

Faktoren der DNA-Schadensantwort als Zielstrukturen von Naturstoffen zur Behandlung von Tumoren

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jana Aengenvoort

geb. van Stuijvenberg

aus Kamp-Lintfort

Walbeck, April 2021

aus dem Institut für Toxikologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Gerhard Fritz
2. Prof. Dr. Dr. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 26.08.2021

“I MEAN, YOU COULD CLAIM THAT *ANYTHING'S* REAL IF THE ONLY BASIS FOR BELIEVING IN IT IS THAT NOBODY'S *PROVED* IT DOESN'T EXIST!” – HERMIONE GRANGER

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	ix
Abkürzungsverzeichnis	xii
1 Einleitung	- 1 -
1.1 Krebserkrankungen	- 1 -
1.2 Zytostatika zur Behandlung maligner Tumore	- 3 -
1.2.1 Platinkomplexe	- 7 -
1.2.1.1 Cisplatin	- 8 -
1.2.2 Anthrazykline	- 11 -
1.2.2.1 Doxorubicin	- 12 -
1.3 Zelluläre Stressantwort auf DNA-Schäden	- 15 -
1.3.1 DNA-Schadensantwort	- 15 -
1.3.1.1 DNA-Reparatur	- 18 -
1.3.1.2 Apoptose	- 24 -
1.3.2 Modulation der DNA-Schadensantwort zur Behandlung von Tumorerkrankungen	- 25 -
1.4 Naturstoffe als Quelle für neue Krebsmedikamente	- 26 -
1.5 Zielsetzung der Arbeit	- 30 -
2 Material und Methoden	- 32 -
2.1 Material	- 32 -
2.1.1 Herstellernachweise	- 32 -
2.1.2 Geräte	- 34 -
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	- 35 -
2.1.4 Kits	- 36 -
2.1.5 Chemikalien	- 36 -
2.1.6 Naturstoffe, Naturstoffdatenbank	- 38 -
2.1.7 Medien und Medienzusätze	- 38 -
2.1.8 Zelllinien	- 39 -
2.1.9 Enzyme	- 39 -
2.1.10 Primer	- 39 -
2.1.11 Antikörper	- 40 -
2.1.11.1 Primärantikörper	- 40 -
2.1.11.2 Sekundärantikörper	- 40 -
2.1.12 Sonstige Materialien	- 41 -
2.1.13 Lösungen und Puffer	- 41 -
2.1.14 Software	- 44 -

2.2 Methoden	- 45 -
2.2.1 Zellkultur und Behandlungsschema	- 45 -
2.2.1.1 Bestimmung der Verdopplungszeit	- 45 -
2.2.2 Kryokonservierung von Zellen	- 46 -
2.2.3 Molekularbiologie Methoden	- 46 -
2.2.3.1 DNA-Isolierung	- 46 -
2.2.3.2 Endpunkt-PCR und Gelextraktion	- 47 -
2.2.3.3 Sequenzierung nach Sanger	- 48 -
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden	- 48 -
2.2.4.1 Proteinisolierung	- 48 -
2.2.4.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)	- 49 -
2.2.4.3 Western Blot-Analyse	- 49 -
2.2.5 Analyse der Zellvitalität	- 50 -
2.2.5.1 Alamar Blue® Assay	- 50 -
2.2.6 Analyse der Zellzyklusverteilung	- 51 -
2.2.6.1 Durchflusszytometrische Analysen	- 51 -
2.2.6.2 Immunzytochemische Bestimmung des Mitose-Index	- 51 -
2.2.7 Analyse von Zelltodmechanismen	- 52 -
2.2.7.1 ApoONE® Assay	- 52 -
2.2.8 Analyse von DNA-Schäden und der DNA-Schadensantwort	- 53 -
2.2.8.1 Immunzytochemische Methoden	- 53 -
2.2.8.1.1 Gesamtfluoreszenzbasierte Analyse von DNA-Schäden und der DNA-Schadensantwort	- 53 -
2.2.8.1.2 Ausbildung von nukleären γ H2AX-, 53BP1- und pATM-Foci	- 55 -
2.2.8.1.3 Analyse von S139 phosphoryliertem H2AX mittels Durchflusszytometrie	- 56 -
2.2.8.2 Comet-Assay	- 56 -
2.2.9 Analyse der Zytostatikaaufnahme	- 57 -
2.2.9.1 Nachweis von Cisplatin-DNA-Intrastrangverknüpfungen	- 57 -
2.2.9.2 Analyse der intrazellulären Doxorubicin-Konzentration	- 58 -
2.2.10 TEAC Assay	- 58 -
2.2.11 Isolierung und Kultivierung primärer Rattenhepatozyten	- 59 -
2.2.12 Kombinationsindex	- 60 -
2.2.13 Statistische Analysen	- 60 -
3 Ergebnisse	- 61 -
3.1 Charakterisierung der zytotoxischen Aktivität der Naturstoffe	- 61 -
3.2 Einfluss der Naturstoffe auf den DNA-Schaden und die DNA-Schadensantwort in der Mono- und Kombinationstherapie	- 63 -

3.2.1	Analyse von S139 phosphoryliertem H2AX als Surrogatmarker für DNA-Schäden und der DNA-Schadensantwort.....	- 63 -
3.2.2	Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf die Ausbildung von DNA-Strangbrüche nach Mono- bzw. Kombinationsbehandlung.....	- 67 -
3.2.3	Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf verschiedene Faktoren der DNA-Schadensantwort nach Mono- bzw. Kombinationsbehandlung.....	- 73 -
3.3	Modulation der Zytotoxizität durch Kombinationsbehandlungen	- 78 -
3.4	Einfluss der ausgewählten Naturstoffe in Mono- bzw. Kombinationstherapie auf die Zellzyklusverteilung	- 80 -
3.5	Induktion von apoptotischem Zelltod	- 87 -
3.6	Antioxidatives Potenzial ausgewählter Naturstoffe	- 91 -
3.7	Einfluss der Naturstoffe auf den Im- und Export der Zytostatika	- 92 -
3.8	Charakterisierung der ausgewählten Naturstoffe in Tumorzellen verschiedener Herkunft und in Nicht-Tumorzellen	- 95 -
3.8.1	Einfluss der Naturstoffe in Mono- bzw. Kombinationsbehandlung auf die Vitalität von Tumorzellen verschiedener Herkunft	- 95 -
3.8.2.1	Einfluss von SA, NQ und IQ auf primäre humane Fibroblasten.....	- 98 -
3.8.2.2	Einfluss der Naturstoffe in Mono- bzw. Kombinationstherapie auf die Vitalität primärer Rattenhepatozyten.....	- 111 -
4	Diskussion	- 113 -
4.1	Faktoren der DNA-Schadensantwort als Zielstrukturen zur Behandlung von Tumoren.....	- 114 -
4.1.1	Naturstoffe als Modulatoren der DNA-Schadensantwort zur Behandlung von Tumoren.....	- 114 -
4.1.2	Ausgewählte Naturstoffe als Modulatoren der DNA-Schadensantwort.....	- 116 -
4.1.2.1	Secalonic acid F	- 121 -
4.1.2.2	5-epi-Nakijiquinone Q	- 127 -
4.1.2.3	5-epi-Ilimaquinone	- 131 -
4.2	Adverse Effekte in der konventionellen Tumorthherapie.....	- 135 -
4.2.1	Wirkung von Naturstoffen in der Kombinationstherapie auf Nicht-Tumorzellen	- 136 -
4.2.2	Auswirkung der ausgewählten Naturstoffe auf Nicht-Tumorzellen	- 137 -
4.2.2.1	Secalonic acid F	- 137 -
4.2.2.2	5-epi-Nakijiquinone Q	- 139 -
4.2.2.3	5-epi-Ilimaquinone	- 141 -
4.3	Zusammenfassung der molekularen Wirkung der ausgewählten Naturstoffe.....	- 143 -
5	Ausblick	- 147 -
6	Zusammenfassung.....	- 153 -
	Summary.....	- 155 -
7	Literaturverzeichnis	- 157 -

8 Anhang	- 188 -
8.1 Ergänzende Abbildungen und Tabellen.....	- 188 -
8.2 Auflistung der den Abbildungen zugrunde liegenden Daten	- 207 -
8.3 Publikationen und Kongressbeiträge	- 252 -
8.3.1 Liste der Publikationen.....	- 252 -
8.3.2 Liste der Kongressteilnahmen.....	- 252 -
8.3.2.1 Posterpräsentationen.....	- 252 -
8.3.2.2 Vorträge	- 252 -
Danksagung	- 254 -
Eidesstattliche Erklärung	- 256 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Dreistufenmodell der Krebsentstehung.	- 2 -
Abbildung 1.2: Eigenschaften von Tumoren.	- 3 -
Abbildung 1.3: Zelluläre Angriffspunkte gebräuchlicher Zytostatika.	- 5 -
Abbildung 1.4: Chemische Strukturen von Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin.	- 7 -
Abbildung 1.5: Metabolismus von Cisplatin und schematische Darstellung der Platin-DNA-Addukte.	- 9 -
Abbildung 1.6: Struktur des Anthrazyklin-Grundgerüsts.	- 11 -
Abbildung 1.7: Chemische Strukturen von Daunorubicin, Doxorubicin, Epirubicin und Idarubicin.	- 12 -
Abbildung 1.8: Metabolisierung von Doxorubicin in der Leber.	- 13 -
Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der DNA-Schadensantwort.	- 17 -
Abbildung 1.10: Verschiedene DNA-Reparaturmechanismen bei diversen Basenmodifikationen.	- 21 -
Abbildung 1.11: Verschiedene DNA-Reparaturmechanismen bei DNA-Doppelstrangbrüchen.	- 23 -
Abbildung 1.12: Kategorien der zugelassen Krebsmedikamente der letzten 50 Jahre.	- 27 -
Abbildung 1.13: Vereinfachtes graphisches Modell der wissenschaftlichen Vorgehensweise.	- 31 -
Abbildung 2.1: Strukturen der drei vielversprechendsten Naturstoffe.	- 38 -
Abbildung 2.2: Prinzip des Alamar Blue® Assays.	- 50 -
Abbildung 2.3: Prinzip des ApoONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assays.	- 53 -
Abbildung 2.4: Gesamtfluoreszenzbasierte Analyse des γ H2AX Signals.	- 54 -
Abbildung 3.1: Effekte der Naturstoffe auf die Zellvitalität von Pankreaskarzinomzellen.	- 62 -
Abbildung 3.2: Einfluss der Naturstoffe auf die Gesamtfluoreszenz von γ H2AX in Mono- und Kombinationsbehandlung.	- 65 -
Abbildung 3.3: Einfluss der Naturstoffe allein und in Kombination mit ausgewählten Zytostatika auf die Proteinmenge von γ H2AX.	- 67 -

Abbildung 3.4: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf die Ausbildung nukleärer γ H2AX-, 53BP1- und pATM-Foci in BxPC3-Zellen.	- 69 -
Abbildung 3.5: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf die Ausbildung nukleärer γ H2AX-, 53BP1- und pATM-Foci in SU.86.86-Zellen.	- 70 -
Abbildung 3.6: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf die Ausbildung von DNA-Strangbrüchen und Basenschäden.	- 72 -
Abbildung 3.7: Western Blot-Analysen zur Charakterisierung des Einflusses ausgewählter Naturstoffe auf die DNA-Schadensantwort (DDR) in BxPC3- und SU.86.86-Zellen.	- 76 -
Abbildung 3.8: Einfluss der Kombinationsbehandlung aus Naturstoffen und Zytostatikum auf die Vitalität der Pankreaskarzinomzellen.	- 79 -
Abbildung 3.9: Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses von ausgewählten Naturstoffen und Zytostatika (Mono- und Kombinationsbehandlung) auf die Zellzyklusverteilung von BxPC3-Zellen.	- 83 -
Abbildung 3.10: Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses von ausgewählten Naturstoffen und Zytostatika (Mono- und Kombinationsbehandlung) auf die Zellzyklusverteilung von SU.86.86-Zellen.	- 85 -
Abbildung 3.11: Einfluss der ausgewählten Naturstoffe und Zytostatika (Mono- und Kombinationsbehandlung) auf die mitotische Aktivität von Pankreaskarzinomzellen.	- 86 -
Abbildung 3.12: Analyse der Aktivierung und Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 in BxPC3-Zellen.	- 89 -
Abbildung 3.13: Analyse der Aktivierung und Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 in SU.86.86-Zellen.	- 90 -
Abbildung 3.14: Antioxidatives Potenzial der ausgewählten Naturstoffe.	- 91 -
Abbildung 3.15: Einfluss der Naturstoffe auf die Cisplatin-induzierte Bildung von Cis-(1,2-GpG)-Intrastrangverknüpfungen.	- 93 -
Abbildung 3.16: Einfluss der Naturstoffe auf die intrazelluläre Konzentration von Doxorubicin in SU.86.86-Zellen.	- 94 -
Abbildung 3.17: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf die Vitalität diverser Tumorzelllinien.	- 96 -
Abbildung 3.18: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf die Vitalität von primären humanen dermalen Fibroblasten.	- 99 -
Abbildung 3.19: Western Blot-Analysen zur Erfassung der DNA-Schadensantwort (DDR) nach Behandlung mit ausgewählten Naturstoffen und Zytostatika in NHDF... ..	- 101 -

Abbildung 3.20: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf die Ausbildung nukleärer γ H2AX , 53BP1- und pATM-Foci in NHDF.	- 104 -
Abbildung 3.21: Einfluss der Kombinationsbehandlung auf die Vitalität von NHDF-Zellen	- 105 -
Abbildung 3.22: Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses von ausgewählten Naturstoffen und Zytostatika (Mono- und Kombinationsbehandlung) auf die Zellzyklusverteilung von NHDF.	- 108 -
Abbildung 3.23: Analyse der Aktivierung und Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 in NHDF.	- 109 -
Abbildung 3.24: Einfluss der Naturstoffe auf die Cisplatin-induzierte Bildung von Cis-(1,2-GpG)-Intrastrangverknüpfungen in primären humanen Fibroblasten (NHDF).	- 110 -
Abbildung 3.25: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf die Vitalität primärer Rattenhepatozyten.	- 112 -
Abbildung 4.1: Modell zur Modulierung der DNA-Schadensantwort in Pankreaskarzinomzellen durch <i>5-epi-Illicaquinone</i>	- 143 -
Abbildung 4.2: Modell zur Modulierung der DNA-Schadensantwort in Pankreaskarzinomzellen durch <i>5-epi-Nakijiquinone Q</i>	- 144 -
Abbildung 4.3: Modell zur Modulierung der DNA-Schadensantwort in Pankreaskarzinomzellen durch <i>Secalonic acid F</i>	- 145 -
Abbildung 8.1: Sequenzierung des <i>KRAS</i> -Gens.	- 188 -
Abbildung 8.2: Effekte der ausgewählten Zytostatika auf die Zellvitalität von Pankreaskarzinomzellen.	- 188 -
Abbildung 8.3: Gesamtfluoreszenzbasierte Analyse der Phosphorylierung von H2AX nach Zytostatika-Behandlung.	- 189 -
Abbildung 8.4: Analyse der Phosphorylierung von H2AX in den verschiedenen Zellzyklusphasen mittels Durchflusszytometrie in BxPC3-Zellen.	- 190 -
Abbildung 8.5: Analyse der Phosphorylierung von H2AX in den verschiedenen Zellzyklusphasen mittels Durchflusszytometrie in SU.86.86-Zellen.	- 191 -
Abbildung 8.6: Einfluss des Naturstoffsets auf die Proteinmenge von γ H2AX.	- 192 -
Abbildung 8.7: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf nukleäre γ H2AX-Foci in BxPC3-Zellen.	- 193 -
Abbildung 8.8: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf nukleäre γ H2AX-Foci in SU.86.86-Zellen.	- 194 -
Abbildung 8.9: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf nukleäre γ H2AX-, 53BP1- und kolokalisierte γ H2AX/53BP1- Foci in BxPC3-Zellen.	- 195 -

Abbildung 8.10: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf nukleäre γ H2AX-, pATM- und kolokalisierte γ H2AX/pATM- Foci in BxPC3-Zellen.....	- 196 -
Abbildung 8.11: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf nukleäre γ H2AX-, 53BP1- und kolokalisierte γ H2AX/53BP1- Foci in SU.86.86-Zellen.....	- 197 -
Abbildung 8.12: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf nukleäre γ H2AX-, pATM- und kolokalisierte γ H2AX/pATM- Foci in SU.86.86-Zellen.....	- 198 -
Abbildung 8.13: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf DNA-Strangbrüche.	- 199 -
Abbildung 8.14: Einfluss der Kombinationsbehandlung auf die Vitalität von BxPC3-Zellen.....	- 201 -
Abbildung 8.15: Einfluss der Kombinationsbehandlung auf die Vitalität von SU.86.86-Zellen.....	- 203 -
Abbildung 8.16: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf nukleäre γ H2AX-, 53BP1- und kolokalisierte γ H2AX/53BP1- Foci in NHDF-Zellen.	- 203 -
Abbildung 8.17: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf nukleäre γ H2AX-, pATM- und kolokalisierte γ H2AX/pATM- Foci in NHDF-Zellen.....	- 204 -
Abbildung 8.18: Einfluss der Kombinationsbehandlung auf die Vitalität von NHDF-Zellen.....	- 206 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Einteilung ausgewählter Zytostatika nach Substanzgruppe.....	- 6 -
Tabelle 2.1: Auflistung der Herstellerhauptsitze.....	- 32 -
Tabelle 2.2: Auflistung der verwendeten Geräte.....	- 34 -
Tabelle 2.3: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.	- 35 -
Tabelle 2.4: Auflistung der verwendeten Kits.....	- 36 -
Tabelle 2.5: Auflistung der verwendeten Chemikalien.	- 36 -
Tabelle 2.6: Auflistung der verwendeten Medien und Medienzusätze.	- 38 -
Tabelle 2.7: Auflistung der verwendeten Zelllinien.....	- 39 -
Tabelle 2.8: Auflistung der verwendeten Enzyme.....	- 39 -
Tabelle 2.9: Auflistung der verwendeten Primer.	- 39 -
Tabelle 2.10: Auflistung der verwendeten Primärantikörper.....	- 40 -
Tabelle 2.11: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper.....	- 40 -
Tabelle 2.12: Auflistung sonstiger verwendeter Materialien.....	- 41 -
Tabelle 2.13: Auflistung der verwendeten Lösungen und Puffer.....	- 41 -
Tabelle 2.14: Auflistung der verwendeten Software.....	- 44 -
Tabelle 2.15: Reaktionsbedingungen der Endpunkt PCR.....	- 48 -
Tabelle 3.1: Einfluss von zehn ausgewählten Naturstoffen auf die Gesamtfluoreszenz von γ H2AX.	- 66 -
Tabelle 3.2: Zusammenfassung der Resultate der Western Blot-Analysen zur Charakterisierung des Einflusses von ausgewählten Naturstoffen auf die DNA-Schadensantwort (DDR).....	- 77 -
Tabelle 3.3: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf die Vitalität diverser Tumorzelllinien.	- 97 -
Tabelle 3.4: Zusammenfassung der Wachstumsgeschwindigkeit diverser Tumorzellen..	- 97 -
Tabelle 3.5: IC_{50} der getesteten Naturstoffe und Wachstumsgeschwindigkeit von primären humanen dermalen Fibroblasten.	- 99 -

Tabelle 3.6: Zusammenfassung der Resultate der Western Blot-Analysen zur Charakterisierung des Einflusses von ausgewählten Naturstoffen auf die DNA-Schadensantwort (DDR).....	- 102 -
Tabelle 8.1: Daten der ermittelten IC ₅₀ der Naturstoffe in BxPC3- und SU.86.86-Zellen nach 72-stündiger Dauerbehandlung.....	- 207 -
Tabelle 8.2: Daten des Alamar Blue®-Assays nach 72-stündiger Dauerbehandlung mit SA, NQ und IQ.	- 233 -
Tabelle 8.3: Daten des γH2AX-Arrays von BxPC3- und SU.86.86-Zellen nach Behandlung mit den Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin.	- 234 -
Tabelle 8.4: Daten der γH2AX-Foci-Analysen von BxPC3- und SU.86.86-Zellen nach Behandlung mit Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin.	- 238 -
Tabelle 8.5: Daten der 53BP1-Foci-Analysen von BxPC3- und SU.86.86-Zellen nach Behandlung mit Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin.	- 238 -
Tabelle 8.6: Daten der pATM-Foci-Analysen von BxPC3- und SU.86.86-Zellen nach Behandlung mit Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin.	- 239 -
Tabelle 8.7: Daten der Comet-Analysen von SU.86.86-Zellen nach Behandlung mit Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin.	- 239 -
Tabelle 8.8: Daten des Alamar Blue®-Assay und des daraus resultierenden Kombinationindexes von BxPC3- und SU.86.86-Zellen nach Kombinationsbehandlungen der Naturstoffe mit Cisplatin und Doxorubicin.	- 240 -
Tabelle 8.9: Daten der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalysen von BxPC3-Zellen nach Behandlung mit Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin.	- 241 -
Tabelle 8.10: Daten der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalysen von SU.86.86-Zellen nach Behandlung mit Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin.	- 242 -
Tabelle 8.11: Daten der immunozytochemischen Analysen der Proliferation von BxPC3- und SU.86.86-Zellen nach Behandlung mit Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin.	- 243 -
Tabelle 8.12: Daten der Apo-ONE®-Assays von BxPC3-Zellen nach Behandlung mit Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin.	- 243 -
Tabelle 8.13: Daten der Apo-ONE®-Assays von SU.86.86-Zellen nach Behandlung mit Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin.	- 244 -
Tabelle 8.14: Daten des TEAC-Assays.	- 244 -

Tabelle 8.15: Daten der Southwestern Blot-Analysen zur Bildung von Cis-(1,2-GpG)-DNA-Intrastrangaddukten in BxPC3- und SU.86.86-Zellen nach Behandlung mit den Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin. - 245 -

Tabelle 8.16: Daten der durchflusszytometrischen Analysen der intrazellulären Doxorubicinkonzentration in SU.86.86-Zellen. - 245 -

Tabelle 8.17: Daten des Alamar Blue®-Assays nach 72-stündiger Dauerbehandlung mit SA, NQ und IQ. - 246 -

Tabelle 8.18: Daten der γ H2AX-, 53BP1- und pATM-Foci-Analysen von NHDF-Zellen nach Behandlung mit Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin. - 247 -

Tabelle 8.19: Daten des Alamar Blue®-Assay und des daraus resultierenden Kombinationindexes von NHDF-Zellen nach Kombinationsbehandlungen der Naturstoffe mit Cisplatin und Doxorubicin. - 248 -

Tabelle 8.20: Daten der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalysen von NHDF-Zellen nach Behandlung mit Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin. - 249 -

Tabelle 8.21: Daten der Apo-ONE®-Assays von NHDF-Zellen nach Behandlung mit Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin. - 250 -

Tabelle 8.22: Daten der Southwestern Blot-Analysen zur Bildung von Cis-(1,2-GpG)-DNA-Intrastrangaddukten in NHDF-Zellen nach Behandlung mit den Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin. - 250 -

Tabelle 8.23: Daten des Alamar Blue® Assays nach 72-stündiger Dauerbehandlung mit SA, NQ und IQ in primären Rattenhepatozyten. - 251 -

