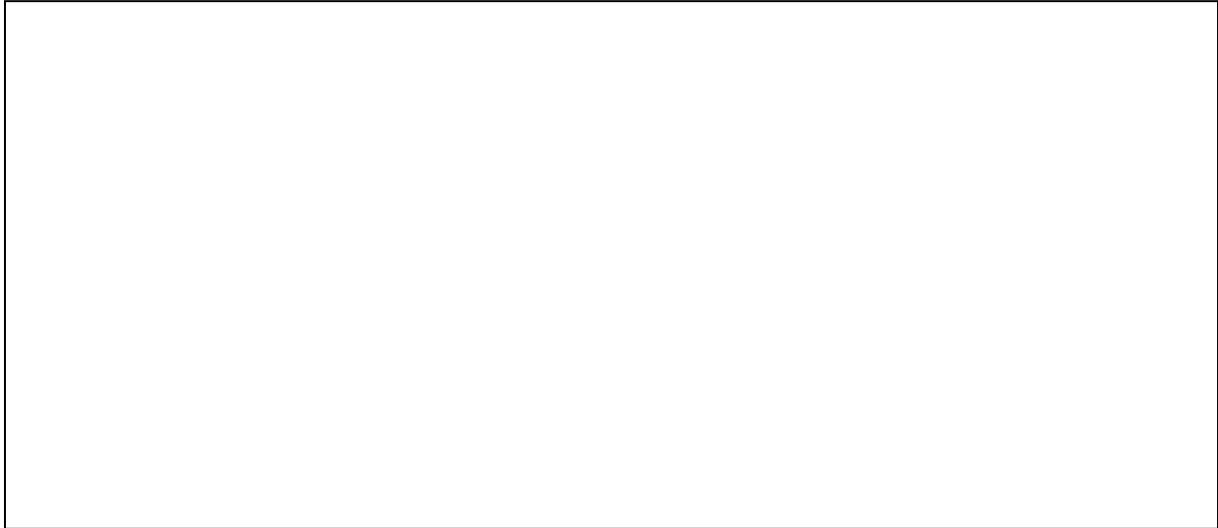


Abb. 15: DNA-Reparatur-Kapazität von G112-BTISC. Unbehandelt (Kontrolle), Bestrahlung mit 2,5 Gy (+IR), nach Chloroqingabe (+CLQ) sowie die Kombinationsbehandlung aus adjuvanter CLQ-Gabe zusätzlich zur Bestrahlung (+IR+CLQ). Auswertung der DNA-Reparatur-Kapazität von pCMV Luc-L sowie des Kontrollplasmides pCMV Luc-sc mithilfe des Reporter-Gen-Assays.

4.4.4 Der Einfluss von CLQ auf die Transkription von DNA-Schadensreparatur-relevanten Genen dargestellt mithilfe der Genexpressions-Analyse

Die Genexpressionsmuster in G112-BTISCs, entweder unbehandelt oder mit CLQ versetzt, wurden durch die *Microarray*-Analyse verglichen. Über 180 Gene zeigten eine abweichende Genexpression nach CLQ-Gabe und konnten so als potenzielle Angriffspunkte von CLQ identifiziert werden. Nach CLQ-Behandlung konnte eine vermehrte Genexpression einer Vielzahl von Genen nachgewiesen werden. Unter ihnen befinden sich Gene, die eine Schlüsselrolle in der DNA-Schadensantwort und der DNA-Reparatur spielen, wie EXO1, TOP2A, NEIL3, DDIT3 und PPP1R15A.

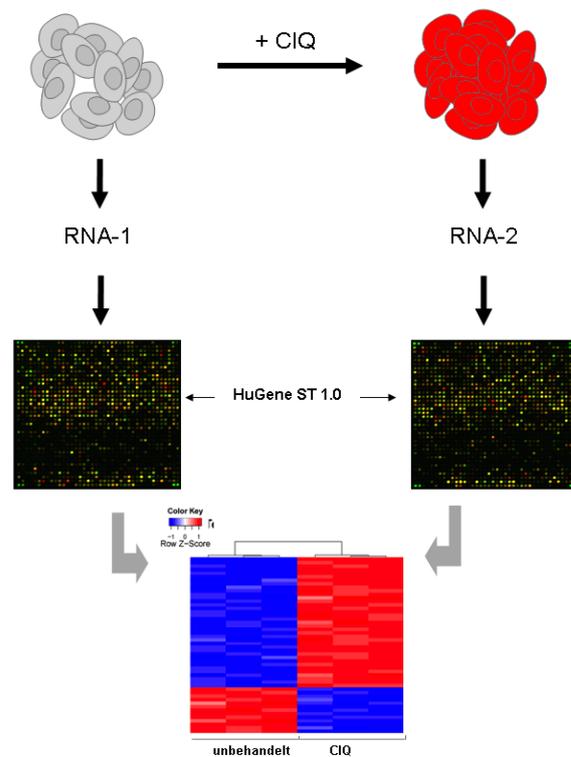


Abb. 16: Analyse der Beeinflussung der Expression von Genen durch CLQ. Unbehandelte (RNA-1) oder mit CLQ behandelte RNA-Stränge (RNA-2) wurden extrahiert und die Genexpressions-Analyse erfolgte mittels des HuGeneST1.0 arrays (Transkriptom Labor, UMG Göttingen). Der untere Abbildungsteil zeigt die Top 50 Zielgene, deren Expression durch CLQ inhibiert (blau) oder induziert (rot) wurde.

Diese Ergebnisse zeigen, in Übereinstimmung mit dem Reporter-Gen-Assay, dass CLQ auch die Transkription von Genen beeinflusst. So wird die Vermutung nahegelegt, dass CLQ die DNA-Reparatur durch Regulierung der Expression von Zielgenen der DNA-Schadens-Reparatur-Antwort beeinflusst.

5 Diskussion

Bisherige Studien unterstrichen wiederholt den unterstützenden Effekt einer Chloroquin-Behandlung in Kombination mit der konventionellen Therapie an Glioblastom-Patienten (Briceno et al. 2007; Briceno et al. 2003; Sotelo et al. 2006), ohne jedoch die molekularen Grundlagen der Therapie weiter zu charakterisieren. Unsere Arbeit konnte erstmalig die Inhibierung von DNA-Reparatur-Prozessen in Glioblastom-Stammzellen durch Chloroquin nachweisen und dessen Wirkung als *Radiosensitizer* in der Therapie des Glioblastoma multiforme herausarbeiten.

Glioblastoma multiforme stellt einen sehr heterogenen Tumorkomplex dar und besteht sowohl aus Tumorzellen sowie einer kleinen Population von Tumorstammzellen oder auch Tumor-initiiierenden Zellen (BTISCs) mit einem hohen tumorigenen Potenzial und einer niedrigen Proliferationsrate (Altaner 2008). Glioblastom-Stammzellen ähneln phänotypisch den normalen Stammzellen: Sie exprimieren CD133 und weitere für neuronale Stammzellen typische Oberflächenmarker und verfügen über das Potenzial zur Selbsterneuerung (Singh et al. 2004). Tumorstammzellen, die aus Gliomen gewonnen wurden, sind in der Lage, den polyklonalen Ursprungstumor zu rekapitulieren, wenn sie in die Gehirne immunsupprimierter Mäuse implantiert werden (Galli et al. 2004). Weitere Studien folgten und die Glioblastom-Stammzellen gelten seitdem als chemo- und radioresistent und daher verantwortlich für die Wachstumsprogression und das Wiederauftreten des Tumors nach konventioneller Therapie (Chalmers 2007; Frosina 2009).

Die Radiotherapie gilt heutzutage als Therapie der Wahl in der Glioblastoma-multiforme-Behandlung, jedoch kommt es fast ausnahmslos zur Rekurrenz der Tumoren trotz Bestrahlung. Die intrinsische Radioresistenz dieser Tumore stellt dabei einen bedeutenden Faktor für das Therapieversagen dar. Bao et al. gelang 2006 erstmals der Nachweis, dass es nach der Bestrahlung von Glioblastomen zu einem Anstieg des Anteils an Zellen kommt, welche Stammzellmarker wie Nestin, CD133 und Sox-2 exprimieren (Bao et al. 2006a). Als Ursache der beobachteten Radioresistenz fanden sie eine Aktivierung von Signalwegen der Schadensreparatur, sowie die Erhöhung der DNA-Reparatur-Kapazität in dieser distinktiven Zellpopulation. Somit wären weit über gewebeverträglich-hinausgehende Dosen Radiotherapie zum Erreichen der vollständigen Regression des Tumors erforderlich. Um eine möglicherweise kurative Therapie für an GBM erkrankte Patienten zu entwickeln, galt unser Interesse daher in einem ersten Schritt die Untersuchung der Resistenzmechanismen dieser distinktiven Subpopulation auf Grundlage der durch Bao formulierten These.

Wir testeten dafür zunächst das Ansprechen der selektierten BTISC-Linie der parenteralen Zelllinie G112 auf die Bestrahlung mit ionisierender Strahlung in vitro mit der klinisch relevanten Dosierung von 2,5 Gy. Die Auswertung des Neurosphärenformationspotenzials

(entspricht dem Wachstumsverhalten der Tumorstammzellen) der bestrahlten Zellen ergab dabei eine annähernd ähnliche Anzahl von Neurosphärenkolonien im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe, die ausgeprägte Radioresistenz dieser Zellen aufzeigend.

Im Verlauf der Bestrahlung von Tumorpatienten kommt es nach mehreren Zyklen Radiotherapie zur Ausbildung radioresistenter Tumorzellklone, die durch ihre weitere ungehinderte Proliferation nach abgeschlossener Behandlung zum Therapieversagen führen. In den bisher beschriebenen Experimenten führten wir die Bestrahlung der Zellen nur einmalig mit 2,5 Gy ionisierender Strahlung durch. Es stellte sich daher für uns die Frage, vor allem in Hinblick auf die tatsächlich in der Therapie von GBM eingesetzte Gesamtdosis der fraktionierten Radiotherapie von ca. 60 Gy, ob die wiederholt durchgeführte Bestrahlung eine Radioresistenzentwicklung in den Zellen verhindern kann. Dieses Experiment spiegelt auch die Problemstellung wider, ob eine erneute Bestrahlung eines Patienten mit einem Glioblastom-Rezidiv sinnvoll wäre. Wir wählten daher eine gesichert radioresistente Subpopulation, welche durch sieben Zyklen Bestrahlung von G112-BTISC-Zellen selektiert werden konnte und in unserem Labor in Langzeitkultur gehalten wird. Die Auswertung der Neurosphärenanzahl nach Bestrahlung mit 2,5 Gy ergab für diese Zelllinie sogar ein vermehrtes Wachstum. Unser Ergebnis verdeutlicht die extensive Fähigkeit der GBM-Tumorstammzellen, sich an jegliche Umweltbedingungen zu adaptieren, und ihre Fähigkeit, intrinsische Radioresistenz zu entwickeln.