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	<i>volume-volume percentage</i> ; Volumenprozent
% (w/v)	<i>weight-volume percentage</i> ; Gewichtsprozent
53BP1	P53-bindendes Protein 1
5-FU	5-Fluorouracil
8-OxodG	8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin
A2780	Humane Ovarialkarzinomzellen
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ABCC2	<i>ATP-binding cassette, sub-family C2</i>
ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AKT	<i>protein kinase B</i> ; Proteinkinase B
AML	akute myeloische Leukämie
ANOVA	<i>analysis of variance</i> ; Varianzanalyse
AP	apurin/apyrimidin
APAF-1	<i>apoptotic protease-activating factor-1</i>
APE1	AP-Endonuklease 1
ApG	Adenin-Guanin
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Atg	<i>autophagy-related genes</i>
ATM	Serin/Threonin-Kinase <i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	<i>adenosine triphosphate</i> ; Adenosintriphosphat
ATP7B	<i>copper-transporting P-type adenosine triphosphate</i>
ATR	Serin/Threonin-Kinase <i>ataxia telangiectasia and RAD3 related</i>
ATRIP	<i>ATR interacting protein</i>
BAX	<i>BCL2-associated protein</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BER	Basenexzisionsreparatur
BJ	<i>Beauvericin J</i>
bp	<i>base pairs</i> ; Basenpaare
BRCA	<i>breast cancer</i> ; Brustkrebs
BSA	<i>bovine serum albumin</i> ; Rinderserumalbumin
BV	<i>Beauvericin</i>
BxPC3	Humane Pankreaskarzinomzelllinie
CA	<i>Coniellin A</i>
ca.	circa
Cas	Caspase
Caspase	<i>CysteinyI-aspartate specific protease</i>
Cdc25	<i>cell division cycle 25</i>
Cdks	<i>cyclin-dependent kinases</i> ; Cyclin-abhängige-Kinasen
CENP-F	<i>centromere protein F</i> ; Zentromerprotein F
CHK	Checkpointkinase
CIP1	<i>cyclin-dependent kinases-interacting protein 1</i>
Cis	<i>cis</i> -Diammindichloridoplatin(II); Cisplatin
CML	chronisch myeloische Leukämie

CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSA	<i>Cockayne syndrome type A protein, ERCC8</i>
CSB	<i>Cockayne syndrome type B protein</i>
CTR1	<i>solute carrier family 31, member 1; copper transporter 1;</i> Kupfertransporter 1
CYP	Cytochrom P450
CYP3A4	<i>Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4</i>
DACH	1,2-Diaminocyclohexan
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCF	Dichlorofluorescein
DDR	<i>DNA damage response; DNA-Schadensantwort</i>
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbeccos's modified Eagle's minimal essential medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure</i>
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DNA-PKc	<i>DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit</i>
DNase	Desoxyribonuklease
DNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
Doxo	Doxorubicin
DSB	Doppelstrangbruch
DSBs	Doppelstrangbrüche
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EdU	5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ERCC1	<i>excision-repair cross-complementing 1</i>
ERCC5	<i>excision-repair cross-complementing 5</i>
ERCC6	<i>excision-repair cross-complementing 6</i>
ERCC8	<i>excision-repair cross-complementing 8</i>
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinases</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii; und andere</i>
FADD	<i>FAS-associated death domain protein</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase; Fokaladhäsionskinase</i>
FAS	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6</i>
FCS	<i>fetal calf serum; fötales Kälberserum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEN1	FLAP Endonuklease 1
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FJ	<i>Fusarielin J</i>
g	Erdbeschleunigung; 9,81 m/s ²
G	Guanin
G0-Phase	<i>gap 0-Phase; Ruhephase des Zellzyklus</i>
G ₁ -Phase	<i>gap 1-Phase; postmitotische bzw. präsynthetische Phase des Zellzyklus</i>

G ₂ -Phase	<i>gap 2-Phase</i> ; postsynthetische bzw. prämitotische Phase des Zellzyklus
GADD153	<i>Growth arrest- and DNA damage-inducible gene</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i> ; grün fluoreszierende Protein
GG	<i>global genomic</i> , global genomisch
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GpG	Guanin-Guanin
GpNpG	Guanin-beliebige Nukleinbase-Guanin
GSH	Glutathion
H ₂ -DCF	Dichlorodihydrofluorescein
H2AX	<i>H2A histone family, member X</i>
H ₂ -DCF-DA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetate
H3	Histon 3
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i> ; Hanks' Salze
HCC	<i>hepatocellular carcinoma</i> ; Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Salzsäure
HCRA	<i>host Cell Reactivation Assay</i> ; Wirts-Zell-Reaktivierungsassay
HCT-116	Humane Kolonkarzinomzelllinie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Her2/Neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HL-60	humane Leukämiezellen
HMG	<i>High-Mobility Group</i>
HMP	<i>High melting point</i>
HNPCC	<i>hereditary non-polyposis colorectal cancer</i> ; hereditäre, nicht-polypöse Kolorektalkarzinom
HQ	<i>Hexaprenylhydroquinone</i>
HR	<i>homologous recombination</i> ; homologe Rekombination
HR23B	<i>UV excision repair protein RAD23, homolog B</i>
HRP	<i>Horseradish peroxydase</i> ; Meerrettich-Peroxidase
HT-29	Humane Kolonkarzinomzelllinie
Hus1	<i>Hus1 homolog (S. pombe)</i>
HUVECs	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
IC ₅₀	<i>inhibitory concentration 50 %</i> ; inhibitorische Konzentration 50 %
IC ₈₀	<i>inhibitory concentration 80 %</i> ; inhibitorische Konzentration 80 %
Ig	Immunglobulin
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IQ	<i>5-epi-ilimaquinone</i>
I-Sce-I	<i>Intron-encoded endonuclease I-Sce I</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i> ; c-Jun N-terminale Kinasen
KAP	<i>KRAB-associated protein</i>
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KI	Kombinationsindex
Kon	Kontrolle
KRAB	<i>Krüppel-associated box</i>

Ku70 (XRCC6)	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6</i>
Ku80 (XRCC5)	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5</i>
L5187Y	Murine Lymphomzellen
LC/MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LDH	Laktatdehydrogenase
LigIV	<i>DNA ligase 4</i>
LMP	<i>Low melting point</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> ; Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> , Mitogen-aktivierten Proteinkinasen
MATE1	<i>multidrug extrusion transporter 1</i>
Mcl-1	<i>induced myeloid leukemia cell differentiation protein</i>
MDA-MB-231	Humane Mammakarzinomzelllinie
MDM2	<i>MDM2 oncogene, E3 ubiquitin protein ligase</i>
MDR1	<i>multidrug resistance protein 1</i>
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MLH	MutL homolog 1
MMR	<i>mismatch repair</i> ; Fehlpaarungsreparatur
MMS	Methylmethansulfonat
MPG	<i>N-methylpurine DNA glycosylase</i>
M-Phase	Mitosephase des Zellzyklus
MRE11	<i>meiotic recombination 11</i>
MRN	Komplex aus MRE11, RAD50 und NBS1
MRP2	<i>multidrug resistance-associated protein 2</i>
MSH2	<i>mutS homolog 2</i>
MSH6	<i>mutS homolog 6</i>
mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
MutL α	Komplex bestehend aus MLH1 und PMS2
MutS α	Komplex, bestehend aus den MutS-homologen Proteinen MSH2 und MSH6
n	Anzahl der biologischen Replikate
N	Anzahl der technischen Replikate je biologischem Replikat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumphosphat
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid-Hydrid
NaOH	Natriumhydroxid
NBS1	Nibrin
NCI-H1975	Humane Lungenkarzinomzelllinie
NEK	<i>NIMA-related kinases</i>
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NF κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NHDF	<i>Normal Human Dermal Fibroblasts</i> ; Humane dermale Fibroblasten

NHEJ	<i>non-homologous end joining</i> ; nicht-homologe Endverknüpfung
NIMA	<i>never in mitosis A</i>
NOXA	<i>BCL2 homology 3 (BH3)</i>
NQ	<i>5-epi-Nakijiquinone Q</i>
Nst	Naturstoff
Nste	Naturstoffe
OCT2	<i>solute carrier family 22; organic cation transporter 2</i>
OGG1	<i>8-oxoguanine DNA glycosylase</i>
p	phospho-
p21	Inhibitor von CdKs
p38	MAPK
p53	Tumorsuppressorprotein
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> ; Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	PBS mit 0,3 % Triton X-100
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PI	Propidiumjodid
PI3k	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIC	<i>protease inhibitor cocktail</i> ; Proteaseinhibitorcocktail
PIKKs	<i>PI3K-like kinases</i>
PKc	<i>protein kinase, catalytic subunit</i> ; katalytische Untereinheit der Proteinkinase
PMS2	<i>Mismatch repair endonuclease PMS2</i>
Pol	Polymerase
PP1	Perfusionspuffer 1
PP2	Perfusionspuffer 2
PTK2	<i>protein Tyrosine Kinase 2</i>
PUMA	<i>BCL2 binding component 3</i>
RAD50	<i>DNA repair protein</i> ; DNA-Reparaturprotein
RAS	<i>rat sarcoma</i>
RFC1	<i>replication factor C subunit 1</i>
RFU	<i>relative fluorescence unit</i> ; relative Fluoreszenzeinheit
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
RNA PII	RNA-Polymerase II
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i> ; reaktive Sauerstoffspezies
RPA	Replikationsprotein A2
rpm	<i>revolutions per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RPMI-1640	Zellkulturmedium entwickelt am <i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
RT	Raumtemperatur
SA	<i>Secalonic acid F</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> ; Standardfehler

siRNA	<i>small interfering RNA</i>
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
SRC	<i>proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i> , Tyrosinkinase Src
SSB	<i>single-strand break</i> ; Einzelstrangbruch
SSC	<i>Standard sodium citrate</i>
SU.86.86	Humane Pankreaskarzinomzelllinie
TBS	<i>tris buffered saline</i> ; Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	TBS mit Tween 20
TC	<i>transcription-coupled</i> ; transkriptionsgekoppelt
TE	Tris-EDTA
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidative Capacity</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFIIH	Transkriptionsfaktor
TNF	<i>tumor necrosis factor</i> , Tumornekrosefaktor
TP	<i>Tylophorinine</i>
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
U2OS	humane Osteosarkomzellen
UV	ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
vs.	<i>versus</i> ; gegenüber
VT	<i>Viriditoxin</i>
WAF	<i>wildtype P53-activated-fragment 1</i>
XPA	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group A protein</i>
XPB	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group B protein</i>
XPC	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group C protein</i>
XPD	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group D protein</i>
XPF	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group F protein</i>
XPG	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group G protein</i>
XRCC1	<i>X-ray repair cross complementing 1</i>
XRCC4	<i>X-ray repair cross-complementing protein 4</i>
z. B.	zum Beispiel
Z-DEVD-	bis-(N-CBZ-L-Aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-asparaginsäureamid)
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben
γH2AX	<i>H2A histone family, member X</i> an Serin 139 phosphoryliert
λ	Wellenlänge

1 Einleitung

1.1 Krebserkrankungen

Krebserkrankungen gehören, neben den Herz-Kreislauf-Erkrankungen, zu den häufigsten Todesursachen in Industrieländern. In Deutschland machten sie im Jahr 2018 24,1 % der Todesfälle aus (Statistisches Bundesamt). Aber auch in Entwicklungsländern steigt die Inzidenz vieler Krebsarten und wird durch die Ausbreitung eines „westlichen“ Lebensstils weiter zunehmen (Jemal *et al.*, 2010). Die in den diversen Organen auftretenden Krebsformen unterscheiden sich vor allem in der Überlebensrate der Patienten, dem Metastasierungspotenzial und der Möglichkeit der Behandlung. Zu den durch das Ursprungsgewebe definierten Untergruppen maligner Tumore zählen unter anderem Karzinome, Sarkome, Lymphome oder neuroendokrine Tumore. Karzinome entstammen dem Epithel, Sarkome dem Mesenchym, Lymphome dem blutbildenden bzw. lymphatischen System und neuroendokrine Tumore dem Neuroektoderm. In Deutschland, als Beispiel für westlich geprägte Gesellschaften, sind vor allem Tumorlokalisationen in Brustdrüsen (Frauen), Prostata (Männer), Lunge, Dickdarm und Pankreas zu finden. Dabei zählen die meisten Brust- und Prostatatumore zu den hormonabhängigen Tumoren. Nach Lungen- und Darmkrebs stellt das Pankreaskarzinom bei beiden Geschlechtern eine der häufigsten krebsbedingten Todesursache dar (Robert-Koch-Institut, 2019). Das Erkrankungsrisiko steigt mit dem Alter. Allerdings sind für das individuelle Krebsrisiko Umweltfaktoren (z. B. UV-Anteil der Sonnenstrahlung) und der Lebensstil (Ernährung, Alkohol, Rauchen, Sport, etc.) entscheidend (Block *et al.*, 1992; Bagnardi *et al.*, 2001; Thune *et al.*, 2001; Sasco *et al.*, 2004). Auch nicht vermeidbare Tumorinzidenzfaktoren wie das Geschlecht, und die genetische Vorbelastung spielen eine wichtige Rolle. Frauen, die eine Mutation in dem für BRCA (*breast cancer*; Brustkrebs) kodierenden Gen aufweisen, zeigen ein erhöhtes Risiko, an einem Mamma- oder Ovarialkarzinom zu erkranken (Engel *et al.*, 2015). Kolorektalkarzinome treten zumeist sporadisch auf, jedoch können etwa 5 % bis 10 % der Fälle als Folge von Vererbung ausgemacht werden. Häufigster Vertreter ist das hereditäre, nicht-polypöse Kolonkarzinom (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*; HNPCC; Lynch-Syndrom). Die Mutation hierbei liegt in den an der Fehlpaarungsreparatur (*mismatch repair* (MMR)) beteiligten Genen, die für die entsprechenden Proteine kodieren (Macaron *et al.*, 2015).

Die Tumorentstehung ist ein mehrstufiger Prozess (Abbildung 1.1). In der Initiationsphase ereignet sich in einer einzelnen Zelle ein Mutationsereignis in ihrer DNA (*deoxyribonucleic acid*; Desoxyribonukleinsäure), in der Promotionsphase wird die Zelle, welche eine Mutation erfahren hat, durch einen Wachstumsreiz vermehrt und in der Progressionsphase wird die maligne Transformation abgeschlossen (Berenblum, 1941). Nicht nur endogene Ursachen (z. B. ROS (*reactive oxygen species*; reaktive Sauerstoffspezies) oder Hormone) können das auf genetischer Ebene geregelte Gleichgewicht zwischen Zellreplikation und programmiertem Zelltod stören, sondern auch exogene Faktoren, wie zum Beispiel ionisierende Strahlen, chemische Karzinogene oder lokal reizende Stoffe (Mutschler *et al.*, 2019). Obwohl der Organismus viele Mechanismen besitzt, um DNA-Modifikationen zu unterdrücken, kann nicht jede DNA-Modifikation erkannt oder repariert werden. Diese können sich als Mutationen manifestieren, wobei nicht jede Mutation zu Krebs führt. Bei etwa 50 % der Tumore wurde eine inhibierende Mutation des Tumorsuppressors p53 detektiert (Vogelstein *et al.*, 2000). Zu den Tumorsuppressoren werden Proteine gezählt, die eine hemmende Wirkung auf die Tumorentstehung besitzen. Dazu gehören Proteine, die den Zellzyklus hemmen oder die Apoptose fördern. Tumor-assoziierte Mutationen in den Genen dieser kodierten Proteine führen zu einem Funktionsverlust. Gene, die für Proteine kodieren, die Proliferations-fördernde und/oder Apoptose-hemmende Eigenschaften aufweisen, werden zu den Protoonkogenen gezählt. Tumor-assoziierte Mutationen in diesen Genen führen zu einer Überexpression bzw. zu einer Hyperaktivierung des resultierenden Proteins. Enthalten Protoonkogene eine Krebs-fördernde Mutation so werden diese als Onkogene bezeichnet. Dabei spielen unter anderem Mutationen im RAS (*rat sarcoma*)-Signalweg eine Rolle (Bos, 1989).



Abbildung 1.1: Dreistufenmodell der Krebsentstehung.

Die Tumorentstehung wird oft in drei Stufen unterteilt: Initiation (erstes Mutationsereignis), Promotion (Wachstumsstimulus) und der Progression (Anhäufung der Mutationen). Die Einteilung beruht hauptsächlich auf Analysen zur chemischen Kanzerogenese. Der Prozess ist komplex und die Übergänge sind fließend. Modifiziert nach Berenblum, 1941.

Kennzeichnend für maligne Tumore sind die Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen (Proliferation), Resistenz gegenüber Wachstumsinhibition und Zelltodmechanismen, ein unbegrenztes replikatives Potenzial, infiltrierendes und metastasierendes Wachstum und Stimulation von Angiogenese (Abbildung 1.2)

(Hanahan *et al.*, 2011). Die schrittweise Ansammlung von genetischen Veränderungen führt über die Zeit zu einem Verlust der Eigenschaften gesunder Zellen und zum Zugewinn tumorspezifischer Eigenschaften.

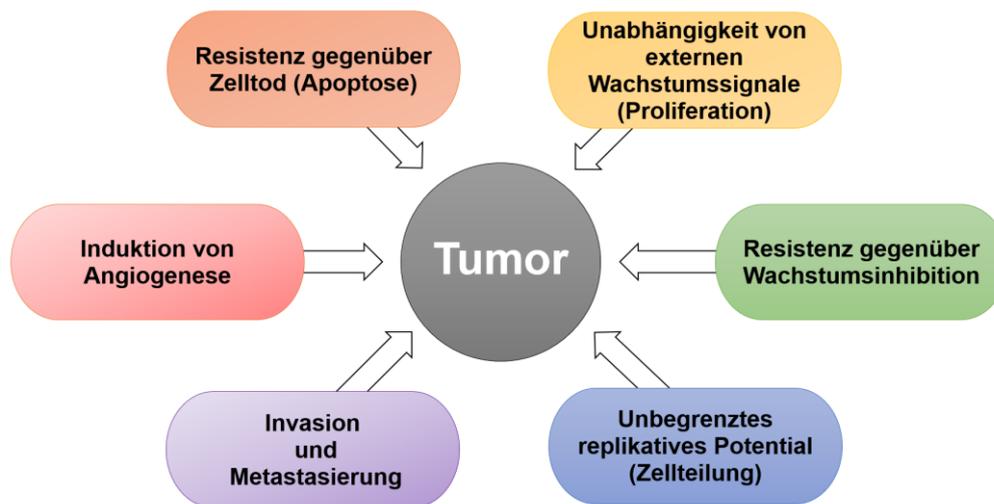


Abbildung 1.2: Eigenschaften von Tumoren.

Kennzeichnend für maligne Tumore sind die Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen (Proliferation), Resistenz gegenüber Wachstumsinhibition und Zelltodmechanismen, ein unbegrenzte replikatives Potenzial, infiltrierendes und metastasierendes Wachstum und Stimulation von Angiogenese. Modifiziert nach Hanahan *et al.*, 2011.

1.2 Zytostatika zur Behandlung maligner Tumore

Durch verschiedene Behandlungsmethoden kann ein maligner Tumor beseitigt bzw. in seinem Wachstum gehemmt werden, aber die maligne Transformation kann nicht rückgängig gemacht werden. Die Krebstherapie besteht aus drei Säulen: Chirurgie, Strahlentherapie und antineoplastischer Chemotherapie. Die bei der Chemotherapie verwendeten Zytostatika werden bevorzugt kombiniert eingesetzt, was als konsekutive Kombinationstherapie bezeichnet wird. Hierbei werden verschiedene Wirkstoffklassen mit unterschiedlichem Wirk- und Nebenwirkungsprofil kombiniert, sodass eine eventuelle Resistenzentwicklung vermieden und eine antitumorogene Wirkungssteigerung in Tumorzellen möglichst ohne Erhöhung der Toxizität auf Normalzellen erzielt werden kann (Mutschler *et al.*, 2019). Zytostatika bilden eine chemisch heterogene Gruppe natürlicher oder synthetischer zytotoxischer Substanzen, die die Zellteilung funktionell aktiver Zellen durch Beeinflussung des Stoffwechsels verhindern oder verzögern. Diese wirken also nur an proliferierenden Zellen und nicht an Zellen, die sich in der Ruhephase des Zellzyklus befinden. Die therapeutische Grundlage der klassischen Zytostatika beruht daher auf der gesteigerten, von der physiologischen Wachstumskontrolle unabhängigen, Proliferation der Tumorzellen (Ammon *et al.*, 2014).

Die Klassifizierung der Zytostatika erfolgt nach ihren Angriffspunkten während der Zellteilung (Aktories *et al.*, 2017). Alkylanzien übertragen Alkylgruppen auf die DNA und führen somit durch die Vernetzung der DNA zu DNA-Schäden und zu einer Hemmung der DNA-Replikation. Zu dieser Gruppe gehören u. a. Stickstoff-Lost-Derivate, Alkylsulfonate, Nitrosoharnstoffe, aber auch Platinverbindungen (Abschnitt 1.2.1). Interkalanzien, wie die Anthrazykline (Abschnitt 1.2.2), binden nicht-kovalent zwischen den Basenpaaren der DNA, unterbinden die Bindung der Polymerasen und hemmen somit die Replikation. Antibiotika, die eine zytostatische Wirkung aufweisen, wirken meist durch Interkalation oder Alkylierung der DNA. Dazu zählen die bereits erwähnten Anthrazykline, aber auch Bleomycine, Actinomycine und Aziridine. Taxane oder Vinca-Alkaloide gehören zu den Mitosehemmern und stabilisieren bzw. inhibieren als solche die Mikrotubuli-Funktion. Durch die verstärkte bzw. gehemmte Polymerisation von Tubulin zu Mikrotubuli kommt es zu einer fehlerhaften Bildung des Spindelapparates und zu einer Blockierung der Mitose (Retz, 2009). Topoisomerase I-Hemmer stabilisieren den Spaltungskomplex, der bei der Spaltung eines DNA-Strangs durch die Topoisomerase I während der Replikation entsteht, sodass DNA-Einzelstrangbrüche bestehen bleiben. Die Hemmung der Topoisomerase II, welche für das Entwinden und Schließen der DNA-Stränge während der Replikation zuständig ist, führt zu einer Blockade der Enzymaktivität und fördert gleichzeitig die Bindung der Topoisomerase II an die Spaltstelle der DNA, sodass diese nicht religiert werden kann (Abschnitt 1.2.2.1). Antimetabolite, zu denen Folsäureantagonisten gehören, Pyrimidinanaloga oder Purinanaloga, werden als „falsche“ Bausteine in die DNA oder RNA (*ribonucleic acid*; Ribonukleinsäure) eingebaut und stören so die Zellteilung (Aktories *et al.*, 2017). Zusätzlich werden neben den klassischen Zytostatika immer mehr zielgerichtete („*targeted therapies*“) Substanzen, wie monoklonale Antikörper, Kinasehemmer (z. B. Gefitinib und Sorafenib) oder Onkologika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen wie z. B. Enzyme und Hormonantagonisten oder Immunmodulatoren erforscht. Die verschiedenen Angriffspunkte der Zytostatika sind Abbildung 1.3 zu entnehmen.

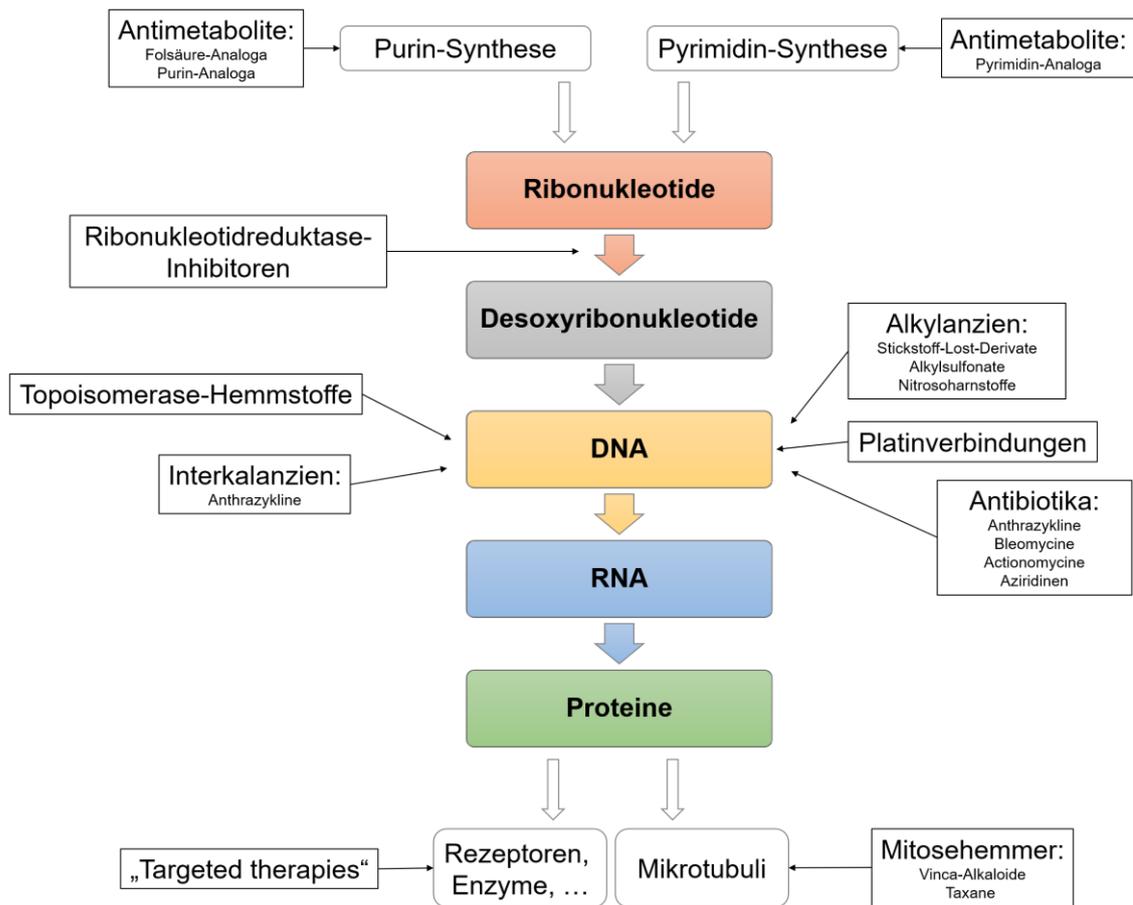


Abbildung 1.3: Zelluläre Angriffspunkte gebräuchlicher Zytostatika.

Zentrale Angriffspunkte der meisten Zytostatika stellen die Synthese von Ribonukleotiden und Desoxyribonukleotiden, die DNA selbst sowie die Enzyme, die an der DNA-Replikation beteiligt sind, dar. Auch an der Mitose beteiligte Faktoren und verschiedene Rezeptoren sind Angriffspunkte. Modifiziert nach Aktories, 2017.

Tabelle 1.1: Einteilung ausgewählter Zytostatika nach Substanzgruppe.

Substanzgruppe	Wirkstoff (Bsp.)	Anwendung (Bsp.)
Actionomycine	Actinomycin D	Chorionkarzinom
Alkaloide	Vincristin	Non-Hodgkin-Lymphom
Alkylsulfonate	Busulfan	chronische myeloische Leukämie
Angiogenesehemmer	Sorafenib	Schilddrüsenkarzinom
Anthrazykline	Doxorubicin	Mammakarzinom
Aziridine	Thiotepa	Harnblasenkarzinom
Bleomycine	Bleomycin	Hodentumore
Folsäure-Antagonisten	Methotrexat	Osteosarkom
Hormonantagonisten	Tamoxifen	Mammakarzinom
Immunomodulatoren	Lenalidomid	Myelom
Monoklonale Antikörper	Cetuximab	Kolorektalkarzinom
Nitrosoharnstoffe	Carmustin	Hirntumor
Platinverbindungen	Cisplatin	Bronchialkarzinom
Purinanaloga	6-Thioguanin	akute lymphatische und myeloische Leukämie
Pyrimidinanaloga	Cytarabin	akute lymphatische und myeloische Leukämie
Ribonukleotidreduktase-Inhibitoren	Hydroxyharnstoff	chronische myeloische Leukämie
Stickstoff-Lost-Derivate	Cyclophosphamid	akute und chronische lymphatische Leukämie
Taxane	Paclitaxel	Mammakarzinom
Topoisomerase I-Hemmer	Irinotecan	Kolorektalkarzinom
Topoisomerase II-Hemmer	Etoposid	Bronchialkarzinom
Tyrosinkinasehemmer	Imatinib	chronische myeloische Leukämie

Ein wichtiger Aspekt neben der Erforschung neuer therapeutisch nutzbarer Zielstrukturen von Tumorzellen und neuer Wirkstoffe ist die Therapieoptimierung zur Verbesserung der Effektivität und der Verträglichkeit von bereits im klinischen Einsatz befindlichen Zytostatika. Bei beiden Aspekten spielen z. B. Naturstoffe eine wichtige Rolle und können die Grundlage für neue Therapieansätze darstellen (Cragg *et al.*, 1997; Mann, 2002; Bailly, 2009; Demain *et al.*, 2011; Kinghorn *et al.*, 2016; Lichota *et al.*, 2018; Seca *et al.*, 2018; Ren *et al.*, 2019).

1.2.1 Platinkomplexe

Platinkomplexe sind Metallkoordinationsverbindungen des Platins und stellen eine Besonderheit unter den Zytostatika dar. Das Zentralatom Platin tritt in der Oxidationsstufe +II oder +IV auf. Eine quadratisch planare Geometrie ist bei den d^8 -Pt(II)-Komplexen zu finden, wohingegen die d^6 -Pt(IV)-Komplexe eine oktaedrische Geometrie aufweisen. Bei den therapeutisch verwendeten Komplexen treten zwei Amminliganden in Kombination mit zwei (Pt(II)-Komplexe) oder vier (Pt(IV)-Komplexe) Halogenen oder sauerstoffhaltigen Gruppen auf. Zu diesen gehören *cis*-Diammindichloridoplatin (Cisplatin), *cis*-Diammin(cyclobutan-1,1-dicarboxylato)platin(II) (Carboplatin) und *trans*-L-1,2-Diaminocyclohexanoxalatoplatin(II) (Oxaliplatin) (Abbildung 1.4).

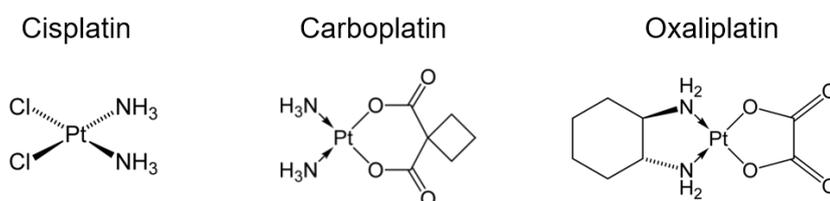


Abbildung 1.4: Chemische Strukturen von Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin.

Bei Wachstumsuntersuchungen des Darmbakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*) in einem elektrischen Feld zeigte sich zufällig eine vollständig gehemmte Zellteilung, jedoch konnte ein stark filamentöses Wachstum der Bakterien beobachtet werden (Rosenberg *et al.*, 1965; Rosenberg *et al.*, 1967). Dieses Phänomen konnte nicht auf das elektrische Feld zurückgeführt werden, sondern auf die Abgabe von Platinionen der vermeintlich inerten Platinelektroden in das ammoniumchloridhaltige Wachstumsmedium. Während der Elektrolyse kam es zu einer Zersetzung dieser Elektroden und zu der Bildung von *cis*-Diammindichloridoplatin(II)-Komplexen (Rosenberg *et al.*, 1967). Diese Substanz wurde bereits 1844 von *Peyrone* beschrieben (Peyrone, 1844). Die Zulassung von Cisplatin erfolgte 1978 durch die FDA (*Food and Drug Administration*) für die Behandlung von Hoden- und Blasenkrebs (Prestayko *et al.*, 1979; Kelland, 2007).

Im Laufe der Zeit wurden weitere Platinkomplexe entdeckt, die sich hinsichtlich ihrer Pharmakokinetik, ihrer Indikation und der dosislimitierenden Nebenwirkungen unterscheiden. Die bei der Behandlung mit Cisplatin auftretenden unerwünschten Wirkungen, wie nephro-, oto- und neurotoxische Effekte, konnten mit einer höheren Dosis und vergleichbarer antitumorigenen Wirkung von Carboplatin verringert, aber nicht

komplett verhindert werden. Carboplatin besitzt dieselben Amminliganden wie Cisplatin, unterscheidet sich jedoch durch den Austausch der Chlorliganden durch eine Cyclobutandicarboxylato-Abgangsgruppe von der bisher bekannten Platinverbindung. Durch Carboplatin konnte das Wirkspektrum jedoch nicht erweitert werden. Bei Oxaliplatin als Platinkomplex der dritten Generation ist das Platinatom mit 1,2-Diaminocyclohexan (DACH) und einem Oxalatliganden komplexiert. Oxaliplatin ist gut wasserlöslich und zeigt eine vielversprechende antitumorogene Wirkung bei fehlender Kreuzresistenz zu Cisplatin. Im Gegensatz zu Cisplatin ist hier die kumulative Neurotoxizität dosislimitierend. Oxaliplatin wurde 1999 in der EU für die Behandlung von kolorektalen Karzinomen zugelassen.

1.2.1.1 Cisplatin

Cisplatin ist der prominenteste Vertreter der Platinkomplexe, an dessen Platinatom zwei *cis*-ständige Chlorliganden und zwei Ammoniumgruppen kovalent gebunden sind (Abbildung 1.4). Es wird z. B. zur Behandlung von Ovarial-, Cervix-, Testis-, Gallen-, Lungen- oder Kopf-Hals-Karzinomen genutzt (Ali *et al.*, 2013). Die Reaktion mit körpereigenen Nukleophilen, vor allem der DNA, ist die Grundlage für die stark zytotoxische Wirkung. Begrenzt wird diese jedoch durch die Entwicklung von Resistenzen und den starken Nebenwirkungen, die durch die unzureichende Selektivität gegenüber den Tumorzellen hervorgerufen werden. Um die Wirkung der Monotherapie zu verstärken, wird Cisplatin häufig mit anderen Zytostatika kombiniert (Norbury *et al.*, 2001; Soto Parra *et al.*, 2002; Galluzzi *et al.*, 2012; Apps *et al.*, 2015).

Cisplatin ist chemisch inert, aufgrund seiner räumlichen Struktur aber anfällig für den Angriff von Nukleophilen, wie DNA-Basen oder schwefelhaltige Aminosäuren. Dabei werden in einer Substitutionsreaktion eine oder beide Chloridgruppen gegen einen nukleophilen Reaktionspartner ausgetauscht und es entsteht eine kovalente Bindung mit dem Nukleophil. Eine Reaktion mit starken Nukleophilen, wie zum Beispiel den schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein, findet direkt statt. Eine Reaktion mit den schwächer nukleophilen DNA-Basen erfolgt erst nach Substitution der Chloridionen durch Wassermoleküle. Dabei entstehen hochreaktive Aquaplatin-Komplexe (Jamieson *et al.*, 1999; Galluzzi *et al.*, 2012). Cisplatin wird intravenös verabreicht, wodurch ein großer Teil (ca. 90 %) über die zuvor genannten schwefelhaltigen Aminosäuren an die im Blut enthaltenen Serumproteinen gebunden wird (Cepeda *et al.*, 2007). Der ungebundene Teil liegt in unveränderter Form im Serum vor, da im Blut aufgrund der hohen Chloridionenkonzentration von 100 mM keine Hydrolyse stattfindet. Das ungeladene Cisplatin gelangt über passive Diffusion und/oder

durch Transportproteine wie dem Kupfertransporter CTR1 (*solute carrier family 31, member 1; copper transporter 1*) oder dem Kationentransporter OCT2 (*solute carrier family 22, member 2; organic cation transporter 2*) in die Zelle (Ishida *et al.*, 2002; Pabla *et al.*, 2009; Ciarimboli *et al.*, 2010; Yonezawa *et al.*, 2011). Da die intrazelluläre Chloridionenkonzentration mit 3 bis 30 mM deutlich niedriger als die extrazelluläre Konzentration ist, findet die Substitution der Chloridliganden des Cisplatin statt und im Zytoplasma wird der reaktive kationische Diaquakomplex $[cis-Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$ gebildet. Dieses elektrophile Intermediat kann in den Zellkern wandern und dort mit der DNA reagieren. Dieser Angriff erfolgt über eine S_N2 -Reaktion (Wong *et al.*, 1999; Jung *et al.*, 2007; Ali *et al.*, 2013) (Abbildung 1.5). Die Menge an reaktivem Cisplatin, die intrazellulär verfügbar ist, wird jedoch durch die Bindung an Thiole, wie dem antioxidativem Tripeptid Glutathion (GSH) oder Metallothioneinen, reduziert (Chen *et al.*, 2010). Auch aktive Efflux-Transporter in der Plasmamembran, wie zum Beispiel der ATP7B (*copper-transporting P-type adenosine triphosphate*), ABCC2 (*ATP-binding cassette, sub-family C2*) und MATE1 (*multidrug extrusion transporter 1*) können zu einer Abnahme der intrazellulären Cisplatinkonzentration führen (Norbury *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2005; Cepeda *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010; Koberle *et al.*, 2010; Wheate *et al.*, 2010; Ciarimboli, 2012).

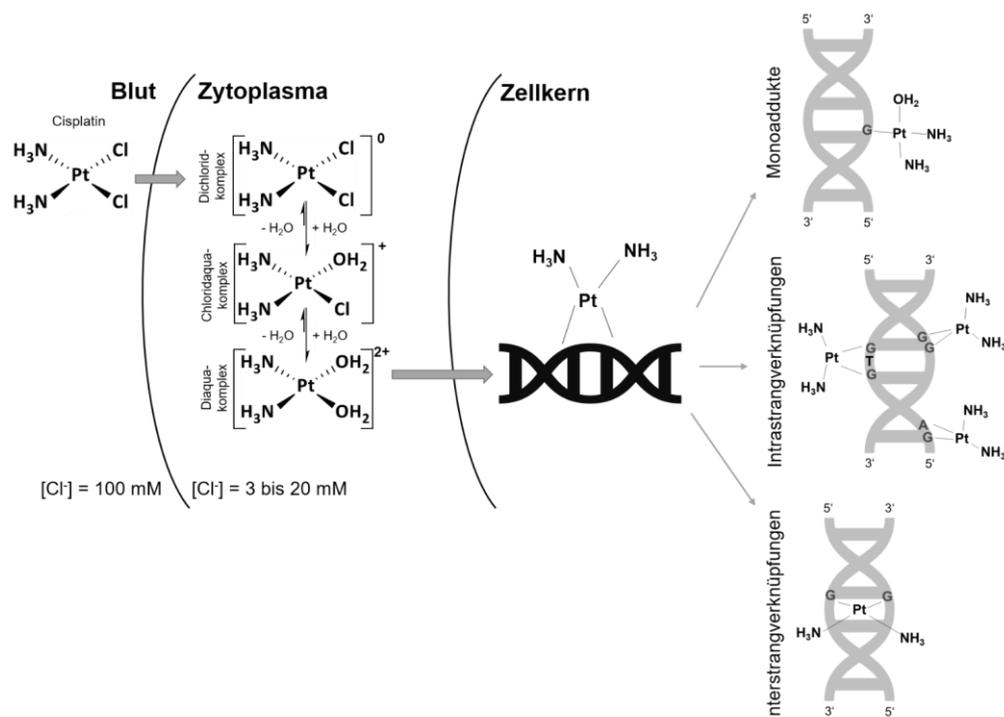


Abbildung 1.5: Metabolismus von Cisplatin und schematische Darstellung der Platin-DNA-Addukte.

Im Rahmen der Bioaktivierung von Cisplatin kommt es im Zytoplasma, aufgrund der geringen Chloridionenkonzentration, zu Hydrolyse. Der entstehende Diaquakomplex kann in den Zellkern diffundieren und dort mit den Nucleotiden der DNA reagieren. Dies geschieht bevorzugt am N7-Atom des Guanins wegen der hohen Nucleophilie des Imidazolrings. Aufgrund der bifunktionalen Struktur der Mono- und Diaquakomplexe sind diese in der Lage, zwei Nucleotide auf einem DNA-Strang oder auf zwei DNA-Strängen miteinander zu vernetzen. Modifiziert nach Wong *et al.*, 1999 und Jung *et al.*, 2007

Als Hauptursache für die Cisplatin-vermittelte Zytotoxizität lässt sich die DNA-bindende Eigenschaft verantwortlich machen, obwohl nur 1 % bis 10 % des intrazellulären Cisplatins an die DNA bindet. Grundsätzlich ist eine Bindung an allen vier DNA-Basen möglich. Die Bindung geschieht jedoch bevorzugt am nukleophilen Stickstoffatom an Position 7 des Imidazolringes der Purinbasen Guanin und Adenin. Aufgrund seiner Nukleophilie bindet der größte Teil des Cisplatin an dem N7-Atom von Guanin (Gelasco *et al.*, 1998; Baik *et al.*, 2003). Zunächst erfolgt eine monofunktionale Bindung von Cisplatin an eine Base, woraus anschließend Quervernetzungen mit anderen Basen entstehen können. Die entstehenden bivalenten Addukte können sich zwischen benachbarten Basen innerhalb eines DNA-Strangs (Intrastrangverknüpfungen) oder zwischen den DNA-Strängen (Interstrangverknüpfungen) bilden (Abbildung 1.5). Die Cisplatin-induzierten DNA-Addukte treten vor allem innerhalb eines Stranges auf, wobei die stark zytotoxische Vernetzung zweier benachbarter Guanin-Basen (1,2-GpG) am häufigsten vorkommt (60 % bis 65 %) (Pinto *et al.*, 1985; Kartalou *et al.*, 2001; Rebillard *et al.*, 2008). Die Intrastrangverknüpfungen zwischen Adenin- und Guanin-Basen (1,2-d(ApG)-Addukte) und die Vernetzung zweier nicht-benachbarter Guanine (1,3-d(GpNpG)-Addukte) tauchen mit einer deutlich geringeren Häufigkeit von 25 % bzw. 10 % auf. Noch seltener entstehen Quervernetzungen zwischen beiden DNA-Strängen (1 % bis 5 %) oder residuale Monoaddukte (Fichtinger-Schepman *et al.*, 1985). Als Konsequenz der Cisplatin-DNA-Addukte kommt es zu einer Deformierung der DNA-Doppelhelix, wodurch die Transkription und die Replikation der DNA erheblich beeinträchtigt bzw. blockiert wird (Mello *et al.*, 1995; Cohen *et al.*, 2001; Cepeda *et al.*, 2007). Durch bivalente DNA-Addukte kommt es zu einer Modifizierung der Sekundärstruktur. 1,2-Intrastrangverknüpfungen drehen die DNA um etwa 13° und beugen die DNA-Doppelhelix um etwa 34° zur großen Furche (Rice *et al.*, 1988; Bellon *et al.*, 1991; Takahara *et al.*, 1995; Jamieson *et al.*, 1999; Scheeff *et al.*, 1999). Diese Verformung führt zu einer Abschwächung der Wasserstoffbrückenbindung zwischen den komplementären Basen und verringert die thermische Stabilität der DNA. Die resultierende Blockade der Replikation kann Brüche im Rückgrat der Helix hervorrufen (Olive *et al.*, 2009), welche die DNA-Schadensantwort aktivieren, sodass es zu einer Einleitung der DNA-Reparatur kommt. Übersteigt das Ausmaß der Schäden die zelluläre Reparaturkapazität wird der Zelltod mittels Apoptose (Norbury *et al.*, 2004; Roos *et al.*, 2013) oder Nekrose (Hirst *et al.*, 2015) eingeleitet, wodurch die Entstehung von Mutationen und fehlerhafter Zellteilung verhindert wird. Neben der Zytotoxizität-auslösenden Eigenschaft der DNA-Bindung gibt es auch Bindungen an andere zelluläre Strukturen, die zu dieser Toxizität beitragen. Dies findet seine Begründung in der Tatsache, dass Cisplatin außerdem auf kernlose Zellen zytotoxisch wirkt. Ein Beispiel ist

die zuvor erwähnte Bindung von Cisplatin an Glutathion. Dadurch kann es intrazellulär zu einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROS) kommen. Diese können neben der DNA auch die Mitochondrien schädigen (Siddik, 2003; Cepeda *et al.*, 2007). Diese Schädigung erfolgt jedoch nicht nur durch ROS, sondern auch über die direkte Bindung von Cisplatin an die DNA der Mitochondrien.

1.2.2 Anthrazykline

Anthrazykline wurden ursprünglich als Antibiotika aus verschiedenen Spezies von *Streptomyces* isoliert (Oki, 1977). 1960 wurden Doxorubicin und Daunorubicin als erste Vertreter dieser Substanzklasse eingeführt (Dubost *et al.*, 1963; Dimarco *et al.*, 1964). Aufgrund der zahlreichen Nebenwirkungen, wie zum Beispiel Kardio- und Myelotoxizität, die die Therapie limitieren, wurden weitere Derivate, mit der Hoffnung auf weniger ausgeprägte Nebenwirkungen bei gleichbleibender oder besserer Wirksamkeit, entwickelt. Dazu zählen u. a. Epirubicin und pegyliertes liposomales Doxorubicin. Anthrazykline, glykosidische Derivate des Tetrahydronaphacenchinons, sind über das C7-Atom O-glykosidisch mit einem Aminozucker verbunden. Dieser Aminozucker verleiht dem Anthrazyklin-Molekül basische Eigenschaften. Das Anthrachinon als hydrophobe Region ist koplanar, wohingegen die hydrophile Region, bestehend aus dem protonierten Aminozucker und der Hydroxylgruppe-Gruppe, gewinkelt absteht (Abbildung 1.6).

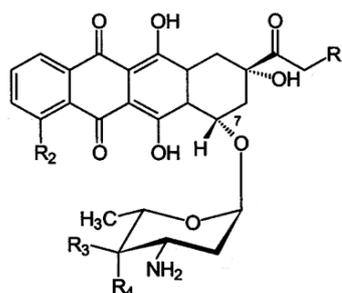


Abbildung 1.6: Struktur des Anthrazyklin-Grundgerüsts.

Unterschiede innerhalb der Substanzklasse sind vor allem durch die verschiedenen Seitenketten und die Stereochemie des Zuckerrests gekennzeichnet. Durch diese unterschiedlichen Konfigurationen entstehen jedoch große Unterschiede in Pharmakokinetik und Toxizität. Die wichtigsten, in der Klinik verwendeten Anthrazykline sind Daunorubicin, Doxorubicin, Epirubicin und Idarubicin (Abbildung 1.7).