Als Nächstes stellte sich die Frage nach dem Mechanismus dieser Resistenzbildung. Ergebnisse mehrerer Studien legten die Vermutung nahe, dass die Ineffektivität derzeitiger Chemo- und Radiotherapien auf eine Reihe von Resistenzmechanismen zurückzuführen ist, wobei als ein möglicher Mechanismus der Radioresistenz die bereits beschriebene Aktivierung von DNA-Reparatur-Prozessen gilt (Bao et al. 2006a; Frosina 2009). Obwohl bekannt ist, dass ionisierende Strahlung die Zellen durch verschiedene Mechanismen schädigt, gilt als letaler Effekt nach IR die Auslösung von DNA-Schäden, primär von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs). Phosphorylierung des Histons H2AX zu γ -H2AX stellt eine der ersten Veränderungen an den Orten des DNA-Schadens dar und ermöglicht die Reparatur der Strangbrüche durch Aufrechterhaltung struktureller Veränderungen des Chromatins. Obwohl bisweilen nicht restlos geklärt ist, ob die Phosphorylierung von H2AX spezifisch für DNA-Doppelstrangbrüche ist, korreliert die Nummer an γ -H2AX-positiven Zellen, die durch Immunfluoreszenz visualisiert werden kann, eng mit der Höhe der DNA-DSB-Reparaturantwort (Fernandez-Capetillo et al. 2003; Rogakou et al. 1998). Nach immunfluoreszenter Färbung der bestrahlten G112-BTISC-Zellen für phosphoryliertes H2AX stellten wir fest, dass es in den Glioblastom-Stammzellen bereits 30 Minuten nach Bestrahlung zu einem hohen Prozentsatz von γ -H2AX-positiven Zellen kam, deren Wert sich nach etwa vier bis fünf Stunden wieder dem Ausgangswert annäherte. Unsere Ergebnisse

decken sich so mit den Aussagen in der Literatur, die ebenfalls eine maximale Phosphorylierung von H2AX 30 bis 60 Minuten nach Einwirkung von DNA-Schäden beschreiben (MacPhail et al. 2003; Rogakou et al. 1998). Dies lässt auf eine schnelle und sehr effiziente DNA-DSB-Reparatur-Kapazität schließen. Die kurze Zeitspanne bis zum Anlaufen des DNA-Reparaturapparates legt die Vermutung nahe, dass die Glioblastom-Stammzellen möglicherweise vor allem den *Non homologous end joining* (NHEJ)-Pfad zur Schadensreparatur nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung nutzen. Dieser in Säugerzellen vorherrschende Weg zur Reparatur von DNA-Schäden ist schnell, gilt jedoch auch als fehleranfälliger im Vergleich zur Homologen Rekombination (HR), die gewöhnlich erst längere Zeit nach Schadensmeldung anläuft (Wyman et al. 2004).

Mithilfe des Dualen-Luciferase-Assays™ könnten wir dann überprüfen, ob der DNA-Reparaturapparat in Glioblastom-Stammzellen grundsätzlich erhöht ist oder nur die Bestrahlung der Zellen eine Aktivierung der DNA-Reparatur-Signalkaskade induziert. Beim Luciferase-Assay kommt es nur zu einem detektierbaren Lichtsignal, wenn die Zellen in der Lage sind, den vorher in Form von Doppelstrangbrüchen enzymatisch gespaltenen Plasmid mit der Information für die Expression der Firefly-Luciferase wieder zu reparieren (Thoms et al. 2007). In unseren Versuchen stellten wir dabei fest, dass die DNA-Reparaturvorgänge in G112-BTISCs nicht grundsätzlich aktiviert sind, sondern dass es erst nach der Bestrahlung der Zellen mit ionisierender Strahlung zu einer Aktivierung der DNA-DSB-Reparatur kommt. Ohne Bestrahlung kam es nach Einbau des gespaltenen Plasmides auch nach mehreren Tagen nicht zu einer Erhöhung des Lichtsignals, gleichbedeutend mit nicht erfolgter Reparatur der Schäden.

Unsere Ergebnisse hinsichtlich der Charakterisierung der Reparatur-Kapazität decken sich mit diversen Studien, die zu diesem Thema bereits durchgeführt wurden. Bao et al. stellten fest, dass Tumorstammzellen radioresistent durch Aktivierung von Schadenssignalkaskaden inklusive Phosphorylierung der Effektor-kinasen Chk1 und 2 sowie durch die Erhöhung von DNA-Reparatur-Prozessen nach Bestrahlung sind (Bao et al. 2006a). Eine weitere Studie zur DNA-Reparatur-Kapazität mit Glioblastomzelllinien, welche die Kriterien für Stammzellen nach Vescovi et al. erfüllten, bestätigte ebenfalls die Resistenz dieser Zellen gegenüber ionisierender Strahlung, konnten jedoch direkt nach Bestrahlung keine Erhöhung von Proteinen der DNA-Reparatur feststellen (McCord et al. 2009; Ropolo et al. 2009). Sie fanden ebenfalls eine Phosphorylierung von Proteinen der Schadenssignalkaskade (Chk1 und 2), denen neben Proteinen zur DNA-Reparaturaktivierung auch Proteine für die Zellzykluskontrolle nachgeschaltet sind. Es kam so zu einem Wachstumsstillstand in der präreplikativen G2-Phase, wodurch den Zellen genug Zeit bleibt, die geschädigte DNA zu reparieren. Diese Untersuchungen könnten sich auch mit unseren decken, da bereits nachgewiesen werden konnte, dass es in Zellen nach DNA-Schäden zur Aktivierung der

übergeordneten Proteinkinasen ATM und ATR parallel zur Initiierung von DNA-Schäden auch zur Aktivierung von Zellzyklusproteinen wie Chk 1 und 2 mit dem Ergebnis des Zellzyklusarrestes kommt (Kastan und Bartek 2004). In der Tat zeigte eine kürzlich veröffentlichte Studie von Chen und seinen Kollegen Radioresistenz und erhöhte Aktivierung der Zellzyklus-Kontrollproteine in mesenchymalen Stammzellen, die aus adultem Knochenmark entstammen (Chen MF et al. 2006). Auch die partielle Steigerung der Bestrahlungstoleranz, die wenige Monate nach ZNS-Bestrahlung auftritt (Krishnan et al. 2006; Nieder et al. 2007), impliziert die Möglichkeit der Regeneration von Zellen, die wahrscheinlich eine Stammzellkomponente voraussetzt (Chalmers 2007).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Glioblastoma multiforme einen sehr heterogenen Tumor darstellt, der aus diversen Zelltypen konzipiert ist, die sich phänotypisch, sowie in ihrer Radioresistenz und ihrer Kapazität zur Reparatur von DSBs unterscheiden. Im Einklang mit der Mehrzahl aller Studien fanden auch wir, dass Glioblastom-Stammzellen effizienter als normale Tumorzellen die DNA-Schäden, die nach Bestrahlung entstehen, reparieren können und durch diesen Mechanismus resistent gegenüber Strahlung sind. Sie sind durch Aktivierung zentraler Proteine der Schadensreparatur, deren primärer Effekt in der Induktion von Zellzyklusarrest liegt, in der Lage, einen Zellzyklusverbleib präreplikativ zu initiieren, um genug Zeit für die Reparatur der durch IR ausgelösten DNA-Schäden zu haben (Bao et al. 2006a).

In Vorarbeiten in unserem Labor wurden die Auswirkungen von Chloroquin auf das Zellwachstum von verschiedenen etablierten Glioblastomzelllinien mit unterschiedlichem funktionellen p53-Status untersucht. Es zeigte sich, dass die CLQ-Wirkung durch p53-abhängige Induktion von Apoptose in den Glioblastomzellen hervorgerufen wird (Kim EL et al. 2010). Hieraus lässt sich schließen, dass die CLQ-Behandlung über eine DNA-Interkalation in einer anhaltenden Stabilisierung des p53-Proteins resultiert und die Transkription von p53 induziert. Es kommt so bei den Zelllinien mit Wildtyp p53-Aktivität zu einem Verschieben des Gleichgewichtes der p53-Signalkaskaden zugunsten der Apoptose. Die Erkenntnis, dass CLQ auch eine inhibierende Wirkung auf die stammzellähnliche Kultur G112-BTISC hat, lässt sich jedoch nicht durch die p53-vermittelte Apoptose-Aktivierung erklären, da das p53-Gen in der G112-Zelllinie durch Mutation innerhalb des Codons 273 mutiert ist und transkriptionell inaktives p53 exprimiert. Die Mechanismen der p53-unabhängigen zytotoxischen Wirkung von CLQ wurden bisher nur wenig erforscht. Unsere Ergebnisse, dass CLQ auch einen Einfluss auf die Transkription hat, bergen neue Erkenntnisse bezüglich der p53-unabhängigen Wirkung der durch CLQ mediierten Zellschädigung.

Wir konnten in unseren Versuchen erstmals nachweisen, dass die letale CLQ-Wirkung auf die Zellen nicht auf die vermehrte Auslösung von DNA-Schäden durch CLQ zurückzuführen

ist, da die Rate an γ -H2AX-positiven Zellen nach CLQ-Gabe nicht erhöht ist. Auch Loehberg et al. fanden keine γ -H2AX-Aktivierung nach der CLQ-Behandlung von MCF10A-Mammakarzinomzellen, nahelegend, dass die ATM-vermittelte p53-Aktivierung von CLQ nicht auf die Auslösung von DNA-Schäden durch CLQ zurückzuführen ist (Loehberg et al. 2007). Angaben von physiochemischen Studien legen nahe, dass CLQ einen Komplex mit der DNA bildet (Sternglanz et al. 1969; Waring 1970), welcher zu Defekten in der DNA-Synthese und DNA-Reparatur führt (Field et al. 1978; Haworth et al. 1983; Michael und Williams 1974; Sartorius und Schneider 1995). Direkte DNA-Schäden durch die kovalente Bindung wurden nicht beobachtet (Mitscher 2005). Einige Forscher postulieren, dass die endständige N-Diethylamino-Seitenkette des CLQ möglicherweise für die DNA-Interkalation ohne direkte DNA-Schädigung verantwortlich sei (Chatterjee et al. 1998; Mitscher 2005). Die nachgewiesene Verbindung mit der kleinen „Furche“ der DNA führt zu einer Beeinflussung mit der Assoziation von DNA-bindenden Proteinen und Enzymen (Michael und Williams 1974; O'Brien et al. 1966). Hierin liegt auch der Grund, warum es durch die CLQ-Behandlung zu einer Inhibierung anderer DNA-interkalierender Substanzen wie der Topoisomerase I und II kommt (Snyder 2000; Solary et al. 1994; Sorensen et al. 1997).

Sotelo et al. konnten in drei klinischen Studien durch CLQ-Gabe eine eindrucksvolle Steigerung der anti-tumoralen Wirkung von Carmustin bei Patienten mit GBM beweisen (Briceno et al. 2007; Briceno et al. 2003; Sotelo et al. 2006). Mindestens zwei Theorien zum therapeutischen Nutzen im Zusammenhang mit der CLQ-Behandlung wurden vorgeschlagen. So wirkt CLQ durch seine starke DNA-Interkalation antimutagen und es kommt so zur Verhinderung der Entwicklung Therapie-resistenter Tumorzellklone.

Den zweiten Weg der CLQ-Wirkung vermuten Sotelo et al. über die lysosomotrophe (d. h. die bevorzugte Anreicherung in den Lysosomen) Wirkungsweise von CLQ. Es kommt somit durch Volumenzunahme dieser Zellorganellen zu einer Ruptur der gesamten Zelle. Dieser Mechanismus gilt bereits als etablierte Wirkungsweise von CLQ. So konnte nachgewiesen werden, dass CLQ in Mammakarzinom-Zelllinien die Apoptose durch Destabilisation lysosomaler Membranen mit nachfolgender Mitochondrien-Membran-Depolarisation und Aktivierung von Caspasen, induziert (Boya et al. 2003). Als weitere bedeutende Wirkung von CLQ gilt die selektive Sensibilisierung von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika. Dieser Weg scheint ebenfalls über den lysosomotrophen Mechanismus von CLQ mediiert zu sein. Es kommt nachgewiesenermaßen nach CLQ-Gabe durch den Anstieg des lysosomalen pH-Wertes zu einer selektiven Sensibilisierung von Tumorzellen für Chemotherapeutika in einer Vielzahl von Tumoren und genetischen Variationen (Boyer und Tannock 1992; Newell et al. 1993; Vaupel et al. 2002).

Die Auslösung von Autophagie ist ein weiterer wichtiger Weg zum Erreichen von Tumorodalizität. Autophagie gilt neben Apoptose und Nekrose als dritte morphologische Art

des Zelltodes (Clarke DM et al. 1999; Clarke PJ 1990; Schweichel und Merker 1973). Der autophagische Zelltod zeigt dabei Merkmale sowohl des apoptotischen als auch nekrotischen Zelltodes und ist ein katabolischer Prozess, welcher durch das Auftreten autophagozytischer Vakuolen charakterisiert ist (Xie und Klionsky 2007). Diese entstehen hauptsächlich durch Selbstdigestion von Zytoplasmaorganellen in den Lysosomen (Kondo et al. 2005). Eine mögliche anti-tumorale Wirkung über Auslösung von Autophagie wird derzeit bei einer Vielzahl von Agenzien untersucht und deren möglicher therapeutischer Nutzen kontrovers diskutiert. Auch CLQ wurde diesbezüglich erforscht. So kommt es nach CLQ-Gabe zur Hemmung des Zellwachstums in A549-Bronchial-Karzinomzellen (Fan et al. 2006). Die Autoren fanden heraus, dass CLQ in niedriger Dosierung nachgewiesenermaßen zytotoxisch über die Auslösung von Autophagie mit Anstieg der sauren Vakuolen in der Zelle wirkt, während in höherer Dosierung der anti-apoptotische Effekt im Vordergrund steht. Versuche von Amaravadi et al. zur CLQ-Behandlung von Lymphomzellen in p53-defizienten Mäusen zeigten ebenfalls einen Anstieg von autophagischen Vakuolen. Vielmehr kommt es CLQ-induziert zur Formation autophagischer Vesikel mit dem Ergebnis der Tumorregression und einer Verzögerung der Tumorrekurrenz (Amaravadi et al. 2005; Amaravadi et al. 2007). Ein weiterer vielversprechender neuer Ansatz ist die Nutzung von antiangiogenetischen Substanzen wie dem VEGF-Inhibitor Bevacizumab in der Behandlung von GBM (Jain 2008). Jedoch kam es auch hier zu einer Rezidiv-Rate von 40 bis 60 Prozent nach initial erfolgreicher Behandlung (Vredenburgh et al. 2007). Die Kombination mit Chloroquin führte auch hier über eine Prävention der Hypoxie-induzierten Autophagie in den Tumorzellen zu einer Überwindung dieses Resistenzmechanismus und erste erfolgversprechende Studien existieren (Hu YL et al. 2008).

In unseren Untersuchungen konnten wir erstmals den synergistischen Effekt der Kombinationsbehandlung von CLQ und Radiotherapie auf Glioblastomzellen mit mutiertem p53 nachweisen. Um einen additiven Effekt von CLQ zusätzlich zur Strahlentherapie zu beweisen, bestimmten wir zunächst die erforderliche Dosierung, innerhalb welcher CLQ einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum der Glioblastomzellen hat, ohne jedoch zum Zelltod zu führen. In der Kombinationsbehandlung von CLQ mit Strahlentherapie zeigte sich dann eine signifikante Wachstumshemmung, sowohl bei der etablierten Glioblastomzelllinie G112 als auch bei den Stammzellen (G112-BTISC) und auch bei der gesichert radioresistenten stammzellähnlichen Kultur (G112-BTISC-rad).

Bezüglich des Mechanismus der CLQ-medierten Zytotoxizität stellten wir bei Untersuchung der DNA-DSB-Reparatur mithilfe der immunfluoreszenten Färbung für phosphoryliertes H2AX, fest, dass es im direkten Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle nach adjuvanter CLQ-Gabe zu einer Inhibierung der DNA-Schadensreparaturantwort kommt, repräsentiert durch die deutlich erniedrigte Anzahl γ -H2AX-positiver Zellen nach Bestrahlung. Die

Tumorzellen sind somit nicht mehr fähig, die nach Bestrahlung entstandenen DNA-Doppelstrangbrüche zu reparieren und es kommt zum Wachstumsstillstand bzw. zum Zelltod.

In diesem Zusammenhang erscheint die Fähigkeit des Chloroquins, unterschiedliche Arten der DNA-Reparatur zu inhibieren, bedeutsam (Cohen und Yielding 1965; Michael und Williams 1974; Yielding et al. 1970). Wie wir bereits beschrieben haben, gilt die Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen in Glioblastom-Stammzellen durch zytotoxisches Therapieregime wie Strahlentherapie als einer der Hauptgründe für das Auftreten von Tumorrezidiven (Bao et al. 2006a). Somit ergibt sich hieraus ein Ansatzpunkt zum Einsatz von Chloroquin in Kombination mit etablierten DNA-schädigenden Therapien, wie z. B. ionisierender Strahlung oder TMZ bzw. BCNU. Obwohl eine Erhöhung des Bestrahlungseffektes von kultivierten Tumorzellen durch die Gabe von CLQ schon lange bekannt ist (Kim SH et al. 1973), sind die Mechanismen der CLQ-medierte Toxizität noch nicht vollständig erforscht. Daten dieser Untersuchungen legten schon damals nahe, dass die Verstärkung der Strahlentherapie-Wirkung auf einer Inhibierung von Reparatur-Prozessen in den Zellen nach Bestrahlung beruht.

Es existieren jedoch auch andere Theorien bezüglich des Wirkmechanismus von CLQ in der Kombinationsbehandlung mit Radiotherapie. CLQ scheint weiterhin oxidativen Stress in metabolisch aktiven Zellen, wie humanen Astroglia-Zellen, anzuhäufen. Toler und Sharma behaupten, dass CLQ synergistisch zum oxidativen Stress, der durch die Strahlentherapie hervorgerufen wird, wirkt (Toler et al. 2006). Dieser Effekt wäre auch übereinstimmend mit dem bekannten pharmakologischen Effekt von CLQ in Plasmodium. Briceño und Reyes führen den Kombinationseffekt der CLQ-Behandlung ebenfalls auf die DNA-interkalierenden Eigenschaften zurück, erklären jedoch den synergistischen Effekt durch die mit der Konformationsänderung der DNA einhergehende Prävention der Entstehung therapieresistenter Klone (Briceno et al. 2003). Es ergeben sich jedoch mindestens zwei Unklarheiten in ihrer Theorie. Erstens gibt es bisher keine weiteren Studien, die auf eine antimutagene Wirkungsweise von CLQ deuten (Chatterjee et al. 1998; Xamena et al. 1985). Zweitens würde man bei einem antimutagenen Medikament eher einen verstärkenden Effekt bei gleichzeitiger Radio- und Chemotherapie erwarten, da durch die Behandlung ausgelöste Mutationen erst zur erwünschten Zytotoxizität führen.

Eine andere Theorie besagt, dass die Radiosensibilisierung von MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen, die durch CLQ hervorgerufen wird, auf deren lysosomotrophen Effekt zurückzuführen ist (Zhao et al. 2005). Protonenaufnahme durch CLQ als kationisch-amphiphatisches Molekül resultiert wie bereits erwähnt aus der Unfähigkeit des Medikamentes, Membranen zu passieren. CLQ ist quasi „gefangen“ in den Zellorganellen, wie z. B. den Lysosomen, und führt dort zur Anhebung des intravesikulären pHs mit

anschließender Membranruptur (Volkl et al. 1993). Bisher konnte der radiosensibilisierende Effekt bei anderen amphiphatischen kationischen Substanzen wie Amitryptilin, Fluoxetin oder Ammoniumchlorid nicht nachgewiesen werden. Die beobachtete Zellnekrose aufgrund der lysosomalen Membranruptur, die als Spätfolge der CLQ-Gabe und Bestrahlung beobachtet werden kann, lässt sich wohl eher durch die Peroxidation lysosomaler Membranlipide aufgrund der prooxidativen Eigenschaften von CLQ erklären (Toler et al. 2006). Weiterhin zeigten in den Studien von Zhao und Mitarbeitern beide Gruppen, sowohl die mit CLQ vorbehandelte, als auch die unbehandelte, 48 Stunden nach Bestrahlung die gleiche Apoptose-Rate. Es zeigt sich vielmehr, dass der Effekt von CLQ in Kombinationsbehandlung auf einem anderen Mechanismus der CLQ-Wirkung als nur der p53-vermittelten Apoptose-Induktion beruhen muss.

Ebenfalls nicht durch die lysosomotropen oder prooxidativen Eigenschaften des CLQs ist der nach CLQ-Gabe auftretende Zellzyklusarrest in der G1/G0-Phase und Inhibierung des Eintrittes in die DNA-Replikationsphase der Tumorzellen zu erklären (Zhao et al. 2005). Dies spricht eher für die in zahlreichen Studien belegte Fähigkeit von CLQ, eine kovalente Bindung mit der DNA einzugehen, die in Konformationsänderungen der DNA ohne Auslösung von direkten DNA-Schäden resultiert. Diese Strukturveränderungen führen so zu der von uns beobachteten Inhibierung des normalen Ablaufs der DNA-DSB-Schadensreparatur der durch ionisierende Strahlung entstandenen Schäden und somit zu einem vermehrten Zelltod der Zellen nach Bestrahlung. Weiterhin könnten diese DNA-Strukturveränderungen von DNA-Replikationsenzymen erkannt werden und es kommt zu einer Behinderung des normalen Ablaufes der Replikation und zum beobachteten Zellzyklusarrest.