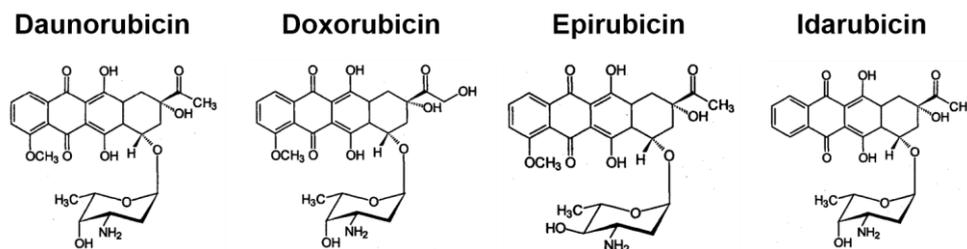


Abbildung 1.7: Chemische Strukturen von Daunorubicin, Doxorubicin, Epirubicin und Idarubicin.

Eine zytotoxische Wirkung ist nach Behandlung mit den Anthrazyklinen trotz verschiedener Mechanismen vor allem in der S-Phase des Zellzyklus zu beobachten. Dies liegt zum einen an der Interkalation in die DNA der Zellen (Pigram *et al.*, 1972; Patel *et al.*, 1978) und zum anderen an der Inhibition der Topoisomerase II-Isoformen, welche für die Hydrolyse und das Wiederverknüpfen der superhelikalen DNA-Stränge während der Replikation zuständig sind (Wassermann *et al.*, 1990; Gewirtz, 1999). Des Weiteren kommt es zu einer Bildung freier Sauerstoffradikale (Lown *et al.*, 1977).

1.2.2.1 Doxorubicin

Doxorubicin ist das am häufigsten verwendete Anthrazyklin und wurde aus einer Mutante des *Streptomyces peucetius* Stammes gewonnen (Arcamone *et al.*, 2000). Es ist Bestandteil vieler Standardtherapien verschiedenster Krebserkrankungen, wie z. B. Bronchial-, Magen-, Pankreas- und Blasenkarzinomen, Lymphomen, Endometrium-, Mamma-, Ovarial- und Zervixkarzinomen sowie Sarkomen. Ferner werden adulte Leukämien und Tumore von Kindern mit Doxorubicin behandelt (Blum *et al.*, 1974; Lupetti *et al.*, 2002; Bergeron *et al.*, 2008). Doxorubicin wird intravenös mittels Bolus oder Infusion verabreicht und verteilt sich schnell im Organismus. Es wird vorwiegend hepatisch über CYP3A4 metabolisiert. Als Hauptreaktion des Phase-I-Metabolismus wird die Reduktion der Ketogruppe am C13-Atom zur Hydroxylfunktion genannt, wobei das Zwischenprodukt hier Doxorubicinol ist. Ein weiterer Abbauweg erfolgt über die Spaltung der glykosidischen Bindung des Aminozuckers am C7-Atom zum Doxorubicin- bzw. Doxorubicinol-Aglycon (Abbildung 1.8) (Camaggi *et al.*, 1988; Danesi *et al.*, 2002).

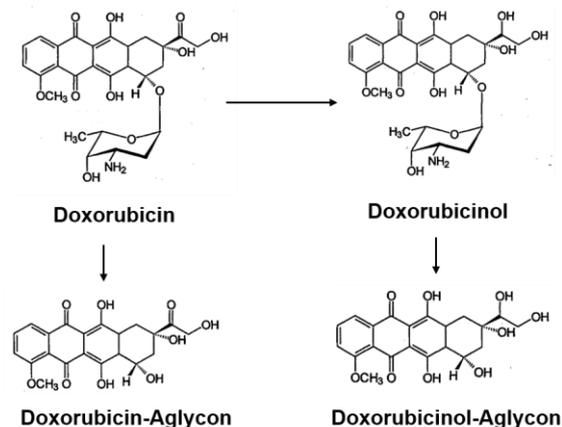


Abbildung 1.8: Metabolisierung von Doxorubicin in der Leber.

Nach intravenöser Gabe von Doxorubicin wird es vorwiegend hepatisch über CYP3A4 metabolisiert. Als Hauptreaktion des Phase-I-Metabolismus wird Doxorubicinol als Zwischenprodukt gebildet. Ein weiterer Abbauweg erfolgt über die Spaltung der glykosidischen Bindung des Aminozuckers am C7-Atom zum Doxorubicin- bzw. Doxorubicinol-Aglycon. Modifiziert nach Camaggi *et al.*, 1988

Die terminale Halbwertszeit beträgt 30 h, wobei die Ausscheidung hauptsächlich biliär erfolgt (Speth *et al.*, 1988). Bolusapplikationen zwischen 15 und 90 mg/m² Körperoberfläche führen zu maximalen initialen Plasmakonzentrationen von 5 µM. Im Normalfall werden Konzentrationen zwischen 1 und 2 µM gemessen, wobei der Plasmaspiegel schnell abfällt und final bei ca. 250 bis 750 nM liegt. Dies entspricht dem Konzentrationsbereich einer kontinuierlichen Infusion (Gewirtz, 1999). Doxorubicin weist fluoreszente Eigenschaften auf.

Das Anthrazyklin löst in proliferierenden Zellen in klinisch relevanten Dosen einen G₂-Arrest aus, bei höheren Dosen zusätzlich einen G₁-Arrest (Barlogie *et al.*, 1976; Krishan *et al.*, 1976). Es interkaliert sequenzspezifisch über das planare Chromophor in die DNA (Capranico *et al.*, 1997; Rabbani *et al.*, 2005). Dabei befindet sich der Daunosamin-Zucker in der kleinen Furche der DNA und wird durch Van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert (Jain *et al.*, 2005; Rabbani *et al.*, 2005). Die Funktion der Helikasen wird durch das in der DNA fixierte Doxorubicin-Molekül behindert. Somit werden die DNA- bzw. RNA-Synthese blockiert (Bachur *et al.*, 1992; Lown, 1993; Toonen *et al.*, 2001). Die DNA-schädigende Wirkung von Doxorubicin, bei Dosen zwischen 0,5 und 5,0 µM, kommt allerdings hauptsächlich durch die irreversible Inhibition der Topoisomerase IIα und Topoisomerase IIβ und den daraus resultierenden DNA-Doppelstrangbrüchen zustande (Kaufmann *et al.*, 1995; Gewirtz, 1999). Um topologischen Stress der DNA zu unterbinden, fügen Topoisomerasen der Klasse II reversibel DNA-Doppelstrangbrüche ein (Rose, 1988). Doxorubicin bindet, als Topoisomerase II-Gift, irreversibel an die Topoisomerase II und verhindert somit, dass

der zuvor erzeugte Strangbruch wieder verschlossen werden kann. Der „*Cleavable-Complex*“ setzt sich aus Doxorubicin und der Topoisomerase II zusammen und bindet kovalent an die DNA, bis er durch proteosomale Degradation abgebaut wird. Als Folge entstehen DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche, die, sofern sie nicht durch die Reparaturmechanismen der Zelle repariert werden, toxisch für die Zelle sind (Lyu *et al.*, 2007). Topoisomerase II β wird im Vergleich zur Topoisomerase II α in sämtlichen Zellzyklusphasen exprimiert, wohingegen Topoisomerase II α größtenteils in der S- und G₂/M-Phase des Zellzyklus in Erscheinung tritt (Capranico *et al.*, 1992; Goswami *et al.*, 1996). Als Folge dessen werden proliferierende Zellen stärker durch Doxorubicin geschädigt (Potter *et al.*, 2002). Andere Topoisomerase II-Inhibitoren agieren im Gegensatz zu Doxorubicin nicht als Interkalantien. Dazu gehört zum Beispiel das Podophylotoxin Etoposid, welches direkt an die Topoisomerase II bindet (Baldwin *et al.*, 2005). Eine weitere Eigenschaft von Doxorubicin ist die Fähigkeit, Radikale zu bilden. Diese in einem Zwischenschritt auftretenden Anthrazyklin-, Semichinon- und Sauerstoff-Radikale können mit zellulären Makromolekülen reagieren und zur Schädigung von DNA, Enzymen und Membranen führen (Bachur *et al.*, 1977; Bates *et al.*, 1982; Myers, 1988). Die DNA-Addukte und die messbaren ROS treten meist oberhalb der therapeutischen Dosen von Doxorubicin auf und gehen mit einer Zeitverzögerung nach der Applikation einher. Somit scheint eine direkt toxische Wirkung von Doxorubicin-induzierten ROS bei der Therapie nicht von Bedeutung zu sein. Jedoch wird diskutiert, ob eine Erhöhung der ROS-Menge, welche aufgrund von teilweise mangelnder Sensitivität der Nachweismethode schwer zu detektieren ist, einen Einfluss auf verschiedene Signalwege hat und somit möglicherweise zu einer indirekten Beeinflussung der Toxizität führt (Gewirtz, 1999). Nach einer Zunahme von ROS konnten unter anderem eine vermehrte Proliferation (Havens *et al.*, 2006) und eine Steigerung der Topoisomerase II-Aktivität (Li *et al.*, 1999) beobachtet werden. Dies könnte die durch Topoisomerase II-Inhibitoren vermittelte Toxizität potenzieren. Darüber hinaus wird über den Einfluss der Mitochondrien auf die Ausübung der Toxizität von Doxorubicin diskutiert (Mordente *et al.*, 2012).

Die Kardiotoxizität von Doxorubicin ist eine wichtige und die Therapie limitierende Nebenwirkung mit weitreichenden Folgen für Therapie und Prognose der Patienten (Chlebowski, 1979). Die akute Kardiotoxizität, welche bei 1 % der Fälle vorkommt, tritt innerhalb weniger Tage auf und ist gekennzeichnet durch reversible Herzrhythmus-Störungen, Hypertension und einer geringen kontraktile Funktionseinschränkung (Zucchi *et al.*, 2003). Die Kardiotoxizität kann jedoch auch mit einer Latenz von mehreren Jahren als manifeste Herzinsuffizienz in Erscheinung treten. In Myokardbiopsien zeigten

sich ein Verlust von Myofibrillen, eine Dilatation des sarkoplasmatischen Retikulums, eine Vakuolisierung des Zytoplasmas, eine Mitochondrienschwellung und eine massive Steigerung der Lysosomenzahl (Singal *et al.*, 2000). Die genauen molekularen Mechanismen, die zu einer akuten und chronischen Doxorubicin-bedingten Herzinsuffizienz führen, sind bis heute nur im Ansatz verstanden (Oliveira *et al.*, 2014). Um die Spezifität von Doxorubicin gegenüber Tumoren zu erhöhen, wurde ein liposomales *Coating* vorgenommen. Ziel ist es hier, dass sich der Wirkstoff in den Tumoren anreichert und so die Konzentration in lebenswichtigen Organen verringert wird. Das Polyethylenglykol-Coated („*pegylated*“) liposomale Doxorubicin wird zur Behandlung von Glioblastomen und in primär chemoresistenten Ovarialkarzinomen eingesetzt (Safra *et al.*, 2000). Darüber hinaus gibt es weitere Ansätze, die Anthrazyklinmoleküle zu verändern. Um spezifischer in Tumoren wirken zu können, wurden diese mit Antikörpern gekoppelt (Drummond *et al.*, 1999).

1.3 Zelluläre Stressantwort auf DNA-Schäden

1.3.1 DNA-Schadensantwort

Um die genomische Integrität zu wahren, sind die Zellen mit dem System der DNA-Schadensantwort (*DNA damage response*; DDR) und DNA-Reparaturproteinen ausgestattet (Hoeijmakers, 2001). Nach Erkennung eines DNA-Schaden über die Sensorsysteme wird die zelluläre Antwort über die komplexe Signalkaskade der DDR reguliert, was das Rekrutieren von Reparaturproteinen, das Arretieren des Zellzyklus und die Aktivierung von Zelltod- oder weiteren Differenzierungskontrollmechanismen umfasst (Smith *et al.*, 1999; Bartek *et al.*, 2003; Branzei *et al.*, 2008; Jackson *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2010) (Abbildung 1.9). Durch Doppelstrangbrüche oder Replikationsstress, entstanden zum Beispiel durch DNA-Addukte, werden die apikalen Serin/Threonin-Kinasen ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*ataxia telangiectasia and RAD3 related*) oder die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (*DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*; DNA-PKcs) aktiviert (Savitsky *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1999; Marechal *et al.*, 2013; Mazouzi *et al.*, 2014). Diese Signalkaskaden, der ATM- und der ATR-Signalweg sowie der durch DNA-PKcs aktivierte Signalweg, sind entscheidend für die korrekte Koordination der Zellzykluskontrollpunkte sowie der DNA-Reparatur, aber auch für Prozesse wie beispielsweise der Apoptose (Smith *et al.*, 2010). ATM und DNA-PKcs werden durch Doppelstrangbrüche aktiviert, wohingegen ATR auf Einzelstrang-Brüche bei einer blockierten Replikationsgabel reagiert (Bakkenist *et al.*,

2003; Cimprich *et al.*, 2008). Als DNA-Doppelstrangbruchsensor gilt der MRN-Komplex, bestehend aus MRE11 (*meiotic recombination 11*), RAD50 (*DNA repair protein RAD50*) sowie NBS1 (Nibrin) und rekrutiert ATM zu dem vorhandenen DNA-Schaden (Lee *et al.*, 2005). Nach der Bindung von ATM an den Doppelstrangbruch dissoziiert das zuvor inaktive Dimer in ein Monomer, wird autophosphoryliert und somit aktiviert (Bakkenist *et al.*, 2003). Darüber hinaus können Doppelstrangbrüche auch über das Heterodimer aus Ku70 (*X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6*; XRCC6) und Ku80 (*X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5*; XRCC5) erkannt werden, woran eine Rekrutierung der DNA-PKcs und andere an der Signalkaskade beteiligte Faktoren an den DNA-Schaden anschließt (Davis *et al.*, 2014). Die bei einer blockierten Replikationsgabel entstehenden Einzelstrangbereiche werden durch das Replikationsprotein A2 (*replication protein A2*; RPA) erkannt und folglich wird ATR zusammen mit ATRIP (*ATR interacting protein*) zu der Läsion rekrutiert wie auch aktiviert (Zou *et al.*, 2003; Ball *et al.*, 2005). Beide Kinasen phosphorylieren nach ihrer Aktivierung eine Reihe spezifischer Substrate, die an der Kontrolle des Zellzyklus, der DNA-Reparatur und der Apoptose beteiligt sind. Sowohl ATM und DNA-PKcs wie auch ATR phosphorylieren das Histon 2AX (*H2A histone family, member X*) an seinem Serin 139 (γ H2AX), welches den DNA-Reparaturproteinen die Schadensseite signalisiert und die Chromatin-Organisation reguliert (Kinner *et al.*, 2008; Mah *et al.*, 2010). γ H2AX wird als Surrogatmarker für DNA-Schäden betrachtet (Lobrich *et al.*, 2010; Valdiglesias *et al.*, 2013). Weitere Schadensindikatoren wie das P53-bindene Protein 1 (53BP1) werden durch ATM rekrutiert. Ferner werden die Zellzykluskontrollpunkt-Kinasen CHK1 und CHK2 durch ATR bzw. ATM aktiviert, wodurch der Zellzyklus an diversen Kontrollpunkten arretiert wird (Guo *et al.*, 2000; Matsuoka *et al.*, 2000). Diese Arretierung erfolgt über die Inaktivierung von Cdc25 (*cell division cycle phosphatase 25*) oder der Phosphorylierung des Tumorsuppressorproteins P53 und anschließender Induktion von P21^{CIP1/WAF1}. Es wird also folglich entweder der Zellzyklusübergang von der G₁- zu der S-Phase durch P21^{CIP1/WAF1} inhibiert oder, wenn der DNA-Schaden zu gravierend ist, eine caspasenvermittelte Apoptose eingeleitet (Ciccia *et al.*, 2010; Hoeflerlin *et al.*, 2011). Darüber hinaus phosphoryliert ATM den KRAB (*Krüppel-associated box*)-Korepressor KAP1 (*KRAB-associated protein 1*), welcher für die Chromatinkondensation verantwortlich ist (Cann *et al.*, 2011).

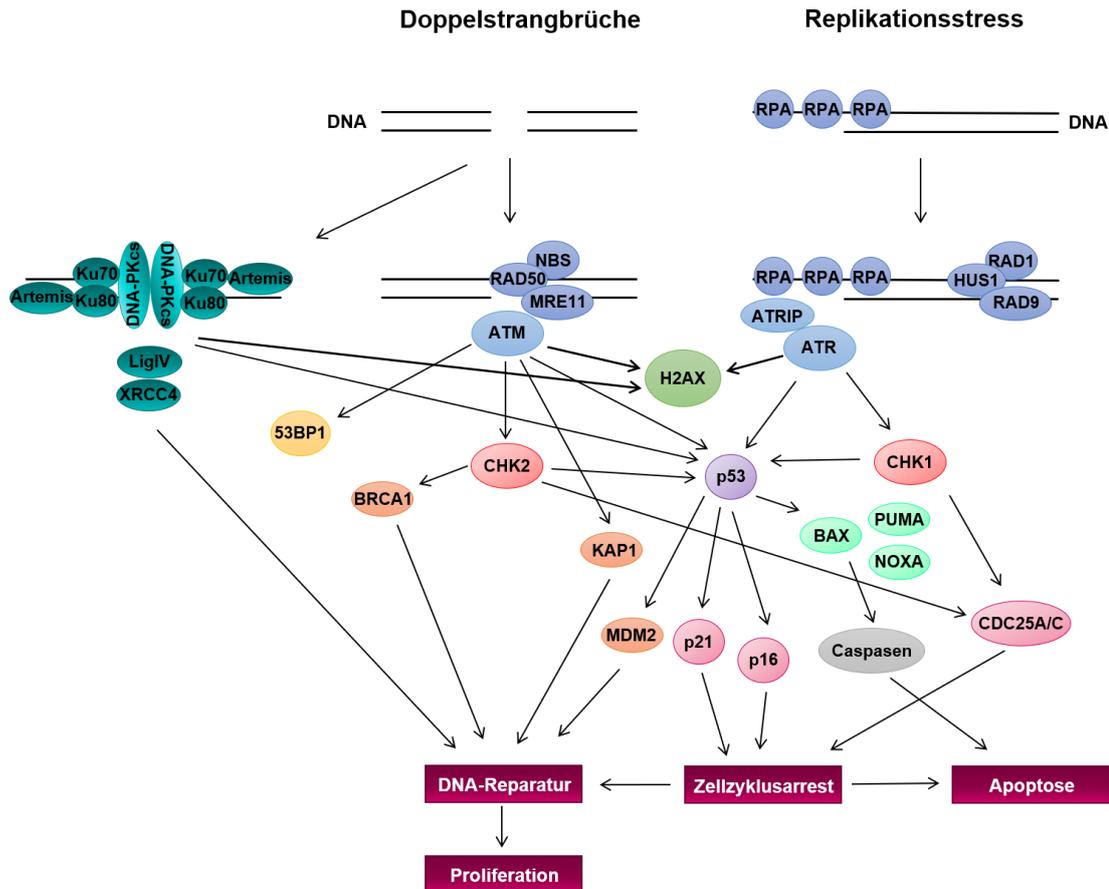


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der DNA-Schadensantwort.

Die DNA-Schadensantwort wird durch DNA-Doppelstrangbrüche oder durch Replikationsstress ausgelöst. Es kommt zur Aktivierung von ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*) oder ATR (*ataxia telangiectasia and RAD3 related*). Doppelstrangbrüche werden durch Ku70 (*X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6; XRCC6*) und Ku80 (*X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5; XRCC5*) oder durch den MRN-Komplex, bestehend aus den Proteinen MRE11 (*meiotic recombination 11*), RAD50 (*DNA repair protein RAD50*) und NBS1 (*Nibrin*), erkannt. Nach der Erkennung durch Ku70/Ku80 wird die DNA-PKcs aktiviert. Erfolgt die Detektion des DNA-Schadens durch den MRN-Komplex kann ATM an den Doppelstrangbruch binden und es werden weitere Proteine wie zum Beispiel 53BP1 (P53-bindendes Protein) aktiviert. Die bei einer blockierten Replikationsgabel entstehenden Einzelstrangbereiche werden durch das Replikationsprotein A2 (*replication protein A2; RPA*) erkannt und folglich wird ATR zusammen mit ATRIP (*ATR interacting protein*) zu der Läsion rekrutiert wie auch aktiviert. Nachfolgend werden eine Reihe spezifischer Substrate aktiviert, die an der Kontrolle des Zellzyklus, der DNA-Reparatur und der Apoptose beteiligt sind. Sowohl ATM und DNA-PKcs als auch ATR phosphorylieren das Histon 2AX (*H2A histone family, member X*) an seinem Serin 139 (γ H2AX). BAX: *BCL2-associated X protein*, BRCA1: *breast cancer 1*, CDC25: *cell division cycle 25*, CHK1: *checkpoint kinase 1*, CHK2: *checkpoint kinase 2*, HUS1: *HUS1 checkpoint homolog (S. pombe)*, KAP1: *KRAB-associated protein 1*, Lig IV: *Ligase IV*, MDM2: *MDM2 oncogene, E3 ubiquitin protein ligase*, NOXA: *BCL2 homology 3 (BH3)*, P16: *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*, P21: *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*, PUMA: *BCL2 binding component 3*, RAD1: *RAD1 homolog*, RAD9: *RAD9 homolog A*, XRCC4: *DNA Repair Protein XRCC4*. Modifiziert nach Smith und Jackson, 1999, Bartek *et al.*, 2003, Brnzei *et al.*, 2008, Smith, Tho *et al.*, 2010

1.3.1.1 DNA-Reparatur

Um die Integrität der DNA und damit die genetische Information auch nach Schädigung der DNA zu erhalten, haben sich verschiedene DNA-Reparatursysteme entwickelt. Alkylierungen der DNA können zum Beispiel über die Reversionsreparatur, aber auch über die Basenexzisionsreparatur (BER), die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) und die Fehlpaarungsreparatur (MMR) korrigiert werden. Doppelstrangbrüche werden dagegen entweder durch die Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) oder die homologe Rekombination (HR) repariert (Fu *et al.*, 2012).

Bei der Reversionsreparatur wird der DNA-Schaden nicht ausgeschnitten, sondern die Ausgangssituation wird durch eine enzymatische Reaktion wiederhergestellt. Alkylgruppen in der O⁶-Position des Guanins und der O⁴-Position des Thymins können mit Hilfe der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) entfernt werden (Sedgwick, 2004) (Abbildung 1.10). Dabei wird die Alkylgruppe direkt auf das Enzym übertragen, wodurch dieses inaktiviert wird (Kaina *et al.*, 2007; Shrivastav *et al.*, 2010). Dioxygenasen entfernen Methylierungen am N1-Atom des Adenins und N3-Atom des Cytosins, welche unrepariert zytotoxisch wirken würden.

Mit Hilfe der BER werden hauptsächlich kleinere Basenmodifikationen repariert, die durch Oxidation, Alkylierung oder ionisierende Strahlung entstehen (Luo *et al.*, 2010). Charakteristisch für diesen Reparaturweg sind die DNA-Schaden-erkennenden Glykosylasen, wie zum Beispiel MPG (*N-methylpurine DNA glycosylase*) oder OGG1 (*8-oxoguanine DNA glycosylase*) (Abbildung 1.10). Diese schneiden die modifizierte Base heraus, wodurch apurine/apyrimidine (AP)-Stellen entstehen (Christmann *et al.*, 2003). Nach der Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung seitens einer monofunktionellen Glykosylase erfolgt eine Spaltung der Phosphodiesterbindung durch eine AP-Endonuklease, beispielsweise mittels der apurinen Endonuklease-1 (APE1), wobei ein Einzelstrangbruch in 5'-Richtung der AP-Stelle entsteht (Wilson *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2010). Je nach Anzahl der für die Reparatur benötigten neu eingefügten Nukleotide wird zwischen der *short patch*- und der *long patch*-BER unterschieden. Bei der *short patch*-BER werden die AP-Stellen durch die DNA-Polymerase β (Pol β) entfernt und die fehlenden Nukleotide ersetzt. Anschließend verbindet die DNA-Ligase III den DNA-Strang. Die DNA-Ligase III interagiert dabei mit XRCC1 (*X-ray repair cross complementing 1*), Pol β und PARP1 (Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1) (Kubota *et al.*, 1996). Bei einer Reparatur des Einzelstrangbereiches über die *long patch*-BER kommt es nach der Abspaltung der Pol β zusätzlich zu einer DNA-Synthese durch die Polymerasen δ oder ϵ (Pol δ ; Pol ϵ) zusammen mit PCNA (*proliferating cell nuclear*

antigen) (Stucki *et al.*, 1998). Der durch die Synthese eines längeren DNA-Abschnittes entstehende Überhang wird mittels Flap-Endonuklease FEN1 entfernt und der DNA-Strang wird mit Hilfe der DNA-Ligase I ligiert (Klungland *et al.*, 1997; Robertson *et al.*, 2009).

Bei der NER werden alle größeren Addukte, die infolge von UV-Licht oder bestimmte Zytostatika entstehen und durch DNA- Glykosylasen nicht spezifisch erkannt werden, aus der DNA entfernt (Abbildung 1.10). Die NER wird, abhängig von Erkennung des DNA-Schadens, der beteiligten DNA-Reparaturfaktoren sowie der Lokalisation, in zwei Arten unterteilt. Dabei tritt die globale genomische NER (GG-NER) in transkriptionell inaktiven Bereichen des Genoms auf. Die Erkennung des DNA-Schadens erfolgt über das Heterodimer XPC (*Xeroderma pigmentosum, complementation group C protein*) - HR23B (*UV excision repair protein RAD23 homolog B*) und dem Proteinkomplex aus XPA (*Xeroderma pigmentosum, complementation group A protein*) und RPA. Beide Komplexe sorgen dafür, dass der Transkriptionsfaktor TFIIH mit den Helikasen XPB (*Xeroderma pigmentosum, complemen-tation group B protein*) und XPD (*Xeroderma pigmentosum, complementation group D protein*) zur distorsierten DNA-Läsion gelangt. Die dadurch unmittelbar in der Nähe der Läsion entwindete DNA wird durch XPA und RPA stabilisiert (Christmann *et al.*, 2003). Die transkriptionsgekoppelte NER (TC-NER) repariert transkriptionsblockierende DNA-Schäden in transkriptionell aktiven Bereichen (Bohr *et al.*, 1985; Wang *et al.*, 2003). Die RNA Polymerase II, welche durch eine Verformung der durch den Transkriptionsfaktor TFIIH entwundenen DNA-Doppelhelix blockiert wird, wird nach Rekrutierung von CSA (*Cockayne syndrome type A protein; ERCC8 (excision-repair cross-complementing 8)*) und CSB (*Cockayne syndrome type B protein; ERCC6 (excision-repair cross-complementing 6)*) an die Läsionsstelle von dieser Läsion entfernt, sodass nachfolgende Reparaturproteine einen Zugang erhalten (Nakatsu *et al.*, 2000). Bei beiden Typen der NER erfolgt eine Rekrutierung der Endonukleasen XPF (*Xeroderma pigmentosum, complementation group F protein*)-ERCC1 (*excision-repair cross-complementing 1*) sowie XPG (*Xeroderma pigmentosum, complementation group G protein; ERCC5 (excision-repair cross-complementing 5)*) an die zuvor markierte Läsion (Sarker *et al.*, 2005). Diese schneiden den DNA-Strang sowohl vor dem Schaden in 5'-Position als auch etwa 24 bis 32 bp von dem ersten Einschnitt entfernt in 3'-Richtung, sodass das fehlerhafte DNA-Einzelstrangstück entfernt wird. Mit Hilfe des unbeschädigten Stranges als Matrize wird der fehlende Bereich durch die DNA-Polymerasen δ und ϵ ersetzt und anschließend durch die DNA-Ligase I an den Strang ligiert (Mu *et al.*, 1995; de Laat *et al.*, 1999). Die zuvor erwähnten

Cisplatin-DNA-Addukte (Abschnitt 1.2.1.1) werden hauptsächlich durch die NER erkannt und prozessiert.

Die MMR erkennt und korrigiert Basenfehlpaarungen, aber auch kleinere Insertions- bzw. Deletionsschleifen, welche durch Fehler bei der DNA-Replikation, durch endogene ROS oder durch exogene Alkylanzien entstehen (Harfe *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2010) (Abbildung 1.10). Die Fehlpaarungen werden durch das Heterodimer MutSa, zusammengesetzt aus MSH2 (*mutS homolog 2*) und MSH6 (*mutS homolog 6*), erkannt. An die Fehlpaarungsstelle wird der Proteinkomplex MutL α , bestehend aus MLH1 und PMS2, rekrutiert, welcher eine Endonukleaseaktivität besitzt und den Strang in der Nähe der Fehlpaarung schneidet. Die Exonuklease wird rekrutiert und entfernt das fehlerhafte Segment. Der Strang wird durch die Polymerasen δ und ϵ neu synthetisiert und mit Hilfe der DNA-Ligase I verschlossen (Longley *et al.*, 1997; Christmann *et al.*, 2003; Li, 2008).

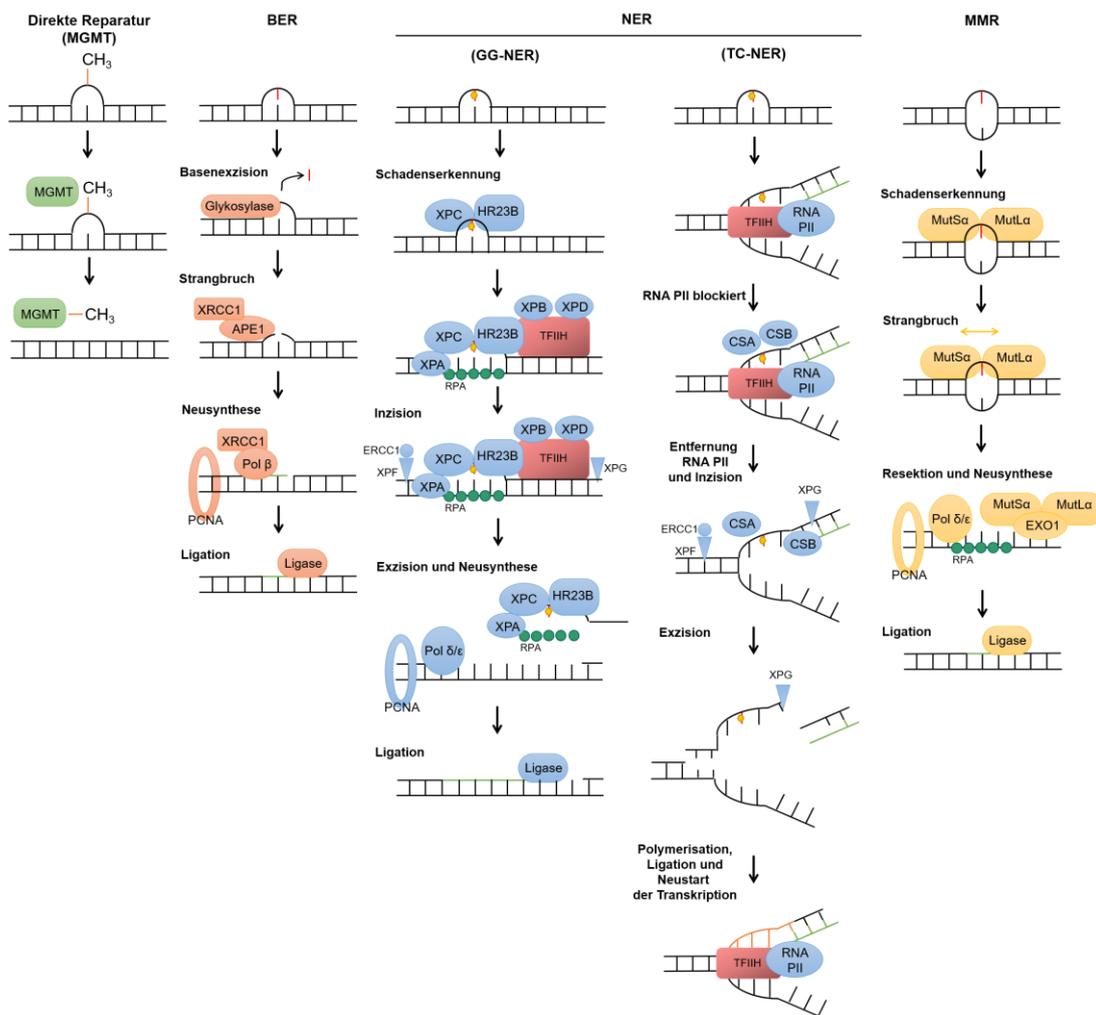


Abbildung 1.10: Verschiedene DNA-Reparaturmechanismen bei diversen Basenmodifikationen.

Bei der Reversionsreparatur werden vor allem das O⁶-Alkyl-Guanin durch die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) repariert. Dabei wird der Alkylrest irreversibel auf das Enzym übertragen und das Enzym verbraucht. Durch die Basenexzisionsreparatur (BER) werden Basenmodifikationen aus der DNA entfernt. Die Initiierung der BER erfolgt über DNA-Glykosylasen, die auch gleichzeitig die beschädigte Base entfernen. Danach erfolgt eine Spaltung der Phosphodiesterbindung durch die apurine Endonuklease-1 (APE1) und es entsteht ein Einzelstrangbruch in 5'-Richtung der AP (apurine/apyrimidine)-Stelle. Die AP-Stelle wird durch die DNA-Polymerase β (Pol β) entfernt, die fehlenden Nucleotide ersetzt und anschließend verbindet die DNA-Ligase III den DNA-Strang. Die Nucleotidexzisionsreparatur (NER) dient der Entfernung von DNA-Addukten. Man unterscheidet zwischen der global genomischen (GG)-NER und der transkriptionsgekoppelten (TC)-NER. Diese unterscheiden sich vor allem in der DNA-Schadenserkennung. Durch Komplex aus XPC (*Xeroderma pigmentosum, complementation group C protein*) und HR23B (*UV excision repair protein RAD23 homolog B*) wird der Schaden bei der GG-NER erkannt. Der Schaden bei der TC-NER wird durch CSA (*cockayne syndrome type A protein; ERCC8 (excision-repair cross-complementing 8)*) und CSB (*cockayne syndrome type B protein; ERCC6 (excision-repair cross-complementing 6)*) erkannt. Diese Proteine ermöglichen das Entfernen der Replikationsfaktoren und somit die Reparatur. Anschließend wird bei beiden Wegen ein Stück der DNA, welches den DNA-Schaden beinhaltet, herausgeschnitten und mit Hilfe des Partnerstranges und der Polymerasen δ und ε neu synthetisiert. Die Ligation erfolgt mit Hilfe der Ligase I. Die Fehlpaarungsreparatur (MMR) ist für die Entfernung von Basen-Fehlpaarungen zuständig. Die Fehlpaarung wird durch das Heterodimer MutSα erkannt und es erfolgt eine Rekrutierung des Heterodimers MutLα. Durch die Endonukleaseaktivität dieses Komplexes wird der Strang in der Nähe der Fehlpaarung geschnitten. Die Exonuklease EXO-1 wird rekrutiert und entfernt das fehlerhafte Segment. Der Strang wird durch die Polymerasen δ und ε neu synthetisiert und durch DNA-Ligase I verschlossen. Modifiziert nach Christmann *et al.*, 2003 und Fu *et al.*, 2012

DNA-Doppelstrangbrüche sind für die Zelle besonders kritisch, da sie unter anderem Genommutationen, chromosomale Aberrationen und Apoptose zur Folge haben können. Sie können durch ionisierende Strahlung und Zytostatika, aber auch bei der Replikation an Stellen mit DNA-Basenschäden, DNA-Strangverknüpfungen oder Einzelstrangbrüchen entstehen (Rich *et al.*, 2000). Nicht-reparierte Doppelstrangbrüche sind hauptverantwortlich für die Zytotoxizität DNA-schädigender Agenzien, weshalb den beiden Reparaturwegen, der homologen Rekombination (HR) und der nicht-homologen Endverknüpfung (*non-homologous end joining; NHEJ*), eine besondere Bedeutung bei der genomischen Stabilität und der Tumorgenese zukommt (Shrivastav *et al.*, 2008). Die HR operiert hauptsächlich in der S- und G₂-Phase, wohingegen die NHEJ während des gesamten Zellzyklus zur Verfügung steht, in der G₀- und G₁-Phase wiederum am aktivsten ist (Takata *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2000).

Bei der im Vergleich fehleranfälligeren NHEJ werden die gebrochenen Enden unabhängig von ihrer Sequenz wieder zusammengefügt, wobei es zum Verlust einiger Nucleotide kommen kann. Das Heterodimer aus Ku70 und Ku80 fungiert nicht nur als Schadenssensor, sondern sorgt ebenfalls dafür, dass die freien Enden in räumlicher Nähe bleiben und diese vor einem Angriff von Nucleasen und Ligasen geschützt sind (DeFazio *et al.*, 2002; Weterings *et al.*, 2003) (Abbildung 1.11). Die anschließende Rekrutierung der DNA-PKcs an den DNA-Schaden, welche zusammen mit dem

Heterodimer die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) bildet, resultiert in Autophosphorylierung und Phosphorylierung anderer NHEJ-Faktoren (Callen *et al.*, 2009; Davis *et al.*, 2014). Der Strangbruch kann bei homologen Überhängen direkt ligiert werden. Bei nicht-homologen Überhängen kommt es vor der Religation zu einer Prozessierung durch den MRN-Komplex, bestehend aus MRE11, RAD50 und NBS1. Dieser ist in der Lage 3'-Überhänge der DNA zu entfernen, wohingegen FEN1 die 5'-Überhänge abtrennt. Anschließend erfolgt die Ligation durch einen Komplex aus XRCC4 und der DNA-Ligase IV, welcher zuvor durch die DNA-PK aktiviert wurde (Teo *et al.*, 2000; Christmann *et al.*, 2003; van Attikum *et al.*, 2005). Die zuvor erwähnten durch Doxo hervorgerufenen DSBs werden bevorzugt über die NHEJ korrigiert (Pfitzer *et al.*, 2019).

Die HR ist im Gegensatz zu der NHEJ ein sehr präziser Prozess, bei dem die Reparatur des Doppelstrangbruchs durch den Abgleich mit sequenzhomologen Bereichen vonstattengeht (Sonoda *et al.*, 2001). Der Doppelstrangbruch wird durch den MRN-Komplex erkannt und anschließend erfolgt die Prozessierung der Enden unter Entstehung von 3'-Überhängen (Trujillo *et al.*, 1998; Paull *et al.*, 1999) (Abbildung 1.11). Unmittelbar nach dieser Formation werden die einzelsträngigen Bereiche durch RPA detektiert, gebunden und vor Schädigung geschützt. Mit Hilfe von BRCA1, BRCA2 und RAD52 wird RPA verdrängt und RAD51 auf das einzelsträngige DNA-Segment aufgeladen, sodass ein Nukleoproteinfilament entsteht (Song *et al.*, 2000; Stasiak *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2002; Ting *et al.*, 2004). Vor allem Rad51 ist für die Suche nach der homologen Sequenz und für die Stranginvasion des Einzelstrangs in das Schwesterchromatid verantwortlich (Baumann *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 1998). Durch diese Invasion entsteht eine D-Schleife, die theoretisch mit der anderen Seite des DNA-Doppelstrangbruchs zusammenpasst. Anhand des Schwesterstranges wird die DNA neu synthetisiert, die überkreuzten Strukturen (Hollidaystrukturen) werden getrennt und neu ligiert (Christmann *et al.*, 2003).

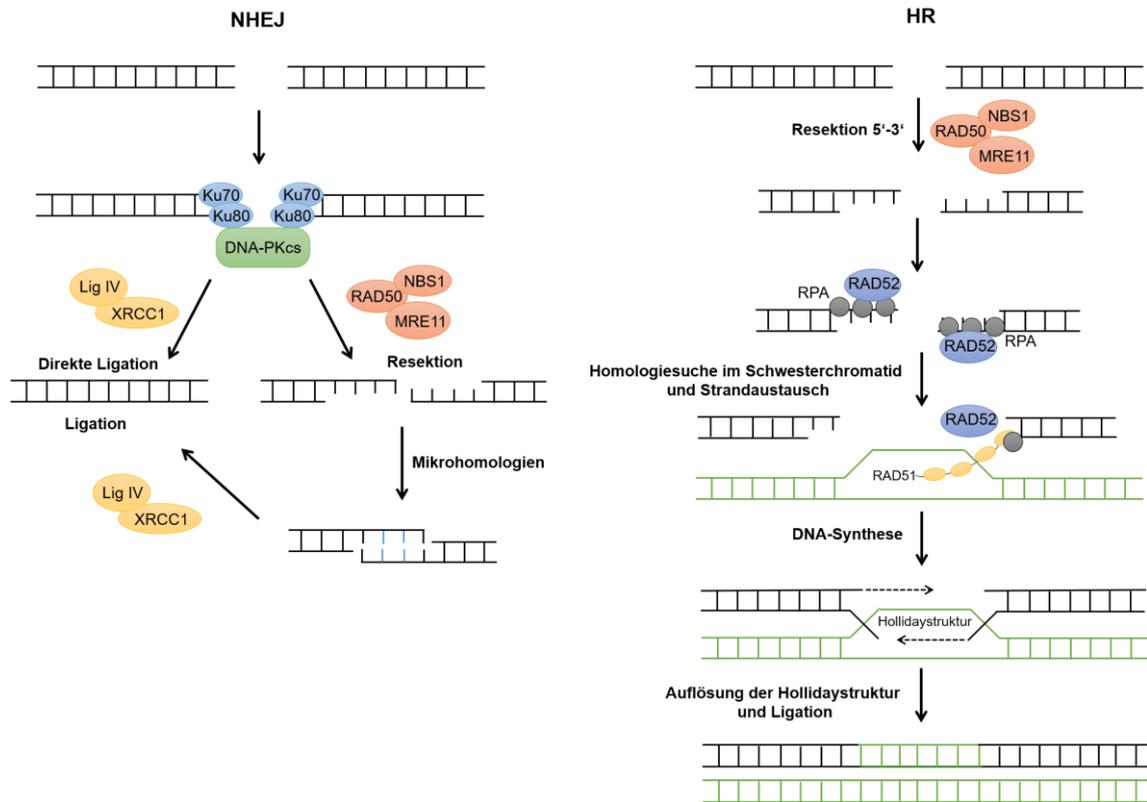


Abbildung 1.11: Verschiedene DNA-Reparaturmechanismen bei DNA-Doppelstrangbrüchen.

Doppelstrangbrüche werden entweder durch die nicht-homologen Strangverknüpfung (*non-homologous end joining*; NHEJ) oder der homologen Rekombination (HR) repariert. Bei der fehleranfälligeren NHEJ wird der Bruch durch das Heterodimer aus Ku70 (*X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6*; XRCC6) und Ku80 (*X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5*; XRCC5) erkannt und gebunden. Bei passenden Überhängen kann der Doppelstrangbruch direkt ligiert werden. Andernfalls werden die Enden mit Hilfe des MRN-Komplexes, bestehend aus den Proteinen MRE11 (*meiotic recombination 11*), RAD50 (*DNA repair protein RAD50*) und NBS1 (Nibrin), prozessiert. Die DNA-Stränge können über Mikrohomologien assoziieren und anschließend ligiert werden, jedoch kommt es durch Verlust von DNA-Teilen zu Fehlern. Bei der fehlerfreien HR wird der Bruch durch den MRN-Komplex detektiert und prozessiert, sodass ein 3' Einzelstrangüberhang entsteht. Dieser wird durch das Replikationsprotein A (RPA) geschützt und RAD51 und RAD52 werden zum DNA-Doppelstrangbruch rekrutiert. Rad51 ist für die Suche nach der passenden Sequenz und für die Stranginvasion des Einzelstrangs in das Schwesterchromatid verantwortlich. Durch diese Invasion entsteht eine D-Schleife, die theoretisch mit der anderen Seite des DNA-Doppelstrangbruchs zusammenpasst. Der Schwesterstrang dient als Vorlage für die DNA-Synthese, sodass die überkreuzten Strukturen (Hollidaystrukturen) getrennt und neu ligiert werden können. Modifiziert nach Christmann *et al.*, 2003 und Fu *et al.*, 2012

1.3.1.2 Apoptose

Als Schutzmechanismus des Organismus wird in Zellen, in denen der DNA-Schaden zu umfangreich oder irreparabel ist, der programmierte Zelltod (Apoptose) eingeleitet. Dabei kann die Apoptose schon durch einen einzigen, nicht korrekt reparierten Doppelstrangbruch induziert werden (Rich *et al.*, 2000). Kennzeichnend für die Apoptose sind das Schrumpfen der Zellen und die Ausbildung blasenförmiger Ausstülpungen an der Zelloberfläche („*membrane blebbing*“) sowie die nukleäre Kondensation, die Endonukleasen-abhängige DNA-Fragmentierung und Abschnürung von apoptotischen Körperchen, welche anschließend phagozytiert werden und zu einer Zellelimination ohne Entzündungsreaktion führen (Columbano, 1995; Martin *et al.*, 1995). Zentral wird die Apoptose über sogenannte Caspasen (*cysteiny-l-aspartate specific protease*) reguliert, indem sie ihre Substrate nach einem Aspartatrest spalten und es zu einer kaskadenartigen Aktivierung kommt. Caspasen werden in zwei Hauptklassen unterteilt: Initiatorcaspasen, dazu gehören die Caspasen 2, 8, 9 und 10, aktivieren *downstream* die Effektorcaspasen, wozu die Caspasen 3, 6 und 7 zählen. Diese besitzen eine enzymatische Aktivität und führen zu einer Reihe von Proteinspaltungen (Sakahira *et al.*, 2015).