Obwohl die Ergebnisse der Voruntersuchungen darauf hindeuten, dass maligne Gliomzellen mit mutiertem p53 nur bedingt auf eine alleinige Behandlung mit Chloroquin ansprechen, könnte Chloroquin sehr wohl einen Stellenwert in der adjuvanten Therapie des Glioblastoma multiforme erlangen. Sotelo und seine Mitarbeiter zeigten 2007 in einer initialen klinischen Studie mit neun Patienten pro Gruppe einen Anstieg der Überlebenszeit nach adjuvanter Gabe von Chloroquin zum konventionellen Therapieregime, bestehend aus Radiotherapie und Carmustin (33 ± 5 Monate), relativ zur konventionellen Therapie plus Placebo (11 ± 2 Monate). In einer zweiten Follow-up-Studie mit jeweils 15 Patienten pro Kollektiv stieg die mediane Überlebenszeit ebenfalls von elf Monaten, nach Standardtherapie plus Placebo, auf 24 Monate mit zusätzlicher Gabe von Chloroquin; und obwohl diese Resultate an der statistischen Signifikanz bezüglich der Anzahl an Probanden scheiterte, ist ein Trend zum Anstieg der Überlebenszeit bei dem mit Chloroquin behandelten Arm deutlich.

Neben seiner klinischen Wirksamkeit bietet der Einsatz von CLQ diverse weitere Vorteile. So handelt es sich bei CLQ um ein preisgünstiges Medikament und damit um eine kosteneffektive Therapiealternative für Patienten, die sich Temozolomid nicht leisten können.

Seit seiner Einführung in die klinische Praxis 1947 für die Prophylaxe-Behandlung der Malaria gilt CLQ noch heute als Mittel der Wahl aufgrund seiner hohen Effektivität und guten Verträglichkeit beim Menschen. Ferner wird es weitgehend genutzt zur Behandlung chronischer Entzündungszustände wie Lupus Erythematoses und Rheumatoider Arthritis und zeigt auch in der Langzeitanwendung ein überschaubares und über die Jahre gut studiertes Nebenwirkungsprofil. Somit ergibt sich als entscheidender Vorteil gegenüber neu entwickelten Medikamenten: die fehlende Notwendigkeit langwieriger und aufwendiger Tierexperimente oder Phase I klinischer Studien vor der Anwendung von CLQ auch in der anti-tumoralen Therapie.

Als DNA-Interkalator ist CLQ in der Lage, die DNA-DSB-Reparatur von Glioblastomzellen nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung zu hemmen. Diese und weitere einzigartige Fähigkeiten von CLQ sind möglicherweise wichtig für die Verstärkung des Zelltodes von zytotoxischen Therapiemodalitäten bei einer Vielzahl von Tumorentitäten mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund (Amaravadi et al. 2007; Carew et al. 2006; Maclean et al. 2008; Zhao et al. 2005). Die publizierten Daten zusammenfassend, empfiehlt sich die Kombination von CLQ mit anderen Therapien als eine erfolgversprechende Alternative mit gesteigerter therapeutischer Effektivität bei einer vergleichsweise niedrigen Nebenwirkungsrate. Diverse klinische Studien zum Einsatz von CLQ und unterschiedlichen Therapien sind bereits in der Testphase. Die Ergebnisse dieser Studien werden voraussichtlich wegweisend für die zukünftige Bedeutung und weiterführende Forschung von CLQ in seiner Rolle als Adjuvans in der Tumorthherapie sein. Mit dem voranschreitenden Wissenszuwachs bezüglich der Mechanismen der CLQ-Wirkung in normalen und Tumorzellen werden wir in der Lage sein, noch spezifischere Kombinationstherapien mit niedrig dosierten spezifischen Signalinhibitoren und CLQ entwickeln zu können, um so die Effizienz zu steigern und die Nebenwirkungen weiter zu verringern. Weiterhin sind wir mit dem heutigen Wissensstand fähig, neue CLQ-Analoga zu entwickeln, die durch Modifikation der Seitenketten eine noch spezifischere anti-tumorale Wirkung besitzen. Diese „maßgeschneiderte“ Kombinationsbehandlung wird sicherlich eine sehr leistungsstarke Möglichkeit zur Kontrolle vieler verschiedener Tumorarten bieten.

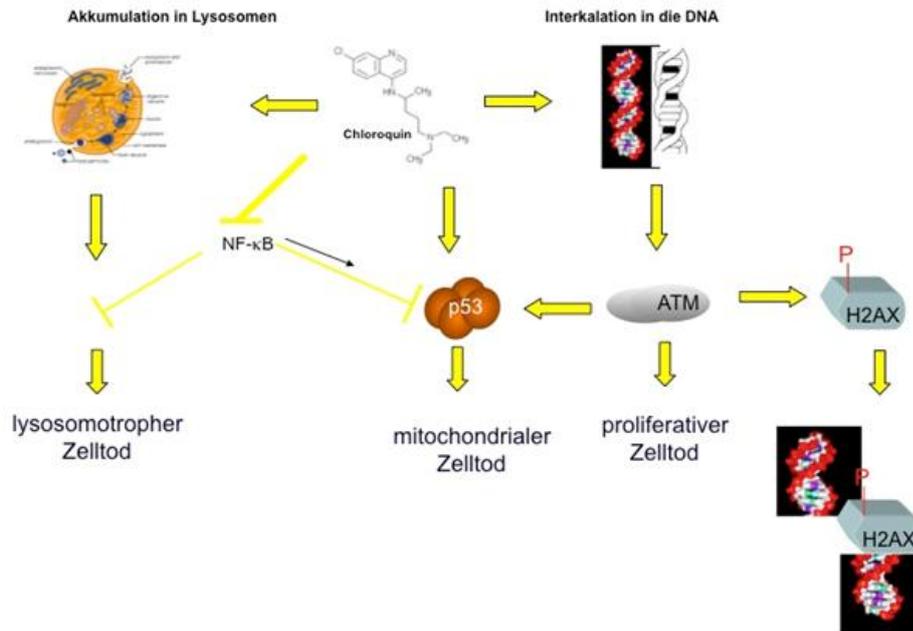


Abb. 17: Übersicht über zelluläre Signalwege, die durch Chloroquin beeinflusst werden.

6 Zusammenfassung

Beim Glioblastoma multiforme handelt es sich um eine Tumorentität mit einer außerordentlich schlechten Prognose nach Diagnosestellung und die durchschnittliche Überlebenszeit aller Patienten liegt bei ca. einem Jahr nach Diagnosestellung (Holland 2001; Kleihues et al. 2002). Während solide Tumoren häufig geheilt werden können, wenn sie in einem frühen Stadium entdeckt werden, neigen selbst kleine Glioblastome nach totaler Resektion zur Tumorrekurrenz und führen zum Tod des Patienten im Mittel zwei Jahre nach Diagnosestellung. Die Aggressivität des Glioblastoma multiforme zeigt sich dabei vor allem in seinem klinischen Verhalten gegenüber konventionellen Therapien. Als Standardtherapie gilt heute die totale chirurgische Resektion gefolgt von fraktionierter Radiotherapie. Obwohl ein transientes Ansprechen des Tumors auf die Therapie beobachtet werden kann, ist in den meisten Fällen eine Rekurrenz zu beobachten und der Tumor tritt gewöhnlich in dem Gebiet wieder auf, das eine intensive zytotoxische Behandlung erhalten hat (Lee SW et al. 1999). Dies legt die Vermutung nahe, dass eine Subpopulation von resistenten Zellen für das erneute Wachstum des Tumors verantwortlich ist. Die Versuche, die Überlebensrate durch Erhöhung der Strahlendosis zu erhöhen, führten zu Nekrosen des umgebenden gesunden Hirngewebes und so zu einer Dosis-Limitierung, bevor signifikante lokale Tumorkontrolle erreicht werden konnte. Alternative Methoden, um diese Resistenzentwicklung zu unterbinden, sind somit dringend erforderlich. Die Sensibilisierung von Glioblastomzellen für Radiotherapie birgt Hoffnung, benötigt aber ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen, die für die Radioresistenz verantwortlich sind. Zusammenfassend legen unsere Ergebnisse die Vermutung nahe, dass die BTICs für die Radioresistenz der Glioblastome verantwortlich sind und dass die Aktivierung von DNA-Reparatur-Prozessen ein Hauptmechanismus dieser Resistenzbildung ist. Wenn die Tumorrekurrenz durch die radioresistenten Stammzellen hervorgerufen wird, sollte das spezifische Abzielen auf deren Resistenzmechanismen, die wir bereits vorangehend postuliert haben, das therapeutische *Outcome* der Radiotherapie entscheidend steigern. Es ist uns so durch adjuvante Anwendung von Chloroquin vor Bestrahlung gelungen, die Tumorstammzellen in vitro für die Anwendung von Strahlentherapie zu sensibilisieren.

7 Anhang: Abbildungen 18, 19

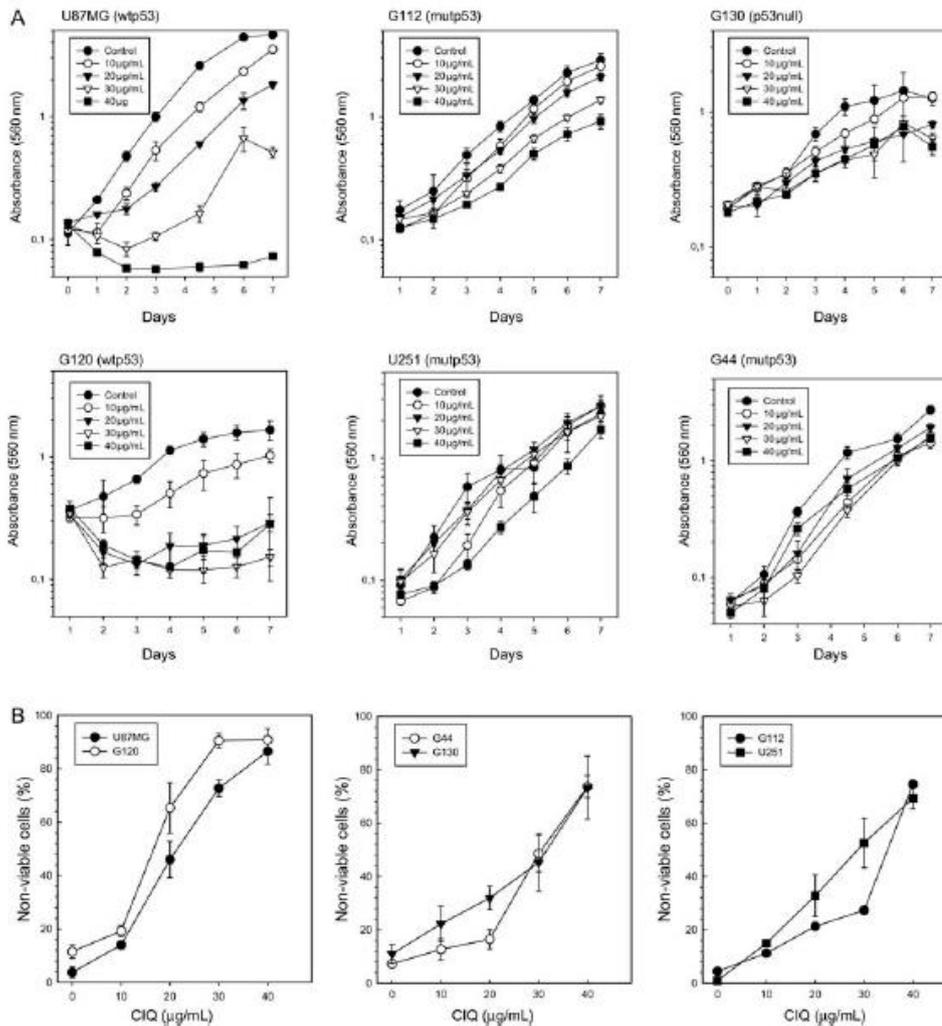


Abb. 18: Chloroquin inhibiert das Wachstum und die Lebendigkeit der Glioblastomzellen p53-abhängig.
A Darstellung der Wachstumsraten von Glioblastomzelllinien mit bekanntem funktionellen p53-Status.
B Darstellung der Zelltodrate von Glioblastomzelllinien mit wt-p53 (linkes Panel) oder defizienter p53-Funktion (mittleres und rechtes Panel).

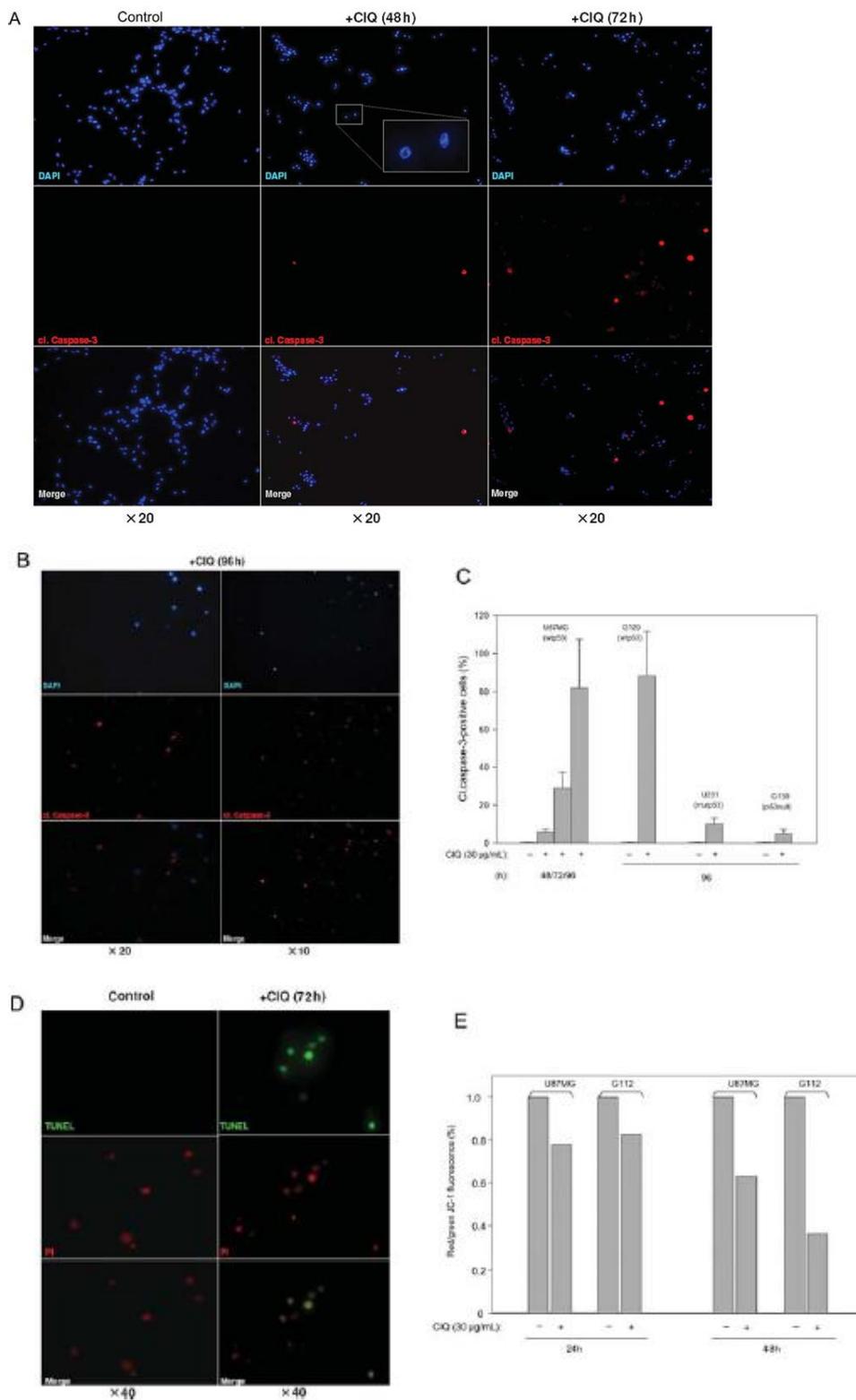


Abb. 19: CLQ induziert Apoptose in Standard-Glioblastomzelllinien. (A, B) Zeitabhängige Aktivierung von Caspase-3 durch CLQ in der Nicht-Stamm-Zelllinie U87MG. Unbehandelte oder mit CLQ behandelte Zellen wurden für die gespaltene Form von Caspase-3 gefärbt und mit DAPI gegengefärbt. Das weiße Kästchen in Abb. A zeigt die charakteristische nukleäre Morphologie mit CLQ behandelter Zellen. (C) Übersicht über die Auswertung der Caspase-3-Aktivierung in GBM-Zelllinien mit unterschiedlichem funktionellem p53-Status. (D) Ermittlung apoptotischer U87MG-Zellen mithilfe der TUNEL-Methode. (E) Der Effekt von CLQ auf die Integrität des Mitochondrien-Membran-Potenzials ermittelt durch immunfluoreszente Färbung für JC-1 bezüglich seiner Anreicherung in der Mitochondrien-Membran bei GBM-Zelllinien mit wtp53 (U87MG) oder mtp53 (G112). Der Anteil an rotem/grünem JC-1 wurde nach 24 oder 28 Stunden in den Zellen (unbehandelt oder mit CLQ behandelt) ausgewertet.

8 Literaturverzeichnis

- Alavi JB, Eck SL (2001): "Gene therapy for high grade gliomas." *Expert Opin Biol Ther* 1(2): 239–252.
- Ali S, King GD, Curtin JF, Candolfi M, Xiong W, Liu C, Puntel M, Cheng Q, Prieto J, Ribas A et al. (2005): "Combined immunostimulation and conditional cytotoxic gene therapy provide long-term survival in a large glioma model." *Cancer Res* 65(16): 7194–7204.
- Altaner C (2008): "Glioblastoma and stem cells." *Neoplasma* 55(5): 369–374.
- Amaravadi RK, Lippincott-Schwartz J, Yin XM, Weiss WA, Takebe N, Timmer W, DiPaola RS, Lotze MT White E (2005): "Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment." *Clin Cancer Res* 17(4): 654–666.
- Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, Bui T, Christophorou MA, Evan GI, Thomas-Tikhonenko A, Thompson CB (2007): "Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma." *J Clin Invest* 117(2): 326–336.
- Augustijns P, Geusens P, Verbeke N (1992): "Chloroquine levels in blood during chronic treatment of patients with rheumatoid arthritis." *Eur J Clin Pharmacol* 42(4): 429–433.
- AWMF "Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie." 4. überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2008.
- Bakkenist CJ, Kastan MB (2003): "DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation." *Nature* 421(6922): 499–506.
- Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN (2006a): "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response." *Nature* 444(7120): 756–760.
- Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, Hao Y, Li Z, Hjelmeland AB, Shi Q, McLendon RE, Bigner DD, Rich JN (2006b): "Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor." *Cancer Res* 66(16): 7843–7848.
- Becker N, Wahrendorf, J: "Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland – Atlas of Cancer Mortality in the Federal Republic of Germany 1981–1990." Springer Verlag, Heidelberg 1998.
- Beierwaltes WH, Varma VM, Counsell RE, Lieberman LM (1968): "Scintillation scanning of malignant melanomas with radioiodinated quinoline derivatives." *J Nucl Med* 9(9): 489–491.
- Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Garewal H (2002): "DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis." *Mutat Res* 511(2): 145–178.
- Black PM (1991): "Brain tumors. Part 1." *N Engl J Med* 324(21): 1471–1476.
- Boya P, Gonzalez-Polo RA, Poncet D, Andreau K, Vieira HL, Roumier T, Perfettini JL, Kroemer G (2003): "Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine." *Oncogene* 22(25): 3927–3936.
- Boya P, Gonzalez-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Metivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T et al. (2005): "Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis." *Mol Cell Biol* 25(3): 1025–1040.
- Boyer MJ, Tannock IF (1992): "Regulation of intracellular pH in tumor cell lines: influence of microenvironmental conditions." *Cancer Res* 52(16): 4441–4447.
- Breckenridge AM, Winstanley PA (1997): "Clinical pharmacology and malaria." *Ann Trop Med Parasitol* 91(7): 727–733.
- Briceno E, Reyes S, Sotelo J (2003): "Therapy of glioblastoma multiforme improved by the antimutagenic chloroquine." *Neurosurg Focus* 14(2): e3.