Die Einleitung der Apoptose kann über einen extrinsischen oder intrinsischen Weg erfolgen. Der extrinsische Weg wird über die Bindung extrazellulärer Liganden an den TNF-Rezeptor 1 (*tumor necrosis factor receptor 1*) oder den an den Fas-Rezeptor angeregt. Es kommt zu einer Anlagerung des Adaptorproteins FADD (*FAS-associated death domain protein*), sodass der DISC (*death inducing signalling complex*) entsteht. Der entstehende Signalkomplex startet die Caspasenkaskade, indem er die Initiatorcaspasen 8 und 10 aktiviert, die daraufhin die Effektorcaspasen 3 und 7 spalten und die Apoptose einleiten (Kischkel *et al.*, 1995). Der intrinsische, durch Mitochondrien-vermittelte Weg wird hauptsächlich als Antwort auf bestimmte Stimuli aktiviert. Dazu zählen sowohl ROS, als auch DNA-Schäden. Durch die Aktivierung des Tumorsuppressorproteins P53 kommt es zu einer Anlagerung von Proteinen der BCL2 (*B cell lymphoma 2*)-Familie, dazu gehören u. a. BAX (*BCL2-associated protein*), PUMA (*BCL2-binding component 3*) und NOXA (*BCL2-homology 3 (BH3)*), an die Mitochondrienmembran (Cory *et al.*, 2002). Dies führt zu einer Permeabilisierung der Membran und zum Ausstrom von Cytochrom C, welches mit dem Adapterprotein APAF-1 (*apoptotic protease-activating factor-1*) und der Pro-Caspase 9 interagiert und zusammen das Apoptosom bilden. Die aktivierte Caspase 9 führt zur Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 (Zou *et al.*, 1999). Viele Zytostatika, welche primär

unterschiedliche Wirkungsweisen zeigen, führen über die Induktion von Apoptose zur Elimination von Tumorzellen.

1.3.2 Modulation der DNA-Schadensantwort zur Behandlung von Tumorerkrankungen

Die meisten der in der Krebstherapie eingesetzten Medikamente schädigen die DNA. Dabei kommt es zu DNA-Schäden, die im Laufe der Replikation u. a. zu Doppelstrangbrüchen prozessiert werden. Diese lösen die DNA-Schadensantwort aus und resultieren im Zelltod der malignen Zellen. Allerdings können diese Läsionen auch durch DNA-Reparaturmechanismen repariert werden, was zu einer reduzierten antitumorigenen Wirksamkeit dieser Zytostatika führt. Zusätzlich zeigt sich, dass in Krebszellen häufig Alterationen in der DNA-Schadensantwort auftreten. Bei einem Verlust oder bei verminderter Aktivität der einzelnen DNA-Reparatur-Faktoren kommt es wahrscheinlich zu einer Kompensation durch andere Reparaturwege. Eine vermehrte Aktivität führt häufig zu einer Entstehung von Resistenzen (Karran *et al.*, 1994; Heikkinen *et al.*, 2003; Hegi *et al.*, 2005; Antoni *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Willems *et al.*, 2008; Abbotts *et al.*, 2010; Evers *et al.*, 2010; Jalal *et al.*, 2011). Darüber hinaus tauchen durch die fehlende Spezifität der Chemotherapeutika gegenüber den Tumorzellen unerwünschte Nebenwirkungen in verschiedenen gesunden Körperzellen und -organen auf, die die Behandlung limitieren.

Es werden vermehrt Studien durchgeführt, um die Effizienz der Krebstherapie besonders durch die Induktion von DNA-Schäden und der damit verbundenen DNA-Schadensantwort zu optimieren (Kolas *et al.*, 2007; Paulsen *et al.*, 2009; Carreras Puigvert *et al.*, 2013). Besonders interessant sind Verbindungen, die zu einer spezifischen Modulation der DNA-Schadensantwort bzw. der DNA-Reparatur führen und synergistische, tumorspezifische-zytotoxische Effekte in der Kombination mit konventionellen Antitumorthapeutika bei der Behandlung von Krebs zeigen (Chirnomas *et al.*, 2006; Bin *et al.*, 2008; Davies *et al.*, 2011; Alekseev *et al.*, 2014; FitzGerald *et al.*, 2014; Goglia *et al.*, 2015; Weber *et al.*, 2015; Carrassa *et al.*, 2017). Einige der neuen Verbindungen, welche hauptsächlich Faktoren der DNA-Reparatur beeinflussen, sind bereits in klinischen Studien getestet und zeigen in der Monotherapie, aber auch in der Kombinationsbehandlung mit konventionellen Antitumorthapeutika Erfolge. Dazu gehört unter anderem die Behandlung von Tumoren, die eine Mutation in dem *BRCA1*- oder *BRCA2*-Gen aufweisen, mit PARP-Inhibitoren (z. B. Olaparib) (Farmer *et al.*, 2005; Jackson *et al.*, 2009). Die Hemmung von CHK1 (z. B. durch

Prexasertib) führt ebenfalls zu einer Verbesserung der Krebstherapie. SF-1126, ein PI3K-Inhibitor und *Prodrug* von LY294002, befindet sich derzeit in einer klinischen Studie für die Behandlung von Patienten mit soliden Tumoren (Puigvert *et al.*, 2016).

Darüber hinaus versucht man, den Replikationsstress von Tumorzellen therapeutisch nutzbar zu machen. Eine Möglichkeit ist die Inhibition von ATR (zum Beispiel mit Ceralasertib) und gleichzeitiger Behandlung mit Replikationsstress-hervorrufenden Substanzen wie Cisplatin, ionisierende Strahlung oder Gemcitabin (Foote *et al.*, 2015). Die DNA-Schadensantwort bietet somit vielfältige Möglichkeiten für eine verbesserte Behandlung von Tumoren. Als Quelle für neue Substanzen und Aufdeckung neuer Wirkmechanismen in diesem Zusammenhang gewinnen zytotoxisch wirksame Substanzen aus diversen Organismen (z. B. Mikroorganismen, Pflanzen und marinen Organismen) wieder an Bedeutung (Bailly, 2009).

1.4 Naturstoffe als Quelle für neue Krebsmedikamente

Unter einem Naturstoff versteht man eine chemische Verbindung, die von Organismen (z. B. Tiere, Pflanzen oder Mikroorganismen) gebildet wird und biologisch aktiv ist. Dabei handelt es sich meist um Substanzen aus dem Sekundärstoffwechsel der Organismen, die einen Selektionsvorteil in ihrem Lebensraum bringen (z. B. UV-Schutz oder Schutz vor Fressfeinden). Aufgrund der hohen Biodiversität gibt es eine große strukturelle Vielfalt von Naturstoffen, welche eine Vielzahl an Leitstrukturen mit antineoplastischem Potenzial liefert (Mann, 2002; Demain *et al.*, 2011; Kinghorn *et al.*, 2016; Lichota *et al.*, 2018; Seca *et al.*, 2018; Ren *et al.*, 2019). Bekannte Beispiele für Naturstoff-orientierte Zytostatika sind die Anthrazykline oder Taxane und Vinca-Alkaloide (Abschnitt 1.2). Jedoch geriet in der Krebstherapie die Erforschung neuer antitumorigen wirksamer Naturstoffe aufgrund der vielversprechenden Entwicklung im Bereich der monoklonalen Antikörper und der synthetisch hergestellten Kinase-Inhibitoren in den Hintergrund. Herkömmliche Zytostatika bilden jedoch weiterhin das Fundament der meisten (Kombinations-) Krebstherapien (Tabelle 1.1 und Abbildung 1.12). Von den 175 wichtigsten Zytostatika sind nur etwa 11 % Antikörper, biotechnologisch hergestellte oder körpereigene Stoffe. Synthetische Substanzen machen 24 % aus. Die restlichen 65 % setzen sich aus Naturstoffen, deren Derivate oder Naturstoff-basierten synthetisch hergestellten Verbindungen zusammen (Cragg *et al.*, 1997; Bailly, 2009).

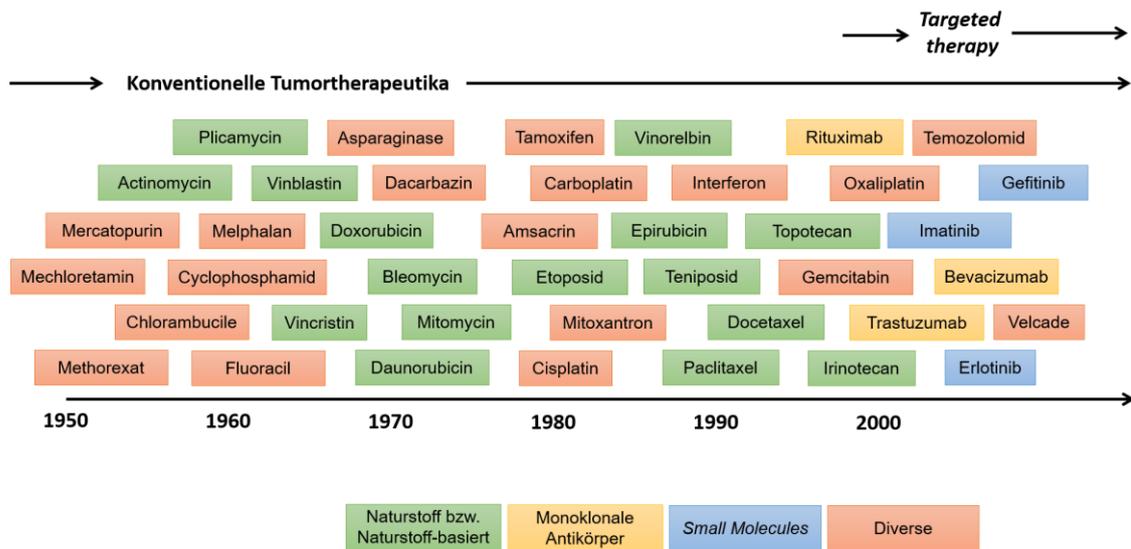


Abbildung 1.12: Kategorien der zugelassen Krebsmedikamente der letzten 50 Jahre.

Zytotoxische Naturstoffe bildeten bis Ende der 1990er eine vorherrschende Rolle in der konventionellen Tumorthherapie. Dies änderte sich jedoch durch die Entdeckung der gezielteren Behandlung von Tumoren durch monoklonale Antikörper und *small molecules*-Kinaseinhibitoren. Herkömmliche Zytostatika bilden weiterhin das Fundament der Krebstherapie. Da die unterschiedlichen Tumore vielfältige Behandlungsmöglichkeiten erfordern, bleibt die onkologische Forschung im Bereich der Naturstoffe von großer Bedeutung. Modifiziert nach Bailly, 2009

Im Jahr 2007 wurden folgende drei naturstoffbasierte Substanzen für die Behandlung von Tumoren neu zugelassen: Ixabepilone, Trabectedin und Tensirolimus. Ixabepilone ist ein semi-synthetisches Analogon der von dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* produzierten Epothilone. Es stabilisiert Mikrotubuli und führt zu einer Arretierung der Zellteilung von Tumorzellen sowie zu Apoptose. Im Vergleich zu den Taxanen ist Ixabepilone vermutlich weniger anfällig gegenüber einer Reihe von Resistenzmechanismen, wie zum Beispiel die Überexpression des P-Glykoproteins und die Alterationen in der β -Tubulin-Expression. Es wurde für die Behandlung von metastasierendem oder lokal fortgeschrittenem Brustkrebs zugelassen (Bollag *et al.*, 1995; Fournier, 2007; Altmann *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009). Trabectedin, ein Tetrahydroisochinolin-Alkaloid, wurde zuerst aus der Seescheide *Ecteinascidia turbinata* isoliert. Es agiert als DNA-alkylierende Substanz, durch welche spezifische Guanin-Reste und somit charakteristische DNA-Addukte entstehen, die die DNA-Reparatur aufgrund der einzigartigen Eigenschaften vor Herausforderungen stellt. Dieses Zytostatikum ist für die Behandlung von Weichteilsarkomen und Eierstockkrebs zugelassen (Soares *et al.*, 2007; Carter *et al.*, 2010). Tensirolimus ist ein Inhibitor der Proteinkinase mTOR (*mechanistic target of Rapamycin*) und ist für die Behandlung von fortgeschrittenem Nierenzellkarzinomen freigegeben (Ma *et al.*, 2007; Figlin, 2008). Der mTOR-Signalweg spielt einerseits bei der Zellproliferation und Zellteilung, andererseits bei der Angiogenese eine wichtige Rolle und ist Teil des PI3K/AKT-Signalweges. Durch

die Hemmung von mTOR wird unkontrollierte Zellproliferation gehemmt, Apoptose verstärkt und Angiogenese inhibiert.

Außerdem zeigen sich in laufenden Untersuchungen vielversprechende Naturstoffe, die in der Krebstherapie eingesetzt werden könnten. Dazu zählt unter anderem Aeroplysinin-1. Für das aus dem Schwamm *Aplysina aerophoba* isolierte Alkaloid wurde eine Inhibierung des EGFR (*epidermal growth factor receptor*)-Signalwegs (Kreuter *et al.*, 1990), eine antiproliferative Wirkung in Tumorzellen (Martinez-Poveda *et al.*, 2013) und eine Inhibierung der Angiogenese über die Induktion von Apoptose in Endothelzellen beschrieben (Kreuter *et al.*, 1989; Martinez-Poveda *et al.*, 2012). Ebenfalls zeigte sich ein Einfluss von Aeroplysinin-1 auf die Induktion von ROS, sodass sich dadurch eine gesteigerte Toxizität durch oxidative DNA-Schäden vermuten lässt (Koulman *et al.*, 1996; Hinterding *et al.*, 1998). Auch eine Modulation der Phosphorylierung von H2AX konnte detektiert werden (Stuhldreier *et al.*, 2015). Aaptamin, ein Alkaloid isoliert aus dem Schwamm *Aaptos aaptos*, zeigte in diversen Tumorzellen eine antiproliferative Wirkung. Das Alkaloid induziert, unabhängig von p53, p21^{WAF1} in Zellen der chronisch myeloischen Leukämie (CML) (Jin *et al.*, 2011), sowie in Osteosarkomzellen (Aoki *et al.*, 2006). Die Hemmung der Proliferation zeigte sich auch in Cisplatin-resistenten Keimzelltumoren (Dyshlovoy *et al.*, 2014), in Kolorektalkarzinom- und Lungenkrebszellen (Shen *et al.*, 1999). Aaptamin agiert als Inhibitor des Proteasoms (Tsukamoto *et al.*, 2010), ist antioxidativ und kann an die DNA binden (Bowling *et al.*, 2008). Die biologischen Effekte sind dosisabhängig, bei geringen Dosen kommt es zu einem Arrest in der G₂/M-Phase wohingegen bei höheren Dosen Apoptose ausgelöst wird (Dyshlovoy *et al.*, 2012). Für beide Alkaloide konnte in der Kombination mit dem Anthrazyklin Daunorubicin eine gesteigerte zytotoxische Wirkung in AML (akute myeloische Leukämie)-Zellen gezeigt werden (Stuhldreier *et al.*, 2015). Die Potenzierung der zytotoxischen Aktivität von konventionellen Antitumortheraeutika kann oft auf die Inhibierung von Transportern, die die Substanzen wieder aus der Zelle schleusen, zum Beispiel des Transporters MDR1 (*multi drug resistance protein 1*), zurückgeführt werden (Nielsen *et al.*, 1992). Naturstoffe könnten für das Überwinden von Transport-abhängigen Resistenzen von Bedeutung sein. Für Aeroplysinin-1 und Aaptamin konnte gezeigt werden, dass die Beeinflussung des Daunorubicin-bedingten Zelltodes unabhängig vom Daunorubicin-Transport ist (Stuhldreier *et al.*, 2015).

Ein anderes Beispiel ist das von Artemisinin abgeleitete Derivat Artesunat, welches seit 1973 primär zur Behandlung von der durch *Plasmodium falciparum* verursachten Malaria eingesetzt wurde (Li *et al.*, 2016). Es wurde zudem ein antineoplastisches Potenzial für

diverse Tumorzellen beschrieben (Woerdenbag *et al.*, 1993; Efferth *et al.*, 2003; Efferth *et al.*, 2008). Artesunat ist in der Lage, mitochondriale Apoptose in Brustkrebszellen auszulösen (Hamacher-Brady *et al.*, 2011). Durch Artesunat kommt es zur Induktion von oxidativem Stress, zur Aktivierung der DNA-Schadensantwort und zur Beeinflussung der DNA-Reparatur (Li *et al.*, 2008; Berdelle *et al.*, 2011), weshalb sich dieser Naturstoff insbesondere für Kombinationen mit konventionellen Tumorthapeutika eignet (Efferth, 2017). Besonders interessant ist die Fähigkeit, die Sensitivität von diversen ovariellen Krebszelllinien gegenüber Cisplatin zu erhöhen. Dies wird durch die Herabregulierung von RAD51 und der damit einhergehenden Beeinträchtigung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur hervorgerufen. Dies führt zu einer synergistischen Steigerung der DNA-Doppelstrangbrüche und in Konsequenz zu einer Proliferationshemmung von ovariellen Krebszellen (Wang *et al.*, 2015). Ebenfalls in Kombination mit Decitabin (Wang *et al.*, 2015), ionisierender Strahlung (Reichert *et al.*, 2012) und Tyrosin-Kinase Inhibitoren (Efferth *et al.*, 2004) führt Artesunat zu einer verbesserten antitumorigenen Wirkung. Durch die Inhibierung der homologen Rekombination in Glioblastomzellen konnte der apoptotische Effekt von Temozolomid potenziert werden (Berte *et al.*, 2016). Für diverse Naturstoffe, u. a. für Resveratrol, wurde eine spezifische Blockierung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur beschrieben (Gatz *et al.*, 2008).

Aufgrund der Vielfalt der Naturstoffe und der damit einhergehenden Menge an möglichen Angriffspunkten im tumorspezifischen Stoffwechsel und der tumorspezifischen Eigenschaften liefern diese ein hohes Potenzial, die Effizienz von konventionellen Antitumorthapeutika über die Modulation der DNA-Schadensantwort zu steigern und gegebenenfalls Resistenzen zu überwinden. Dies kann entweder über die Förderung der durch die DDR-ausgelösten Zelltodmechanismen und/oder über die Inhibierung der Überlebensmechanismen erfolgen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Naturstoffe sind wichtige Leitsubstanzen für das Design neuer und wirksamer Krebsmedikamente (Mann, 2002; Demain *et al.*, 2011; Kinghorn *et al.*, 2016; Lichota *et al.*, 2018; Seca *et al.*, 2018; Ren *et al.*, 2019). Konventionelle (d. h. genotoxische) Tumortherapeutika schädigen die genomische DNA der malignen Zellen und erzielen durch die Beeinflussung der Zellteilung von Tumorzellen somit ihre primäre antitumorogene Wirkung. In Folge der DNA-Schädigung wird eine komplexe Stressantwort aktiviert, die sogenannte DNA-Schadensantwort (DDR). Die zu der PI3K-ähnlichen Proteinfamilie gehörigen Kinasen ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*ataxia telangiectasia and RAD3 related*) sind die Hauptregulatoren der DDR. Sie sorgen für eine koordinierte Regulation der DNA-Reparatur, der Aktivierung von Zellzyklus-Kontrollpunkten und der Apoptose. Aus diesem Grund sind Mechanismen der DDR attraktive Zielstrukturen für die Entwicklung neuer tumortherapeutischer Ansätze.

In dieser Arbeit sollten bioaktive Naturstoffe, isoliert aus endophytischen Pilzen, Pflanzen, Flechten oder marinen Schwämmen, die eine Modulation der regulatorischen Faktoren der DDR und der DNA-Reparatur hervorrufen, identifiziert werden. Dabei sollten nicht nur Naturstoffe berücksichtigt werden, die per se einen Einfluss auf die DDR zeigen, sondern auch solche Naturstoffe, die die Tumortherapeutika-induzierte DNA-Schadensantwort beeinflussen und so die therapeutische Wirksamkeit konventioneller Therapien verbessern. Dazu sollten Pankreaskarzinom-Zellen (BxPC3- und SU.86.86-Zellen) als *in vitro*-Modellsysteme hinsichtlich ihrer Stressantworten nach Behandlung mit den Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin untersucht werden. Der Fokus hierbei sollte vor allem auf die Induktion von DNA-Schäden sowie eine Beeinflussung der DNA-Schadensantwort gelegt werden. Zunächst sollte die Veränderung der Stärke der Phosphorylierung des Histons 2AX an seinem Serin 139 (γ H2AX) als Surrogatmarker für DNA-Schaden in einer selbst neu etablierten Screening-Methode untersucht werden. Die Erfassung der DDR als Read-Out System stellt hierbei einen integrativen Ansatz dar, da Substanzen mit Einfluss auf Mechanismen des Transports und der Detoxifizierung ebenfalls (indirekt) erfasst werden. Dies gibt Hinweise auf mögliche Transport-bedingte Resistenzmechanismen. Anschließend sollte eine detaillierte molekulare Analyse des Einflusses ausgewählter Naturstoffe auf die DNA-Schadensantwort und der damit einhergehenden Prozesse (z. B. Zellzyklusprogression oder Zelltod) erfolgen.

Darüber hinaus sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Monotherapie wie auch die Kombinationsbehandlung auf die Vitalität diverser *in vitro*-Tumorzellmodelle, aber

auch auf Nicht-Tumorzellen und primären Rattenhepatozyten zeigt. Bei dem Vergleich der Nicht-Tumorzellen und der primären Rattenhepatozyten mit den Pankreaskarzinom-Zellen sollten qualitative sowie quantitative Unterschiede in den Stressantworten nach der Behandlung mit den Naturstoffen allein (Monotherapie) oder in Kombination mit ausgewählten Zytostatika (Kombinationstherapie) analysiert werden. Damit sollte die experimentelle Grundlage für die Entwicklung neuer Naturstoff-basierter Tumorthapeutika und neuen Kombinationsbehandlung geschaffen werden, die in der Lage sind, resistente Tumorzellen gegenüber konventionellen Tumorthapeutika zu sensibilisieren (Abbildung 1.13). In dieser Promotionsarbeit soll bewiesen werden, dass eine Modulation der DNA-Schadensantwort mit Hilfe von Naturstoffen aus der vorliegenden Naturstoffdatenbank zu einer Potenzierung der antitumorigenen Wirksamkeit der verwendeten Zytostatika führt.

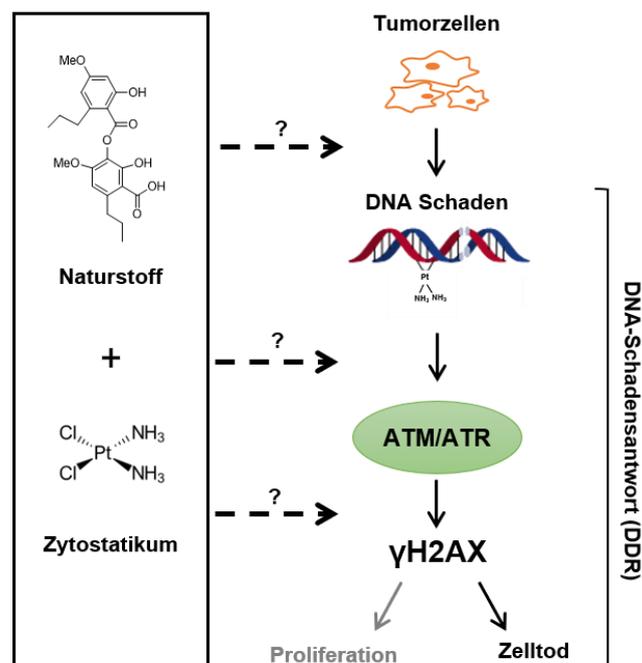


Abbildung 1.13: Vereinfachtes graphisches Modell der wissenschaftlichen Vorgehensweise.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Herstellernachweise

Tabelle 2.1: Auflistung der Herstellerhauptsitze.