- Briceno E, Calderon A, Sotelo J (2007): "Institutional experience with chloroquine as an adjuvant to the therapy for glioblastoma multiforme." *Surg Neurol* 67(4): 388–391.
- Buzzeo MP, Scott EW, Cogle CR (2007): "The hunt for cancer-initiating cells: a history stemming from leukemia." *Leukemia* 21(8): 1619–1627.
- Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, Oh EY, Gaber MW, Finklestein D, Allen M et al. (2007): "A perivascular niche for brain tumor stem cells." *Cancer Cell* 11(1): 69–82.
- Carew JS, Nawrocki ST, Krupnik YV, Dunner K Jr., McConkey DJ, Keating MJ, Huang P, (2006): "Targeting endoplasmic reticulum protein transport: a novel strategy to kill malignant B cells and overcome fludarabine resistance in CLL." *Blood* 107(1): 222–231.
- Casartelli G, Dorcaratto A, Ravetti JL, Sola S, Vitali A, Merlo DF, Frosina G (2009): "Survival of high grade glioma patients depends on their age at diagnosis." *Cancer Biol Ther* 8(18): 1719–1721.
- Chalmers AJ (2007): "Radioresistant glioma stem cells – therapeutic obstacle or promising target?" *DNA Repair (Amst)* 6(9): 1391–1394.
- Chatterjee T, Mukhopadhyay A, Khan KA, Giri AK (1998): "Comparative mutagenic and genotoxic effects of three antimalarial drugs, chloroquine, primaquine and amodiaquine." *Mutagenesis* 13(6): 619–624.
- Chen MF, Lin CT, Chen WC, Yang CT, Chen CC, Liao SK, Liu JM, Lu CH, Lee KD (2006): "The sensitivity of human mesenchymal stem cells to ionizing radiation." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 66(1): 244–253.
- Clarke DM, Hollister WR, Baust JG, Van Buskirk RG (1999): "Cryosurgical Modeling: Sequence of Freezing and Cytotoxic Agent Application Affects Cell Death." *Mol Urol* 3(1): 25–31.
- Clarke PG (1990): "Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms." *Anat Embryol (Berl)* 181(3): 195–213.
- Cohen SN, Yielding KL (1965): "Inhibition of DNA and RNA polymerase reactions by chloroquine." *Proc Natl Acad Sci U S A* 54(2): 521–527.
- Conan NJ Jr. (1948): "The treatment of amebic hepatitis with chloroquine." *Bull N Y Acad Med* 24(8): 545.
- Cromie GA, Connelly JC, Leach DR (2001): "Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans." *Mol Cell* 8(6): 1163–1174.
- Dasika GK, Lin SC, Zhao S, Sung P, Tomkinson A, Lee EY (1999): "DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis." *Oncogene* 18(55): 7883–7899.
- Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P (1988): "Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method." *Cancer* 62(10): 2152–2165.
- Davis FG, Kupelian V, Freels S, McCarthy B, Surawicz T (2001): "Prevalence estimates for primary brain tumors in the United States by behavior and major histology groups." *Neuro Oncol* 3(3): 152–158.
- Dean M, Fojo T, Bates S (2005): "Tumour stem cells and drug resistance." *Nat Rev Cancer* 5(4): 275–284.
- Degrassi F, Fiore M, Palitti F (2004): "Chromosomal aberrations and genomic instability induced by topoisomerase-targeted antitumour drugs." *Curr Med Chem Anticancer Agents* 4(4): 317–325.
- Degtyarev M, De Maziere A, Orr C, Lin J, Lee BB, Tien JY, Prior WW, van Dijk S, Wu H, Gray DC et al. (2008): "Akt inhibition promotes autophagy and sensitizes PTEN-null tumors to lysosomotropic agents." *J Cell Biol* 183(1): 101–116.

- Dikomey E, Dahm-Daphi J, Brammer I, Martensen R, Kaina B (1998): "Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines." *Int J Radiat Biol* 73(3): 269–278.
- Dirks PB (2001): "Glioma migration: clues from the biology of neural progenitor cells and embryonic CNS cell migration." *J Neurooncol* 53(2): 203–212.
- Dorn A, Stoffel R, Matile H, Bubendorf A, Ridley RG (1995): "Malarial haemozoin/beta-haematin supports haem polymerization in the absence of protein." *Nature* 374(6519): 269–271.
- Eramo A, Ricci-Vitiani L, Zeuner A, Pallini R, Lotti F, Sette G, Piloizzi E, Larocca LM, Peschle C, De Maria R (2006): "Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells." *Cell Death Differ* 13(7): 1238–1241.
- Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL (1995): "The comet assay: a comprehensive review." *Mutat Res* 339(1): 37–59.
- Fan C, Wang W, Zhao B, Zhang S, Miao J (2006): "Chloroquine inhibits cell growth and induces cell death in A549 lung cancer cells." *Bioorg Med Chem* 14(9): 3218–3222.
- Fernandez-Capetillo O, Celeste A, Nussenzweig A (2003): "Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors." *Cell Cycle* 2(5): 426–427.
- Field RC, Gibson BR, Holbrook DJ Jr., McCall BM (1978): "Inhibition of precursor incorporation into nucleic acids of mammalian tissues by antimalarial aminoquinolines." *Br J Pharmacol* 62(2): 159–164.
- Fong TA, Shawver LK, Sun L, Tang C, App H, Powell TJ, Kim YH, Schreck R, Wang X, Risau W et al. (1999): "SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types." *Cancer Res* 59(1): 99–106.
- Foster ER, Downs JA (2005): "Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair." *FEBS J* 272(13): 3231–3240.
- Friedberg EC (1995). "Out of the shadows and into the light: the emergence of DNA repair." *Trends Biochem Sci* 20(10): 381.
- Friedberg EC, Walker, G. C., Siede, W; "DNA Repair and Mutagenesis." ASM Press, Washington DC 2006.
- Frosina G (2009): "DNA repair and resistance of gliomas to chemotherapy and radiotherapy." *Mol Cancer Res* 7(7): 989–999.
- Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A (2004): "Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma." *Cancer Res* 64(19): 7011–7021.
- Giese A (2003): "Glioma invasion – pattern of dissemination by mechanisms of invasion and surgical intervention, pattern of gene expression and its regulatory control by tumorsuppressor p53 and proto-oncogene ETS-1." *Acta Neurochir Suppl* 88: 153–162.
- Goodarzi AA, Noon AT, Deckbar D, Ziv Y, Shiloh Y, Lohrlich M, Jeggo PA (2008): "ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin." *Mol Cell* 31(2): 167–177.
- Gorlia T, van den Bent MJ, Hegi ME, Mirimanoff RO, Weller M, Cairncross JG, Eisenhauer E, Belanger K, Brandes AA, Allgeier A et al. (2008): "Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastoma: prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE.3." *Lancet Oncol* 9(1): 29–38.
- Graham D.I., Lantos P.L. (1997): *Greenfield's Neuropathology*. New York, Oxford University Press.
- Grander D (1998): "How do mutated oncogenes and tumor suppressor genes cause cancer?" *Med Oncol* 15(1): 20–26.

- Gurova KV, Hill JE, Guo C, Prokvolit A, Burdelya LG, Samoylova E, Khodyakova AV, Ganapathi R, Ganapathi M, Tararova ND et al. (2005): "Small molecules that reactivate p53 in renal cell carcinoma reveal a NF-kappaB-dependent mechanism of p53 suppression in tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(48): 17448–17453.
- Haber JE (2000): "Partners and pathways repairing a double-strand break." *Trends Genet* 16(6): 259–264.
- Hagihara N, Walbridge S, Olson AW, Oldfield EH, Youle RJ (2000): "Vascular protection by chloroquine during brain tumor therapy with Tf-CRM107." *Cancer Res* 60(2): 230–234.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000): "The hallmarks of cancer." *Cell* 100(1): 57–70.
- Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K, Speck W, Zeiger E (1983): "Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals." *Environ Mutagen* 5 Suppl 1: 1–142.
- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L et al. (2005): "MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma." *N Engl J Med* 352(10): 997–1003.
- Heppner FL, Skutella T, Hailer NP, Haas D, Nitsch R (1998): "Activated microglial cells migrate towards sites of excitotoxic neuronal injury inside organotypic hippocampal slice cultures." *Eur J Neurosci* 10(10): 3284–3290.
- Hewitson TD, Bisucci T, Darby IA (2006): "Histochemical localization of apoptosis with in situ labeling of fragmented DNA." *Methods Mol Biol* 326: 227–234.
- Hochberg FH, Pruitt A (1980): "Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma." *Neurology* 30(9): 907–911.
- Hoeijmakers JH (2001): "DNA repair mechanisms." *Maturitas* 38(1): 17–22; discussion 22–13.
- Holland EC (2001): "Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models." *Nat Rev Genet* 2(2): 120–129.
- Holliday R, Ho T (2002): "DNA methylation and epigenetic inheritance." *Methods* 27(2): 179–183.
- Hu C, Solomon VR, Ulibarri G, Lee H (2008): "The efficacy and selectivity of tumor cell killing by Akt inhibitors are substantially increased by chloroquine." *Bioorg Med Chem* 16(17): 7888–7893.
- Hu YL, DeLay M, Jahangiri A, Molinaro AM, Rose SD, Carbonell WS, Aghi MK (2008): "Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma." *Cancer Res* 72(7): 1773–1783.
- Jackson SP (2001): "Detecting, signalling and repairing DNA double-strand breaks." *Biochem Soc Trans* 29(Pt 6): 655–661.
- Jain RK (2008): "Lessons from multidisciplinary translational trials on anti-angiogenic therapy of cancer." *Nat Rev Cancer* 8(4): 309–316.
- Jakob B, Scholz M, Taucher-Scholz G (2003): "Biological imaging of heavy charged-particle tracks." *Radiat Res* 159(5): 676–684.
- Jendrossek V, Belka C, Bamberg M (2003): "Novel chemotherapeutic agents for the treatment of glioblastoma multiforme." *Expert Opin Investig Drugs* 12(12): 1899–1924.
- Jensen PB, Sorensen BS, Sehested M, Grue P, Demant EJ, Hansen HH (1994): "Targeting the cytotoxicity of topoisomerase II-directed epipodophyllotoxins to tumor cells in acidic environments." *Cancer Res* 54(11): 2959–2963.
- Johannessen TC, Wang J, Skaftnesmo KO, Sakariassen PO, Enger PO, Petersen K, Oyan AM, Kalland KH, Bjerkvig R, Tysnes BB (2009): "Highly infiltrative brain tumours show reduced chemosensitivity associated with a stem cell-like phenotype." *Neuropathol Appl Neurobiol* 35(4): 380–393.

- Joki T, Machluf M, Atala A, Zhu J, Seyfried NT, Dunn IF, Abe T, Carroll RS, Black PM (2001): "Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy." *Nat Biotechnol* 19(1): 35–39.
- Kang MK, Hur BI, Ko MH, Kim CH, Cha SH, Kang SK (2008): "Potential identity of multi-potential cancer stem-like subpopulation after radiation of cultured brain glioma." *BMC Neurosci* 9: 15.
- Karres I, Kremer JP, Dietl I, Steckholzer U, Jochum M, Ertel W (1998): "Chloroquine inhibits proinflammatory cytokine release into human whole blood." *Am J Physiol* 274(4 Pt 2): R1058–1064.
- Kastan MB, Bartek J (2004): "Cell-cycle checkpoints and cancer." *Nature* 432(7015): 316–323.
- Kesari S, Ramakrishna N, Sauvageot C, Stiles CD, Wen PY (2006): "Targeted molecular therapy of malignant gliomas." *Curr Oncol Rep* 8(1): 58–70.
- Kim EL, Wustenberg R, Rubsam A, Schmitz-Salue C, Warnecke G, Bucker EM, Pettkus N, Speidel D, Rohde V, Schulz-Schaeffer W et al. (2010) "Chloroquine activates the p53 pathway and induces apoptosis in human glioma cells." *Neuro Oncol* 12(4): 389–400.
- Kim SH, Kim JH, Fried J (1973): "Enhancement of the radiation response of cultured tumor cells by chloroquine." *Cancer* 32(3): 536–540.
- Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK (2002): "The WHO classification of tumors of the nervous system." *J Neuropathol Exp Neurol* 61(3): 215–225; discussion 226–219.
- Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S (2005): "The role of autophagy in cancer development and response to therapy." *Nat Rev Cancer* 5(9): 726–734.
- Krishnan S, Brown PD, Ballman KV, Fiveash JB, Uhm JH, Giannini C, Jaeckle KA, Geoffroy FJ, Nabors LB, Buckner JC (2006): "Phase I trial of erlotinib with radiation therapy in patients with glioblastoma multiforme: results of North Central Cancer Treatment Group protocol N0177." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 65(4): 1192–1199.
- Lamborn KR, Yung WK, Chang SM, Wen PY, Cloughesy TF, DeAngelis LM, Robins HI, Lieberman FS, Fine HA, Fink KL et al. (2008): "Progression-free survival: an important end point in evaluating therapy for recurrent high-grade gliomas." *Neuro Oncol* 10(2): 162–170.
- Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G (2002): "Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review." *Radiother Oncol* 64(3): 259–273.
- Lee CM, Tannock IF (2006): "Inhibition of endosomal sequestration of basic anticancer drugs: influence on cytotoxicity and tissue penetration." *Br J Cancer* 94(6): 863–869.
- Lee JH, Paull TT (2005): "ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex." *Science* 308(5721): 551–554.
- Lee SW, Fraass BA, Marsh LH, Herbort K, Gebarski SS, Martel MK, Radany EH, Lichter AS, Sandler HM (1999): "Patterns of failure following high-dose 3-D conformal radiotherapy for high-grade astrocytomas: a quantitative dosimetric study." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 43(1): 79–88.
- Leppard JB, Dong Z, Mackey ZB, Tomkinson AE (2003): "Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair." *Mol Cell Biol* 23(16): 5919–5927.
- Li H, Alonso-Vanegas M, Colicos MA, Jung SS, Lochmuller H, Sadikot AF, Snipes GJ, Seth P, Karpati G, Nalbantoglu J (1999): "Intracerebral adenovirus-mediated p53 tumor suppressor gene therapy for experimental human glioma." *Clin Cancer Res* 5(3): 637–642.
- Lindahl T, Nyberg B (1974): "Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid." *Biochemistry* 13(16): 3405–3410.

- Lips J, Kaina B (2001): "DNA double-strand breaks trigger apoptosis in p53-deficient fibroblasts." *Carcinogenesis* 22(4): 579–585.
- Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS (2006): "Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma." *Mol Cancer* 5: 67.
- Lobrich M, Kiefer J (2006): "Assessing the likelihood of severe side effects in radiotherapy." *Int J Cancer* 118(11): 2652–2656.
- Lobrich M, Cooper PK, Rydberg B (1996): "Non-random distribution of DNA double-strand breaks induced by particle irradiation." *Int J Radiat Biol* 70(5): 493–503.
- Loehberg CR, Thompson T, Kastan MB, Maclean KH, Edwards DG, Kittrell FS, Medina D, Conneely OM, O'Malley BW (2007): "Ataxia telangiectasia-mutated and p53 are potential mediators of chloroquine-induced resistance to mammary carcinogenesis." *Cancer Res.* 67(24):12026-33.
- Louis DN (2006): "Molecular pathology of malignant gliomas." *Annu Rev Pathol* 1: 97–117.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007): "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." *Acta Neuropathol* 114(2): 97–109.
- Ma HI, Lin SZ, Chiang YH, Li J, Chen SL, Tsao YP, Xiao X (2002): "Intratumoral gene therapy of malignant brain tumor in a rat model with angiostatin delivered by adeno-associated viral (AAV) vector." *Gene Ther* 9(1): 2–11.
- Macdonald DR, Cascino TL, Schold SC Jr., Cairncross JG (1990): "Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma." *J Clin Oncol* 8(7): 1277–1280.
- Machein MR, Plate KH (2000): "VEGF in brain tumors." *J Neurooncol.* 50(1-2):109-20
- Maclean KH, Dorsey FC, Cleveland JL, Kastan MB (2008): "Targeting lysosomal degradation induces p53-dependent cell death and prevents cancer in mouse models of lymphomagenesis." *J Clin Invest* 118(1): 79–88.
- MacPhail SH, Banath JP, Yu TY, Chu EH, Lambur H, Olive PL (2003): "Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays." *Int J Radiat Biol* 79(5): 351–358.
- Mannironi C, Bonner WM, Hatch CL (1989): "H2A.X, a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals." *Nucleic Acids Res* 17(22): 9113–9126.
- Matsukado Y, Maccarty CS, Kernohan JW (1961): "The growth of glioblastoma multiforme (astrocytomas, grades 3 and 4) in neurosurgical practice." *J Neurosurg* 18: 636–644.
- McCord AM, Jamal M, Williams ES, Camphausen K, Tofilon PJ (2009): "CD133+ glioblastoma stem-like cells are radiosensitive with a defective DNA damage response compared with established cell lines." *Clin Cancer Res* 15(16): 5145–5153.
- Meinao IM, Sato EI, Andrade LE, Ferraz MB, Atrá E (1996): "Controlled trial with chloroquine diphosphate in systemic lupus erythematosus." *Lupus* 5(3): 237–241.
- Merchant RE, McVicar DW, Merchant LH, Young HF (1992): "Treatment of recurrent malignant glioma by repeated intracerebral injections of human recombinant interleukin-2 alone or in combination with systemic interferon-alpha. Results of a phase I clinical trial." *J Neurooncol* 12(1): 75–83.
- Michael RO, Williams GM (1974): "Chloroquine inhibition of repair of DNA damage induced in mammalian cells by methyl methanesulfonate." *Mutat Res* 25(3): 391–396.
- Mischel PS, Cloughesy T (2006): "Using molecular information to guide brain tumor therapy." *Nat Clin Pract Neurol* 2(5): 232–233.
- Mitscher LA (2005): "Bacterial topoisomerase inhibitors: quinolone and pyridone antibacterial agents." *Chem Rev* 105(2): 559–592.

- Nakamura J, Walker VE, Upton PB, Chiang SY, Kow YW, Swenberg JA (1998): "Highly sensitive apurinic/aprimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions." *Cancer Res* 58(2): 222–225.
- Neman J, Jandial R "Decreasing glioma recurrence through adjuvant cancer stem cell inhibition. (2010): " *Biologics* 4: 157–162.
- Nestler U, Wakimoto H, Siller-Lopez F, Aguilar LK, Chakravarti A, Muzikansky A, Stemmer-Rachamimov A, Chiocca EA, Aguilar-Cordova E, Hochberg FH (2004): "The combination of adenoviral HSV TK gene therapy and radiation is effective in athymic mouse glioblastoma xenografts without increasing toxic side effects." *J Neurooncol* 67(1-2): 177–188.
- Newell K, Franchi A, Pouyssegur J, Tannock I (1993): "Studies with glycolysis-deficient cells suggest that production of lactic acid is not the only cause of tumor acidity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(3): 1127–1131.
- Nieder C, Schill S, Kneschaurek P, Molls M (2007): "Comparison of three different mediastinal radiotherapy techniques in female patients: Impact on heart sparing and dose to the breasts." *Radiother Oncol* 82(3): 301–307.
- Nowell PC (1976): "The clonal evolution of tumor cell populations." *Science* 194(4260): 23–28.
- O'Brien RL, Allison JL, Hahn FE (1966): "Evidence for intercalation of chloroquine into DNA." *Biochim Biophys Acta* 129(3): 622–624.
- Ohgaki H, Kleihues P (2005): "Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas." *J Neuropathol Exp Neurol*. 64(6):479-89.
- Qiao Y, Spitz MR, Guo Z, Hadeyati M, Grossman L, Kraemer KH, Wei Q (2002) "Rapid assessment of repair of ultraviolet DNA damage with a modified host-cell reactivation assay using a luciferase reporter gene and correlation with polymorphisms of DNA repair genes in normal human lymphocytes." *Mutat Res* 509(1-2):165-74.
- Pandey AV, Bisht H, Babbarwal VK, Srivastava J, Pandey KC, Chauhan VS (2001): "Mechanism of malarial haem detoxification inhibition by chloroquine." *Biochem J* 355(Pt 2): 333–338.
- Phuphanich S, Carson KA, Grossman SA, Lesser G, Olson J, Mikkelsen T, Desideri S, Fisher JD (2008): "Phase I safety study of escalating doses of atrasentan in adults with recurrent malignant glioma." *Neuro Oncol* 10(4): 617–623.
- Pilch DR, Sedelnikova OA, Redon C, Celeste A, Nussenzweig A, Bonner WM (2003): "Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites." *Biochem Cell Biol* 81(3): 123–129.
- Promega Corporation "Technical Manual Dual-Luciferase® Reporter Assay System" o. Verl. Madison, Wisconsin USA 2011.
- Rich JN (2007): "Cancer stem cells in radiation resistance." *Cancer Res* 67(19): 8980–8984.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998): "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139." *J Biol Chem* 273(10): 5858–5868.
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999): "Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo." *J Cell Biol* 146(5): 905–916.
- Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM (2000): "Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139." *J Biol Chem* 275(13): 9390–9395.
- Ropolo M, Daga A, Griffero F, Foresta M, Casartelli G, Zunino A, Poggi A, Cappelli E, Zona G, Spaziante R et al. (2009): "Comparative analysis of DNA repair in stem and nonstem glioma cell cultures." *Mol Cancer Res* 7(3): 383–392.