Hersteller	Sitz
Abcam	Cambridge, UK
ACEA Biosciences Inc.	San Diego, Kalifornien, USA
Active Motif	La Hulpe, Belgien
Andreas Hettich GmbH & Co. KG	Tuttlingen, Deutschland
AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
ATCC	Manassas, Virginia, USA
Axon Lab AG	Stuttgart, Deutschland
B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Bayer AG	Leverkusen, Deutschland
Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Best Theratronics Ltd.	Vancouver, Kanada
BINDER GmbH	Tuttlingen, Deutschland
BioCision	Mill Valley, Kalifornien, USA
Bioline	London, UK
Biometra	Göttingen, Deutschland
Bio-Rad	Hercules, Kalifornien, USA
Biosan	Riga, Lettland
BioSurplus	San Diego, Kalifornien, USA
Biozym Scientific GmbH	Oldendorf, Deutschland
BRAND GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Calbiochem GmbH	Bad Soden am Taunus, Deutschland
Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Carl Zeiss AG	Jena, Deutschland
Cell Signaling Technology	Cambridge, UK
CellPharm	Hannover, Deutschland
Cole-Parmer GmbH	Wertheim, Deutschland
ComboSyn Inc.	Paramus, New Jersey, USA
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	Braunschweig, Deutschland
Edmund Bühler GmbH	Hechingen, Deutschland
Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eurofins Genomics	Huntsville, Alabama, USA

Excelitas Technologies Corp.	Waltham, Massachusetts, USA
Fresenius Kabi AG	Bad Homburg, Deutschland
GE Healthcare	Little Chalfont, UK
Gilson	Middleton, Wisconsin, USA
Grant Instruments Ltd.	Cambridge, UK
GraphPad	La Jolla, Kalifornien, USA
Greiner Bio-One International AG	Kremsmünster, Österreich
Hoffmann-La Roche	Basel, Schweiz
ICN Biomedicals GmbH	Eschwege, Deutschland
IKA-Werke GmbH & Co. KG	Staufen, Deutschland
Infactory	tinxi.com GmbH, Eggenstein- Leopoldshafen, Deutschland
Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH	Ballrechten-Dottingen, Deutschland
Invitrogen	Carlsbad, Kalifornien, USA
Kern & Sohn GmbH	Balingen-Frommern, Deutschland
Life Technologies	Carlsbad, Kalifornien, USA
Memmert GmbH & Co. KG	Schwabach, Deutschland
Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Merck Millipore	Billerica, Massachusetts, USA
National Institute of Health	Bethesda, Maryland, USA
Neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH	Heidelberg, Deutschland
NordCap®	Bremen, Deutschland
Olympus	Shinjuku, Japan
Omni Life Science GmbH & Co. KG	Bremen, Deutschland
Pechiney Plastic Packaging Inc.	Chicago, Illinois, USA
Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen, Deutschland
PerkinElmer Informatics	Cambridge, Massachusetts, USA
Promega Corp.	Madison, Wisconsin, USA
PromoCell	Heidelberg, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
Rockland Immunochemicals	Limerick, Pennsylvania, USA
Santa Cruz Biotechnology Inc.	Dallas, Texas, USA
Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Sartorius	Göttingen, Deutschland
Schott AG	Mainz, Deutschland
Scientific Industries Inc.	New York, USA
SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg, Deutschland
Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Starlab	Hamburg, Deutschland
Stuart®	Staffordshire, UK
Tecan Group AG	Männedorf, Schweiz
Teva Pharmaceutical Industries Ltd.	Petach Tikwa, Israel

Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
TriTrek Corp.	Sumerduck, Virginia, USA
Vector Laboratories	Burlingame, Kalifornien, USA
Vilber Lourmat Deutschland GmbH	Eberhardzell, Deutschland
VWR International GmbH	Radnor, Pennsylvania, USA
Zoetis	Parsippany, New Jersey, USA

2.1.2 Geräte

Tabelle 2.2: Auflistung der verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Hersteller
Absaugstation MINI-VAC ECO	Peqlab Biotechnologie GmbH
Bestrahlungsanlage Gammacell [®] 1000 Elite	Best Theratronics Ltd.
Blottingsystem Mini Trans-Blot [®] Cell	Bio-Rad
Chemidoc [™] Touch	Bio-Rad
CO ₂ -Inkubator Serie CB	BINDER GmbH
CoolCell [®] Einfrierbehältnis	BioCision
Dokumentationssystem Fusion FX7	Peqlab Biotechnologie GmbH
Durchflusszytometer BD Accuri [™] C6	Becton, Dickinson and Company
Eismaschine SPR-80	NordCap [®]
Elektrophoresekammer Perfect Blue [™]	Peqlab Biotechnologie GmbH
Gelsystem Midi S	
Feinwaage Kern ABS	Kern & Sohn GmbH
Fluoreszenzlampe HBO50	Carl Zeiss AG
Fluoreszenzlampe Olympus U-RFL-T	Olympus
Fluoreszenzlampe x-Cite Series 120Q	Exelitas Technologies Corp.
Fluoreszenzmikroskop Axiolab	Carl Zeiss AG
Fluoreszenzmikroskop BX43	Olympus
Fluoreszenzmikroskop CKX 41	Carl Zeiss AG
Gelelektrophoreseapparatur Mini	Bio-Rad
PROTEAN [®] Tetra Cell System	
Heizblock Drybath System	Starlab
Heizplatte/Magnetrührer Combimag Ret	IKA-Werke GmbH & Co. KG
iCELLigence	ACEA Biosciences Inc.
Kühlzentrifuge MIKRO 200 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG
Küvetten	Sarstedt
Laborschüttler Bio-PMR-30	Grant Instruments Ltd.
Laborschüttler SWIP SM25-C	Edmund Bühler GmbH
Mikroliterpipetten Pipetman classic 10 µl; 100 µl; 1000 µl	Gilson
Mikroliterpipetten Research [™] Plus 10 µl; 100 µl; 1000 µl	Eppendorf AG
Mikrotiterplatten-Lesegerät Infinite [®] F200	Tecan Group AG

Mikrotiterplatten-Photometer Sunrise™	Tecan Group AG
Milli-Q® Advantage A10 System	Merck Millipore
Mini Rocker-Shaker MR-1	Biosan
Mini Zentrifuge	Neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH
Mini-Vac power Vacuum System	Axon Lab AG
Multichannel Research plus	Eppendorf AG
Multipipette® plus	Eppendorf AG
NanoVue™ Plus Spectrophotometer	GE Healthcare
Netzgerät PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad
Personal Bio-Vortex V-1 plus	Peqlab Biotechnologie GmbH
QIAcube	Qiagen
Radiometer Copenhagen PHM 93	BioSurplus
Reference pH Meter	
Roller Mixer SRT9D	Stuart®
Roto-Shake Genie®	Scientific Industries Inc.
Schlauchpumpe Ismatec® Ecoline Easy Load	Cole-Parmer GmbH
Slot-Blot Apparatur	Carl Roth GmbH & Co. KG
Sonifiziergerät EpiShear™ Probe sonicator	Active Motif
Sterilbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific Inc.
Thermocycler Biometra T-Personal	Biometra
Thermomixer® compact	Eppendorf AG
Waage 3716 MO	Sartorius
Wärme-/Trockenschrank	Memmert GmbH & Co. KG
Wasserbad WNB22	Memmert GmbH & Co. KG
Wippschüttler ST5	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH
Zählkammer Neubauer-Improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Zentrifuge Heraeus™ Fresco 17	Thermo Fisher Scientific Inc.
Zentrifuge Heraeus™ Multifuge™ 16R	Thermo Fisher Scientific Inc.
Zentrifuge Perfect Spin P	Peqlab Biotechnologie GmbH
Zentrifuge Universal 320	Andreas Hettich GmbH & Co. KG

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.3: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
6-Well Platten	Greiner Bio-One International AG
8-Well Platten E-Plates L8	Omni Lief Science GmbH & Co. KG
24-Well Platten	Greiner Bio-One International AG
96-Well Platten	Greiner Bio-One International AG
96-Well Platten schwarz	Thermo Fischer Scientific Inc.

96-Well Platten schwarz, klarer Boden	Greiner Bio-One International AG
Braunüle Vasofix® Safety 14G; 18G	B. Braun Melsungen AG
Deckgläser Ø: 10 mm; 15 mm	VWR International GmbH
Einfrierrohrchen Cryo.s™	Greiner Bio-One International AG
Kanülen Sterican® 26Gx1“; 30G x ½“	B. Braun Melsungen AG
Mehrweckrohrchen 15 ml; 50 ml	Greiner Bio-One International AG
Objektträger	Thermo Fisher Scientific Inc.
Pasteurpipetten	BRAND GmbH & Co. KG
Pipettenspitzen	Starlab
10 µl; 100 µl; 1000 µl; 2500 µl	
Reaktionsgefäße	Sarstedt
0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml; 5 ml	
Spritzen Braun Injekt 1 ml; 5 ml; 20 ml	B. Braun Melsungen AG
Stepper Tips 20 µl; 100 µl	Eppendorf AG
Sterilfilter 0,2 µm; 0,45 µm	VWR International GmbH
Zellkulturflaschen 25 cm ² ; 75 cm ²	Greiner Bio-One International AG
Zellkulturschalen Ø: 3,5 cm; 6 cm	Greiner Bio-One International AG

2.1.4 Kits

Tabelle 2.4: Auflistung der verwendeten Kits.

Bezeichnung	Hersteller
Apo-ONE® homogeneous Caspase-3/7 Assay	Promega Corp.
BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD)	Hoffmann-La Roche
DNeasy Blood & Tissue	Qiagen
QIAquick Gel Extraction	Qiagen

2.1.5 Chemikalien

Tabelle 2.5: Auflistung der verwendeten Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Sigma-Aldrich
Agarose <i>high melting point</i>	Sigma-Aldrich
Agarose <i>low melting point</i>	Carl Roth GmbH & Co. KG
Albumin <i>Bovine Serum Fraction V</i>	Calbiochem
Ammoniumacetat	Merck KGaA
APS	Merck KGaA
BSA	Merck Millipore
Collagen from rat tail	Santa Cruz
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich
DMSO	Merck Millipore
EDTA	Sigma-Aldrich

EGTA	Carl Roth GmbH & Co. KG
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethanol	Merck Millipore
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Formaldehyd (37 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Hanks' Balanced Salt Solution	Sigma-Aldrich
HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG
HEPES	Thermo Fisher Scientific Inc.
Isopropanol	VWR International GmbH
Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius Kabi AG
KCl	Sigma-Aldrich
Ketamin	Zoetis
KH ₂ PO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG
Methanol	VWR International GmbH
Methylenblau	ICN Biomedicals GmbH
Methylmethansulfonat	Sigma-Aldrich
Na ₂ HPO ₄	Merck KGaA
Na-Acetat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Na-Citrat	Merck KGaA
NaCl	VWR International GmbH
Na-Laurylsarcosinat	Sigma-Aldrich
NaOH	Merck KGaA
Na-Resazurin	Sigma-Aldrich
Natriumazid	Fluka
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich
Natriumfluorid	Merck KGaA
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich
NP-40 (= Tergitol)	Sigma-Aldrich
Percoll [®]	Sigma-Aldrich
PIC	Calbiochem
PMSF	Sigma-Aldrich
Ponceau-S	Sigma-Aldrich
Propidiumjodid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Rotiphorese [®] Gel 30	Carl Roth GmbH & Co. KG
SDS	SERVA Electrophoresis GmbH
TEMED	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tris-Base	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tween 20	Merck KGaA
Wasser	Sigma-Aldrich

Xylazin (Rompun 2 %)	Bayer AG
ABTS	Sigma-Aldrich
Trolox	Calbiochem

2.1.6 Naturstoffe, Naturstoffdatenbank

Die Naturstoffe wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Dr. h.c. Peter Proksch, Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland, zur Verfügung gestellt. Insgesamt standen 296 Naturstoffe der Naturstoffdatenbank zur Verfügung. Die Strukturen der drei vielversprechendsten Substanzen sind in Abbildung 2.1 zu finden. Eine detaillierte Liste aller getesteter Naturstoffe einschließlich ihrer chemischen Struktur ist dem Anhang zu entnehmen (Tabelle 8.1).

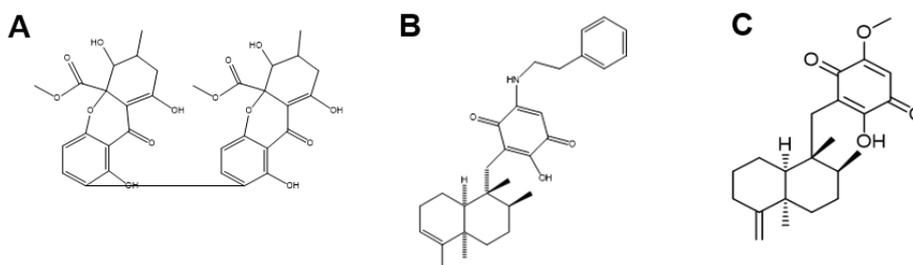


Abbildung 2.1: Strukturen der drei vielversprechendsten Naturstoffe.

Die Abbildung zeigt die drei vielversprechendsten Naturstoffe. Dazu zählen Secalonic acid F (A), 5-epi-Nakijiquinone Q (B) und 5-epi-Ilimaquinone (C).

2.1.7 Medien und Medienzusätze

Tabelle 2.6: Auflistung der verwendeten Medien und Medienzusätze.

Bezeichnung	Hersteller
DMEM	Sigma-Aldrich
DMEM ohne Phenolrot	Sigma-Aldrich
FCS	Merck Millipore
Hepatocyte Maintenance Supplement	Thermo Fisher Scientific Inc.
McCoy's 5A	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich
RPMI-1640	Sigma-Aldrich
William's E	Thermo Fisher Scientific Inc.

2.1.8 Zelllinien

Tabelle 2.7: Auflistung der verwendeten Zelllinien.

Bezeichnung	Bezugsquelle
BxPC3	ATCC
HCT-116	DSMZ
HT29	DSMZ
MDA-MB-231	DSMZ
NCI-H1975	ATCC
NHDF	PromoCell
SU.86.86	DSMZ

2.1.9 Enzyme

Tabelle 2.8: Auflistung der verwendeten Enzyme.

Bezeichnung	Bezugsquelle
Collagenase from clostridium histolyticum	Sigma-Aldrich
DNase-freie RNase	Qiagen
REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA-Lösung (10 x)	Sigma-Aldrich

2.1.10 Primer

Tabelle 2.9: Auflistung der verwendeten Primer.

Bezeichnung	Primersequenz
<i>KRAS</i> -PCR-Produkt	forward: 5'-GGGGGTCCACTAGGAAAAGT-3' reverse: 5'-TGATGTCACAATACCAAGAAACCC-3'
<i>KRAS</i> -Sequenzierung	forward: 5'-GAGTTTGTATTTAAAAGGTACTGGTGGGA-3' reverse: 5'-TGTATCAAAGAATGGTCCTGCAC-3'

Die Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics synthetisiert und vor Gebrauch auf 3 µM verdünnt.

2.1.11 Antikörper

2.1.11.1 Primärantikörper

Tabelle 2.10: Auflistung der verwendeten Primärantikörper.

Name	Spezies	Bezugsquelle	Verdünnung
53BP1	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1:500
Caspase 3, <i>cleaved</i>	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1:500
Caspase 7, <i>cleaved</i> (D198)	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1:00
Cis-(1,2-GpG)	Ratte	abcam	1:5000
pATM (S1981)	Maus	abcam	1:500
pATR (S428)	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1:1000
pCHK1 (S345)	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1:500
pCHK2 (T68)	Kaninchen	abcam	1:1000
pH3 (S10)	Kaninchen	Thermo Fisher Scientific Inc.	1:500
pKAP1 (S824)	Kaninchen	Bethyl Laboratories Inc.	1:1000
pP53 (Ser15)	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1:1000
pRPA32 (S4/S8)	Kaninchen	Bethyl Laboratories Inc.	1:1000
β-Aktin (C4)	Maus	Santa Cruz Biotechnologies Inc.	1:1000
Talin-1	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1:1000
γH2AX (S139)	Maus	Merck Millipore	1:500
γH2AX (S139)	Kaninchen	abcam	1:500

2.1.11.2 Sekundärantikörper

Tabelle 2.11: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper.

Name	Spezies	Bezugsquelle	Verdünnung
Alexa Fluor® 488	Ziege anti-Maus	invitrogen	1:500 – 1:1000
Alexa Fluor® 488	Ziege anti-Kaninchen	invitrogen	1:500 – 1:1000
Alexa Fluor® 555	Ziege anti-Maus	invitrogen	1:500 – 1:1000
Alexa Fluor® 555	Ziege anti-Kaninchen	invitrogen	1:500 – 1:1000
anti-Kaninchen IgG Peroxidase-konjugiert	Ziege anti-Kaninchen	Rockland Immunochemicals	1:2000

anti-Maus IgG Peroxidase-konjugiert	Ziege anti-Maus	Rockland Immunochemicals	1:2000
anti-Ratte IgG Peroxidase-konjugiert	Ziege anti-Ratte	Rockland Immunochemicals	1:2000

2.1.12 Sonstige Materialien

Tabelle 2.12: Auflistung sonstiger verwendeter Materialien.

Bezeichnung	Hersteller
Chromatographie-Papier Whatman™	GE Healthcare
Cisplatin	Teva Pharmaceutical Industries Ltd.
Doxorubicin	CellPharm
Glasflaschen	Schott AG
Glaspipetten 5 ml; 10 ml; 20 ml	BRAND GmbH & Co. KG
Nitrozellulosemembran Amersham™	GE Healthcare
Protran™ 0,2 µm	
Öl Immersion Oil Type-F	Olympus
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc.
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging Inc.
ProSieve™ QuadColor™ Protein Marker	Biozym
Roti®-Load-Puffer	Carl Roth GmbH
Vectashield®	Vector Laboratories
Zellschaber	Greiner Bio-One International AG
Zellsieb 100 µM; 200 µM	VWR International GmbH
Zellzähler	Infactory

2.1.13 Lösungen und Puffer

Tabelle 2.13: Auflistung der verwendeten Lösungen und Puffer.

Bezeichnung	Zusammensetzung
ABTS/APS-Arbeitslösung	5 ml 14 mM ABTS 5 ml 4,9 mM APS
Blottingpuffer	250 mM Tris-Base 192 mM Glycin 20 % (v/v) Ethanol
Elektrophoresepuffer (pH > 13)	300 mM NaOH 1 mM EDTA
Heparin	1000 U/ml in 0,9 % NaCl
Lysepuffer (pH 10,0)	2,5 M NaCl 100 mM EDTA 10 mM Tris-Base 1 % Na-Laurylsarcosinat vor Gebrauch: 89 ml Lysepuffer + 1 ml Triton X-100 + 10 ml DMSO

Methylenblaulösung	0,5 M Na-Acetat 0,4 g/l NaCl
NaCl/P _i -Puffer	1,06 mM KH ₂ PO ₄ 154 mM NaCl 3,77 mM Na ₂ HPO ₄
Neutralisationspuffer (pH 7,5)	400 mM Tris-Base
PBS (pH 7,4)	2 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2,7 mM KCl
PBS <i>high salt</i>	2 mM KH ₂ PO ₄ 400 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2,7 mM KCl
PBST	PBS 0,3 % (v/v) Triton X-100
Percolllösung	27,8 ml Percoll 4,2 ml Perfusionspuffer-Stammlösung (10 x)
Perfusionspuffer-Stammlösung (10 x)	81,82 g NaCl 3,73 g KCl 1,63 g MgCl ₂ x 6 H ₂ O 2,85 g Na ₂ HPO ₄ 0,544 g KH ₂ PO ₄ Ad 1 l bidest. H ₂ O; pH 7,4
PI	50 µg/ml PI PBS
Ponceau-S-Lösung	1,5 g/l Ponceau-S 5 ml/l Essigsäure
PP1	HBSS (-Ca ²⁺ /-Mg ²⁺) 10 mM HEPES 0,1 mM EGTA
PP2	DMEM <i>low glucose</i> 10 mM HEPES
Resazurinlösung	1 ml Resazurinstocklösung 9999 ml NaCl/P _i -Puffer
Resazurinstocklösung	440 mM Na-Resazurin in Dimethylformamid
RIPA Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1 % (v/v) NP-40 (= Tergitol) 0,1 % (w/v) SDS 1 % (v/v) Natriumdesoxycholat 1 mM Natriumorthovanadat 1 mM PMSF 50 mM Natriumfluorid 1 x PIC H ₂ O
DNase-freie RNase	1 mg/ml RNase A 10 mM Tris HCL pH 7,4

Sammelgel (5 %)	1,3 ml Acrylamid 30 % (Rotiphorese® Gel 30) 1 ml 1,5 M Tris-Base (pH 6,8) 5,5 ml MilliQ-H ₂ O 160 µl SDS (10 %) 80 µl APS (100 g/l) 80 µl TEMED (10 %)
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
SSC (10 x) (pH 7,0)	1,5 M NaCl 150 mM Na-Citrat
TBS	50 mM Tris-Base (pH 7,4) 150 mM NaCl
TBST	TBS 0,1 % (v/v) Tween 20
TE-Puffer	10 mM Tris-Base (pH 8,0) 1 mM EDTA
Trenngel (10 %)	6,7 ml Acrylamid 30 % (Rotiphorese® Gel 30) 5 ml 1,5 M Tris-Base (pH 8,8) 7,8 ml MilliQ-H ₂ O 200 µl SDS (10 %) 200 µl APS (100 g/l) 80 µl TEMED (10 %)
Trenngel (15 %)	10 ml Acrylamid 30 % (Rotiphorese® Gel 30) 5 ml 1,5 M Tris-Base (pH 8,8) 4,5 ml MilliQ-H ₂ O 200 µl SDS (10 %) 200 µl APS (100 g/l) 80 µl TEMED (10 %)
Trenngel (6 %)	4 ml Acrylamid 30 % (Rotiphorese® Gel 30) 5 ml 1,5 M Tris-Base (pH 8,8) 10,4 ml MilliQ-H ₂ O 200 µl SDS (10 %) 200 µl APS (100 g/l) 160 µl TEMED (10 %)
Waschpuffer	DMEM 10 mM HEPES 1 % Penicillin/Streptomycin 0,2 % BSA

2.1.14 Software

Tabelle 2.14: Auflistung der verwendeten Software.