- Rothkamm K, Lobrich M (2003): "Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(9): 5057–5062.
- Rydberg B, Lindahl T (1982): "Nonenzymatic methylation of DNA by the intracellular methyl group donor S-adenosyl-L-methionine is a potentially mutagenic reaction." *EMBO J* 1(2): 211–216.
- Sartorius J, Schneider HJ (1995): "NMR-titrations with complexes between ds-DNA and indole derivatives including tryptophane containing peptides." *FEBS Lett* 374(3): 387–392.
- Savarino A, Boelaert JR, Cassone A, Majori G, Cauda R (2003): "Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases?" *Lancet Infect Dis* 3(11): 722–727.
- Savarino A, Lucia MB, Giordano F, Cauda R (2006): "Risks and benefits of chloroquine use in anticancer strategies." *Lancet Oncol* 7(10): 792–793.
- Schauff AK, Kim EL, Leppert J, Nadrowitz R, Wuestenberg R, Brockmann MA, Giese A (2009): "Inhibition of invasion-associated thromboxane synthase sensitizes experimental gliomas to gamma-radiation." *J Neurooncol* 91(3): 241–249.
- Schrader CE, Linehan EK, Mochegova SN, Woodland RT, Stavnezer J (2005): "Inducible DNA breaks in Ig S regions are dependent on AID and UNG." *J Exp Med* 202(4): 561–568.
- Schweichel JU, Merker HJ (1973): "The morphology of various types of cell death in prenatal tissues." *Teratology* 7(3): 253–266.
- Selker RG, Shapiro WR, Burger P, Blackwood MS, Arena VC, Gilder JC, Malkin MG, Mealey JJ Jr., Neal JH, Olson J et al. (2002): "The Brain Tumor Cooperative Group NIH Trial 87-01: a randomized comparison of surgery, external radiotherapy, and carmustine versus surgery, interstitial radiotherapy boost, external radiation therapy, and carmustine." *Neurosurgery* 51(2): 343–355; discussion 355–347.
- Shiloh Y (2003): "ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity." *Nat Rev Cancer* 3(3): 155–168.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB (2003): "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." *Cancer Res* 63(18): 5821–5828.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB (2004): "Identification of human brain tumour initiating cells." *Nature* 432(7015): 396–401.
- Snyder RD (2000): "Use of catalytic topoisomerase II inhibitors to probe mechanisms of chemical-induced clastogenicity in Chinese hamster V79 cells." *Environ Mol Mutagen* 35(1): 13–21.
- Snyder RD, Arnone MR (2002): "Putative identification of functional interactions between DNA intercalating agents and topoisomerase II using the V79 in vitro micronucleus assay." *Mutat Res* 503(1-2): 21–35.
- Solary E, Bertrand R, Pommier Y (1994): "Apoptosis induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors in human leukemic HL-60 cells." *Leuk Lymphoma* 15(1-2): 21–32.
- Solomon VR, Lee H (2009): "Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies." *Eur J Pharmacol* 625(1-3): 220–233.
- Sorensen M, Sehested M, Jensen PB (1997): "pH-dependent regulation of camptothecin-induced cytotoxicity and cleavable complex formation by the antimalarial agent chloroquine." *Biochem Pharmacol* 54(3): 373–380.
- Sotelo J, Briceno E, Lopez-Gonzalez MA (2006): "Adding chloroquine to conventional treatment for glioblastoma multiforme: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial." *Ann Intern Med* 144(5): 337–343.

- Souhami L, Seiferheld W, Brachman D, Podgorsak EB, Werner-Wasik M, Lustig R, Schultz CJ, Sause W, Okunieff P, Buckner J et al. (2004): "Randomized comparison of stereotactic radiosurgery followed by conventional radiotherapy with carmustine to conventional radiotherapy with carmustine for patients with glioblastoma multiforme: report of Radiation Therapy Oncology Group 93-05 protocol." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 60(3): 853–860.
- Sternglanz H, Yielding KL, Pruitt KM (1969): "Nuclear magnetic resonance studies of the interaction of chloroquine diphosphate with adenosine 5'-phosphate and other nucleotides." *Mol Pharmacol* 5(4): 376–381.
- Stummer W, Novotny A, Stepp H, Goetz C, Bise K, Reulen HJ (2000): "Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme by using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients." *J Neurosurg* 93(6): 1003–1013.
- Stupp R, Gander M, Leyvraz S, Newlands E (2001): "Current and future developments in the use of temozolomide for the treatment of brain tumours." *Lancet Oncol* 2(9): 552–560.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U et al. (2005): "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." *N Engl J Med* 352(10): 987–996.
- Sullivan DJ Jr., Gluzman IY, Russell DG, Goldberg DE (1996): "On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21): 11865–11870.
- Takahashi A, Ohnishi T (2005): "Does gammaH2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks?" *Cancer Lett* 229(2): 171–179.
- Thoms KM, Baesecke J, Emmert B, Hermann J, Roedling T, Laspe P, Leibel D, Truemper L, Emmert S (2007): "Functional DNA repair system analysis in haematopoietic progenitor cells using host cell reactivation." *Scand J Clin Lab Invest* 67(6): 580–588.
- Titus EO (1989): "Recent developments in the understanding of the pharmacokinetics and mechanism of action of chloroquine." *Ther Drug Monit* 11(4): 369–379.
- Toler SM, Noe D, Sharma A (2006): "Selective enhancement of cellular oxidative stress by chloroquine: implications for the treatment of glioblastoma multiforme." *Neurosurg Focus* 21(6): E10.
- Tsao MN, Mehta MP, Whelan TJ, Morris DE, Hayman JA, Flickinger JC, Mills M, Rogers CL, Souhami L (2005): "The American Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ASTRO) evidence-based review of the role of radiosurgery for malignant glioma." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 63(1): 47–55.
- Tysnes BB, Bjerkgvig R (2007): "Cancer initiation and progression: involvement of stem cells and the microenvironment." *Biochim Biophys Acta* 1775(2): 283–297.
- Vaupel P, Briest S, Hockel M (2002): "Hypoxia in breast cancer: pathogenesis, characterization and biological/therapeutic implications." *Wien Med Wochenschr* 152(13-14): 334–342.
- Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA (2006): "Brain tumour stem cells." *Nat Rev Cancer* 6(6): 425–436.
- Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ (2011) "Natural innate and adaptive immunity to cancer." *Annu Rev Immunol* 29: 235–271.
- Volkl H, Friedrich F, Haussinger D, Lang F (1993): "Effect of cell volume on Acridine Orange fluorescence in hepatocytes." *Biochem J* 295 (Pt 1): 11–14.
- Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, 2nd, Dowell JM, Reardon DA, Quinn JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Wagner M et al. (2007): "Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma." *Clin Cancer Res* 13(4): 1253–1259.
- Waggener JD, Beggs JL (1976): "Vasculature of Neural Neoplasms." *Adv Neurol* 15: 27–49.

- Ward IM, Chen J (2001): "Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress." *J Biol Chem* 276(51): 47759–47762.
- Ward JF (1988): "DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 35: 95–125.
- Waring M (1970): "Variation of the supercoils in closed circular DNA by binding of antibiotics and drugs: evidence for molecular models involving intercalation." *J Mol Biol* 54(2): 247–279.
- Wen PY, Kesari S (2008): "Malignant gliomas in adults." *N Engl J Med* 359(5): 492–507.
- Westphal M, Stavrou D, Nausch H, Valdueza JM, Herrmann HD (1994): "Human neurocytoma cells in culture show characteristics of astroglial differentiation." *J Neurosci Res* 38(6): 698–704.
- Whitaker SJ, Powell SN, McMillan TJ (1991): "Molecular assays of radiation-induced DNA damage." *Eur J Cancer* 27(7): 922–928.
- Wiesner J, Ortmann R, Jomaa H, Schlitzer M (2003): "New antimalarial drugs." *Angew Chem Int Ed Engl* 42(43): 5274–5293.
- Wyman C, Ristic D, Kanaar R (2004): "Homologous recombination-mediated double-strand break repair." *DNA Repair (Amst)* 3(8-9): 827–833.
- Xamena N, Creus A, Velazquez A, Marcos R (1985): "Testing of chloroquine and quinacrine for mutagenicity in *Drosophila melanogaster*." *Mutat Res* 158(3): 177–180.
- Xie Z, Klionsky DJ (2007): "Autophagosome formation: core machinery and adaptations." *Nat Cell Biol* 9(10): 1102–1109.
- Yielding KL, Yielding L, Gaudin D (1970): "Inhibition by chloroquine of UV repair in *E. coli* B." *Proc Soc Exp Biol Med* 133(3): 999–1001.
- Yung WK, Albright RE, Olson J, Fredericks R, Fink K, Prados MD, Brada M, Spence A, Hohl RJ, Shapiro W et al. (2000): "A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse." *Br J Cancer* 83(5): 588–593.
- Zhao H, Cai Y, Santi S, Lafrenie R, Lee H (2005): "Chloroquine-mediated radiosensitization is due to the destabilization of the lysosomal membrane and subsequent induction of cell death by necrosis." *Radiat Res* 164(3): 250–257.
- Zheng Y, Zhao YL, Deng X, Yang S, Mao Y, Li Z, Jiang P, Zhao X, Wei Y (2009): "Chloroquine inhibits colon cancer cell growth in vitro and tumor growth in vivo via induction of apoptosis." *Cancer Invest* 27(3): 286–292.
- Zhou Q, McCracken MA, Strobl JS (2002): "Control of mammary tumor cell growth in vitro by novel cell differentiation and apoptosis agents." *Breast Cancer Res Treat* 75(2): 107–117.

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle all jenen meinen Dank aussprechen, die auf unterschiedliche Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein erster Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. A. Giese für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Ermöglichung der Arbeit in der Neurochirurgischen Klinik der Universitätsmedizin Göttingen.

Herzlichst möchte ich mich bei meiner wissenschaftlichen Mentorin Frau Dr. rer. nat. Ella Kim für ihre fortwährende uneingeschränkte und enthusiastische Unterstützung bedanken. Ohne ihre außerordentliche Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein großer Dank gilt Herrn C. Schmitz-Salue für seine Unterstützung während meiner Zellkultur-Experimente im Neuroonkologischen Labor der Universitätsmedizin Göttingen.

Des Weiteren danke ich Frau Dipl. M. Rave-Fränk für die engagierte Zusammenarbeit rund um die Bereitstellung der Bestrahlungseinheit für meine Experimente.

Lebenslauf

Ich, Anne Rübsam, wurde als zweites Kind meiner Eltern, Andrea Rübsam geb. Staffen und Frank Rübsam am 30.05.1984 in Leipzig geboren. Ich bin ledig und habe keine Kinder.

Von 1990 bis 1994 besuchte ich die Käthe-Kollwitz-Grundschule in Sondershausen. Von 1994 bis 2002 absolvierte ich die gymnasiale Oberstufe am Geschwister-Scholl-Gymnasium in Sondershausen. Mein Abitur folgte im Juni 2002.

Im Oktober 2002 begann ich das Studium der Humanmedizin an der „Georg-August-Universität“ Göttingen. Im Oktober 2004 erreichte ich mit dem Physikum den klinischen Abschnitt. Im Dezember 2008 schloss ich das Studium der Humanmedizin mit dem zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung erfolgreich ab. Im Dezember 2008 erhielt ich die Approbation als Ärztin.

Im Januar 2009 begann ich meine Dissertation zum Thema „Molecular mechanisms underlying radiosensitizing effects of chloroquine in Glioma“ bei Prof. Dr. med. A. Giese und Dr. rer. nat. habil. E. Kim, Abteilung Neurochirurgie der Universitätsmedizin Mainz. Die Publikation „Chloroquine activates the p53 pathway and induces apoptosis in human glioma cells“ (Kim et al. 2010) und der Kongressbeitrag „Interference of DNA repair contributes to radiosensitization of brain tumour initiating stem-like glioma cells by chloroquine“ (20th Anniversary Congress des AICR in St. Andrews, Schottland, 06. bis 09. April 2010) folgten.

Von April 2009 bis Juni 2010 schloss ich das Studium der Zahnmedizin an der „Georg-August-Universität“ Göttingen an (6 bestandene Semester).

Seit dem 01.01.2011 bin ich an der Klinik für Augenheilkunde der „Charité Universitätsmedizin“ Berlin als Assistenzärztin mit dem Ziel des Facharztes für Augenheilkunde angestellt. Derzeit befinde ich mich im 3. Ausbildungsjahr.