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
BD Accuri™ C6 Plus	Becton, Dickinson and Company
BioEdit 7.2	Freeware; Entwickler: Tom Hall
CellSens Dimension	Olympus
ChemBioDraw Ultra 13	PerkinElmer Informatics
CompuSyn	ComboSyn Inc.
Fusion Software Version 15.17	Vilber Lourmat Deutschland GmbH
GraphPad Prism 6	GraphPad
i-control™ 1.8 Software	Tecan Group AG
ImageLab 6.01	Bio-Rad
Mikroskopsoftware ZEN 2012 (blue edition)	Carl Zeiss Microscopy GmbH
RTCA Data Analysis Software 1.0.0.1304	ACEA Biosciences Inc.
Software ImageJ 1.483	National Institute of Health
TriTek Comet Score™ Freeware v1.5	TriTek Corp.
Zen 2012	Carl Zeiss Microscopy GmbH

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur und Behandlungsschema

Sämtliche zellkulturelle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die humanen Pankreaskarzinomzellen BxPC3 und SU.86.86 sowie die Kolonkarzinomzellen (HT29) und die Lungenkarzinomzellen (NCI-H1975) wurden in RPMI-1640 mit 10 % hitze-inaktiviertem fetalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) sowie 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und einer Atmosphäre von 5 % CO₂ kultiviert. Humane dermale Fibroblasten (NHDF) und humane Brustkrebszellen (MDA-MB-231) wurden unter identischen Verhältnissen in DMEM (*Dulbeccos's modified Eagle's minimal essential medium*) mit 10 % FCS sowie 1 % Penicillin/Streptomycin versorgt. Die Kultivierung der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 erfolgte in McCoy's 5A (modifiziertes) Medium. Zu diesem Medium wurden ebenfalls 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin hinzugefügt und die Zellen wurden bei 37 °C und einer Atmosphäre von 5 % CO₂ kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von 80 % bis 90 %. Dazu wurden diese durch Inkubation mit Trypsin/EDTA bei 37 °C vom Boden der Zellkulturflasche gelöst (Inkubationszeiten: BxPC3, 10 min; SU.86.86, 10 min; HT29, 8 min; NCI-H1975, 5 min; NHDF, 5 min; MDA-MB-231, 5 min und HCT116, 3 min), vereinzelt und mit frischem Medium in der gewünschten Dichte in eine neue Kulturflasche und/oder für Zellexperimente in verschiedene Wellformate ausgesät. Die logarithmisch wachsenden Zellen wurden 24 h nach Aussaat behandelt. Falls nicht anders beschrieben, wurden die Zellen über die gesamte Dauer des Versuches mit 3 µM *Secalonic acid F* (SA), 5 µM *5-epi-Nakijiquinone* Q (NQ) oder 1,5 µM *5-epi-Illimaquinone* (IQ) oder anderen Naturstoffen behandelt. Für die Kombinationsbehandlungen wurden die Zellen zusätzlich mit 5 µM Cisplatin oder 0,3 µM Doxorubicin inkubiert. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte mit einer Cäsium¹³⁷-Quelle in der Bestrahlungsanlage Gammacell®1000 Elite.

2.2.1.1 Bestimmung der Verdopplungszeit

Um die Proliferationsgeschwindigkeit der verschiedenen Zelltypen zu ermitteln, wurde eine für die Zelllinie spezifische Anzahl Zellen pro 6 cm-Schale ausgesät und der Anstieg der Zellzahl durch Auszählen mittels Neubauer-Zählkammer über die Zeit bestimmt. Die Steigung der logarithmischen Trendlinie wurde zur Bestimmung der Verdopplungszeit genutzt.

2.2.2 Kryokonservierung von Zellen

Um Zellen für einen späteren Zeitpunkt aufzubewahren, wurden die Zellen kryokonserviert. Dazu wurde eine bestimmte Zellzahl mittels Zentrifugation pelletiert (1300 rpm; 3 min; RT) und in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Pro Kryovial wurden 1 ml Zellsuspension und 1 ml Einfriermedium, bestehend aus 80 % FCS und 20 % DMSO, unter Zuhilfenahme des CoolCell® mit einer kontrollierten Einfrierrate von $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro Minute, eingefroren. Das Behältnis wurde zunächst für 24 bis 48 h bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Anschließend wurden die Kryovials zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Bei Bedarf wurde dem flüssigen Stickstoff ein Kryovial entnommen, der Inhalt nach Auftauen bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in frisches Kulturmedium überführt und pelletiert (1300 rpm; 3 min; RT). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in frisches Kulturmedium aufgenommen und die Zellen wie oben beschrieben bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ kultiviert.

2.2.3 Molekularbiologie Methoden

2.2.3.1 DNA-Isolierung

Die Isolierung genomischer DNA wurde halbautomatisch mittels des *DNeasy Blood & Tissue Kits* und des Gerätes *QIAcube* unter Verwendung des Protokolls „*Purification of Total DNA from Animal Blood or cells*“ (Qiagen) durchgeführt. Die DNA wird dabei an der Silikamembran der verwendeten Säule adsorbiert und anschließend in Anwesenheit von chaotropen Salzen durch mehrere Waschschriffe gereinigt. Die Elution der DNA erfolgte durch die Zugabe von Wasser oder eines Elutionspuffers auf die Säulenmembran.

Nach Behandlung der Zellen wurden diese mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst, separiert und anschließend per Zentrifugation ($300 \times g$; 5 min; RT) pelletiert. Im Anschluss daran wurde das entstandene Pellet in $100\text{ }\mu\text{l}$ PBS resuspendiert und die Isolierung der genomischen DNA nach Herstellerangaben mit Hilfe des *QIAcubes* durchgeführt. Die Konzentration und Reinheit der isolierten DNA wurden photometrisch mit dem NanoVue™ Plus Spectrophotometer bestimmt. Die Reinheit der DNA ließ sich über den Quotienten der Absorptionen ermitteln, wobei die Absorptionsverhältnisse von 2,0 bis 2,2 (260 nm/230 nm) und 1,8 (260 nm/280 nm) reiner DNA entsprechen. Die isolierte, reine DNA wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.3.2 Endpunkt-PCR und Gelextraktion

Zur Vervielfältigung bestimmter DNA-Fragmente wurde die Endpunkt-PCR durchgeführt. Die Ermittlung geeigneter Primer-Sequenzen zur spezifischen Amplifikation des gewünschten Teilstückes der DNA erfolgte mit der Primer-Blast Software. Die Primer-Sequenzen zur Amplifikation (*KRAS*-PCR-Produkt) sind Tabelle 2.9 zu entnehmen. Im initialen Schritt der PCR wird doppelsträngige DNA denaturiert und die DNA-Stränge werden getrennt, sodass im nächsten Schritt die spezifischen Primer an die DNA binden können. In der Elongations-Phase dienen die hybridisierten Primer als Startermoleküle für die DNA-Polymerase, welche, komplementär zum jeweiligen Matrizenstrang, den DNA-Einzelstrang verlängern. Der REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaktionsmix, welcher sowohl die DNA-Polymerase wie auch die benötigten freien Desoxynukleosidtriphosphate beinhaltet, wurde für die Endpunkt-PCR nach Herstellerangaben verwendet. Das Gesamtreaktionsvolumen betrug 20 µl. Je Reaktionsansatz wurden 20 ng der genomischen DNA und 0,5 µM der Primer eingesetzt. Die PCR-Reaktion wurde mittels Thermocycler nach dem in Tabelle 2.15 aufgeführten Protokoll durchgeführt. Die Schritte der Denaturierung, der Primerhybridisierung und der Elongation wurden dabei für 35 Zyklen wiederholt. Die Amplifikate wurden auf ein 1,0 %iges Agarose-Ethidiumbromidgel aufgetragen und elektrophoretisch separiert (100 V, ca. 45 min, RT). Die Ethidiumbromid gefärbte DNA-Bande wurde anschließend durch die Anregung mit UV-Licht detektiert. Das PCR-Produkt wurde danach halbautomatisch mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* und des *QiaCubes* unter Verwendung des Protokolls „*Purification of Total DNA from Animal Blood or cells*“ (Qiagen) isoliert. Das PCR-Produkt wird dabei an der Silikamembran der verwendeten Säule adsorbiert und darauffolgend in Anwesenheit von chaotropen Salzen durch mehrere Waschschriffe gereinigt. Die Elution des PCR-Produktes erfolgte über die Zugabe von Wasser auf die Säulenmembran. Die Konzentration und Reinheit der isolierten DNA wurden photometrisch mit dem NanoVue™ Plus Spectrophotometer bestimmt. Die Reinheit der DNA wurde wie bereits oben im Abschnitt 2.2.3.1 beschrieben über den Quotienten der Absorptionen (260 nm/230 nm bzw. 260 nm/280 nm) bestätigt. Die isolierte DNA wurde bei – 20 °C gelagert.

Tabelle 2.15: Reaktionsbedingungen der Endpunkt PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	94 °C	2:00 min
Denaturierung	94 °C	0:30 min
Primerhybridisierung	62 °C	0:30 min
Elongation	72 °C	0:45 min
Finale Elongation	72 °C	7:00 min

2.2.3.3 Sequenzierung nach Sanger

Um den Onkogenstatus der verwendeten Pankreaskarzinomzellen zu bestimmen, erfolgte eine Sequenzanalyse des aufgereinigten PCR-Produktes am Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf statt. Die Sequenzen der Sequenzierungsprimer (KRAS-Sequenzierung), welche die onkogene Mutation des KRAS-Gens flankieren, wurden mit Hilfe der Primer-Blast Software bestimmt. Diese sind Tabelle 2.9 zu entnehmen.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Proteinisolierung

Zur Gesamtproteinisolierung wurden Zellpellets in 200 µl RIPA-Puffer aufgenommen und zum Zellaufschluss sonifiziert (30 % Amplitude; 1 s Puls; 1 s Pause, 5 Stöße; RT). Die Zellen werden hierbei durch Kavitationskräfte des eingesetzten Ultraschalls zerschert. Anschließend wurden die so entstandenen Zelltrümmer durch Zentrifugation (10000 x g; 10 min; 4 °C) pelletiert, sodass der proteinhaltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden konnte. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde mit Hilfe des DC™ Protein Assays bestimmt. 30 bis 50 µg Protein wurden mit dem Roti®-Load-Puffer versetzt. Das in dem Puffer enthaltende *sodium dodecyl sulfate* (SDS) ermöglicht die Denaturierung und Solubilisierung der Proteine und überlagert die Eigenladung der Proteine durch die Negativladung des resultierenden SDS-Proteinkomplexes. Durch das enthaltende β-Mercaptoethanol werden Disulfidbrücken in den Peptiden gespalten und die Sekundärstruktur der Proteine vorübergehend aufgehoben. Die anschließende Auftrennung im elektrischen Feld erfolgt somit ausschließlich über das Molekulargewicht. Die Proteinlysate wurden schockgefroren und bis zur Verwendung bei – 80 °C gelagert.

2.2.4.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der denaturierten Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Durch das Erzeugen eines elektrischen Feldes wandern die negativ geladenen Proteine zur Anode und werden durch die Poren in dem Acrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dabei ist die Laufstrecke umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molekülmasse. Durch das Sammelgel werden die Proteine an der Grenze zum Trenngel fokussiert, wodurch die Abgrenzung der Proteinbanden gefördert wird. Zur Auftrennung der Proteine wurden- in Abhängigkeit des Molekulargewichtes der zu detektierenden Proteine - 6 bis 15 %ige Trenngele sowie 5 %ige Sammelgele verwendet. Vor dem Auftragen erfolgte ein weiterer Denaturierungsschritt durch Hitze (95 °C; 5 min). Für die Ausführung der Elektrophorese wurde das Mini-PROTEAN® Tetra Cell Elektrophorese System genutzt. Die Proteine wurden in SDS-Laufpuffer bei 10 bis 30 mA pro Gel bis zur gewünschten Auftrennung separiert. Für die Größenbestimmung der Proteine wurde das Proteingemisch *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* verwendet.

2.2.4.3 Western Blot-Analyse

Die mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels des Mini Trans-Blot® Cell Systems auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (100 bis 300 mA; 90 min bis 16 h). Die erfolgreiche Übertragung der Proteine wurde anhand der temporären Anfärbung aller Proteine mit einer Ponceau-S-Lösung überprüft. Um unspezifische Antigen-Antikörperbindungen zu vermeiden, wurde die Membran mit einer 5 %igen Magermilchpulverlösung in TBST abgesättigt (2 h; RT). Anschließend wurde die Membran mit TBST gewaschen (3 x 5 min; RT) und in dem gewünschten Primärantikörper inkubiert (1:500 bis 1:1000; ü. N.; 4 °C). Die Verdünnung des Primärantikörpers erfolgte je nach Herstellerangaben in TBST, 5 %iger Magermilchpulver- oder BSA-Lösung (Tabelle 2.10). Um ungebundenen Primärantikörper zu entfernen, wurde die Membran nach der Inkubationszeit erneut mit TBST gewaschen (3 x 5 min; RT) und nachfolgend mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten, gegen die antigene Determinante des verwendeten Primärantikörpers gerichteten Sekundärantikörper inkubiert (1:2000; 2 h; RT). Die Verdünnung des Sekundärantikörpers erfolgte stets in 5 %iger Magermilchpulverlösung. Zur Detektion der Protein-Antikörperbindungen wurde die Membran in TBST (3 x 5 min; RT) gewaschen und mit einer luminiolhaltigen Chemilumineszenzlösung (*enhanced chemiluminescence*; ECL) des *BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) Kits*

inkubiert (1 min; RT). Die Intensität der Signale wurde mittels *Chemidoc Image* visualisiert und mittels der Image Lab™ Software Version 6.0.1 quantifiziert.

2.2.5 Analyse der Zellvitalität

2.2.5.1 Alamar Blue® Assay

Die Zellvitalität wurde mittels Alamar Blue®-Assay untersucht (O'Brien *et al.*, 2000). Lebende Zellen sind in der Lage, den blauen, wasserlöslichen, nicht-fluoreszierenden Farbstoff Resazurin zu dem rosafarbenen, fluoreszierenden Farbstoff Resorufin irreversibel zu reduzieren (Abbildung 2.2). Die gemessene Fluoreszenz stellt somit einen Indikator der zellulären Vitalität dar.

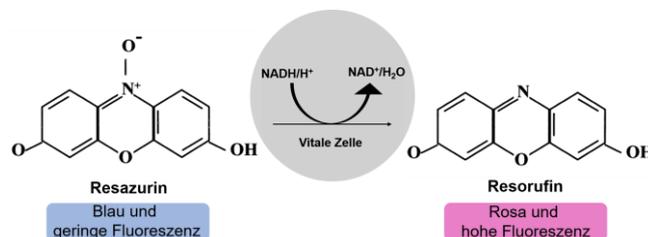


Abbildung 2.2: Prinzip des Alamar Blue® Assays.

Resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-on-10-oxid) wird durch metabolisch aktive Zellen zu Resorufin (7-Hydroxyphenoxazin-3-on) reduziert. Zytotoxische Agenzien senken die metabolische Aktivität und das Redoxpotenzial der Zelle, was zur Verlangsamung dieser Reaktion führen kann. Die Umsetzung des Farbstoffes kann mittels Fluorometrie gemessen werden (Anregung: 535 nm; Emission: 590 nm). Die Fluoreszenz dient als Maß für die Zellvitalität.

Für diesen Assay wurde das Zellkulturmedium entfernt und durch die vorgewärmte Resazurin-Arbeitslösung (100 µl Resazurininlösung in DMEM ohne Phenolrot (1:10)/96-Well; finale Konzentration: 44 µM) ersetzt, wobei *Blanks* (nur mit Zellkulturmedium befüllte Kontroll-*Wells*) mitgeführt wurden. Die Inkubation erfolgte für 2,5 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Fluoreszenz wurde unter Einsatz des Mikrotiterplatten-Lesegerätes Infinite® F200 und der Software i-control™ gemessen (Exzitation: 535 nm; Emission: 590 nm; 5 Blitze; Integrationszeit: 20 µs). Die Hintergrundfluoreszenz wurde mit Hilfe des *Blanks* abgezogen und die relative Vitalität der unbehandelten Kontrollzellen wurde auf 100 % bzw. 1,0 gesetzt.

2.2.6 Analyse der Zellzyklusverteilung

2.2.6.1 Durchflusszytometrische Analysen

Die Zellzyklusverteilung kann mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass der DNA-Gehalt von Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen spezifisch variiert. Der prozentuale Anteil der Zellen in der G_0/G_1 -Phase (einfacher DNA-Gehalt) sowie in der G_2/M -Phase (doppelter DNA-Gehalt) kann über Messung des DNA-Gehaltes ermittelt werden. Der DNA-Gehalt der in der S-Phase befindlichen Zellen variiert zwischen einfachem und doppeltem DNA-Gehalt. Apoptotische Zellen (SubG1-Population) zeigen einen geringeren DNA-Gehalt als Zellen in der G_0/G_1 -Phase, da intrazelluläre Degenerationsprozesse zu einem Abbau der DNA führen.

Nach erfolgter Behandlung wurden der Überstand und alle verwendeten Lösungen, die zum Waschen und Ablösen der Zellen verwendet wurden, gesammelt. So konnte gewährleistet werden, dass apoptotische Zellen, die sich bereits aus dem Zellverband gelöst haben, mit in die Zellzyklusanalyse eingeschlossen werden. Der Zellrasen wurde mit PBS gewaschen, die Zellen mit Trypsin/EDTA vom Boden gelöst, vereinzelt und anschließend durch Zentrifugation (300 x g; 5 min; 4 °C; reduzierte Bremse) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit PBS gewaschen (300 x g; 5 min; 4 °C; reduzierte Bremse) und nachfolgend in 100 µl PBS resuspendiert. Unter Vortexen wurden sodann 2 ml – 20 °C kaltes Ethanol hinzugefügt und die Zellen anschließend bis zur Analyse bei – 20 °C gelagert (mindestens 20 min). Folgend wurden die Zellen pelletiert (800 x g; 10 min; 4 °C; reduzierte Bremse), in RNase-haltigem PBS (1 µl RNase (1 mg/ml) + 132 µl PBS) inkubiert (1 h; RT) und mit dem in die DNA-interkalierenden fluoreszierten Farbstoff Propidiumjodid (PI) (367 µl; 50 µg PI/ml PBS) vermischt (15 min; RT). Das Durchflusszytometer BD Accuri™ C6 mit der gleichnamigen Software wurde zur Analyse der Zellzyklusverteilung genutzt. Es erfolgte die Quantifizierung der prozentualen Anteile der Zellen in der G_0/G_1 - und der G_2/M -Phase des Zellzyklus. Die SubG1-Fraktion repräsentiert die apoptotische Zellpopulation.

2.2.6.2 Immunzytochemische Bestimmung des Mitose-Index

Der Anteil der Zellen in Mitose als Indikator der Proliferationsaktivität wurde mit Hilfe des mitotischen Index analysiert. Hierbei wird die Zahl der Zellen ermittelt, die sich zu einem definierten Zeitpunkt in der Zellteilung/Mitose befinden. Bestimmt wird der

mitotische Index über die Detektion des an der Aminosäureposition Serin 10 phosphorylierten Histons 3 (pH3). Diese Phosphorylierung beginnt in der späten G₂-Phase des Zellzyklus und steigt bis kurz vor der Bildung der Prophase-Chromosomen an. Die Dephosphorylierung beginnt in der späten Anaphase und ist vor der Dekondensation der Chromosomen in der Telophase abgeschlossen (Hendzel *et al.*, 1997).

Für die immunzytochemische Analyse des mitotischen Index wurden die Zellen auf Deckgläsern ausgesät und nach der Behandlung mit 4 % Formaldehyd/PBS fixiert (15 min; RT). Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte unter Zugabe von eiskaltem Methanol (≥ 20 min; -20 °C). Unspezifische Antigenbindungsstellen wurden mit 5 % BSA in PBST blockiert (1 h; RT), sodass eine Inkubation mit dem pH3 (S10) spezifischen Antikörper in 5 % BSA in PBST (1:500; ü. N.; 4 °C) anschließen konnte. Nach der Inkubation wurden Reste des ungebundenen Primärantikörpers mittels PBS entfernt (2 x 5 min; RT). Zusätzlich wurde mit PBS *high salt* (3 min; RT), wie auch, nachfolgend mit PBST (5 min; RT) gewaschen, sodass danach die Inkubation mit dem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper in 5 % BSA in PBST unter Lichtausschluss erfolgen konnte (Alexa Fluor® 488; 1:500; 2 h; RT). Alle nachfolgenden Schritte wurden im Dunkeln ausgeführt. Die auf den Deckgläsern fixierten Zellen wurden mittels PBS (3 x 5 min; RT) und PBST (2 x Schwenken) gewaschen und anschließend in 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-haltigem Vectashield® eingedeckelt. Dieser Farbstoff interkaliert in die doppelsträngige DNA und ermöglicht die Detektion von Zellkernen. Die mikroskopische Analyse und Quantifizierung der pH3 (S10)-positiven Zellen erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Olympus BX43 und der zugehörigen Bildgebungssoftware CellSens Dimension. Pro experimentelle Bedingung wurden jeweils ≥ 50 Zellkerne ausgewertet.

2.2.7 Analyse von Zelltodmechanismen

2.2.7.1 ApoONE® Assay

Die Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7, welche eine wichtige Rolle bei der Exekution der Apoptose spielen, wurde mit dem ApoONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay nach Herstellerangaben analysiert. Die Aktivitätsmessung beruht auf der Spaltung des nicht-fluoreszierenden Substrats Rhodamin 110, bis-(N-CBZ-L-Aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-asparaginsäureamid) (Z-DEVD-Rhodamin 110) durch die Caspasen 3 und 7.

Die Menge des dadurch freigesetzten Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin 110 dient als Maß der Caspasenaktivität.

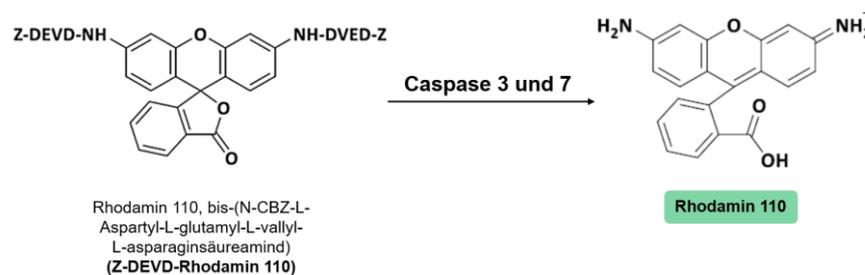


Abbildung 2.3: Prinzip des ApoONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assays.

Das nicht-fluoreszierende Substrat Rhodamin 110, bis-(N-CBZ-L-Aspartyl-L-glutamyl-L-vallyl-L-asparaginsäureamind) (Z-DEVD-Rhodamin 110) wird durch die Caspasen 3 und 7 gespalten, wodurch das fluoreszierende Rhodamin 110 freigesetzt wird. Die Intensität der so entstehenden Fluoreszenz dient als Maß der Caspasenaktivität. (Exzitation: 499 nm; Emissionsmaximum: 521 nm).

Die Aussaat der Zellen erfolgte in einer schwarzen 96-Well Platte. *Blanks* (mit Zellkulturmedium befüllte *Wells*) wurden mitgeführt. Es wurden 100 µl des ApoONE® Substrats zu 100 µl des Zellkulturmediums gegeben. Nach der Inkubation (1 h; RT) wurde die Fluoreszenz mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Lesegerätes Infinite® F200 und der Software i-control™ gemessen (Exzitation: 499 nm; Emission: 521 nm). Die Hintergrundfluoreszenz wurde unter Zuhilfenahme des *Blanks* abgezogen und die relative Caspasenaktivität auf die unbehandelten Kontrollzellen (= 1,0) normalisiert.

2.2.8 Analyse von DNA-Schäden und der DNA-Schadensantwort

2.2.8.1 Immunzytochemische Methoden

2.2.8.1.1 Gesamtfluoreszenzbasierte Analyse von DNA-Schäden und der DNA-Schadensantwort

Als Surrogatmarker für DNA-Schäden und die dadurch aktivierte DNA-Schadensantwort wurde die Phosphorylierung an der Aminosäure Serin 139 des Histons 2AX (γH2AX) mit Hilfe einer fluoreszenzbasierten Methode analysiert (Olive, 2004; Olive *et al.*, 2009; Schmid *et al.*, 2012). Für diese Analyse wurden die Zellen in eine schwarze 96-Well Platte mit klarem Boden ausgesät. Nach der Behandlung wurden die Zellen mit

4 % Formaldehyd/PBS fixiert (15 min; RT) und anschließend mit eiskaltem Methanol permeabilisiert (≥ 20 min; -20 °C). Unspezifische Antigenbindungsstellen wurden mit 5 % BSA in PBST abgesättigt (1 h; RT), worauf folgend die Zellen mit dem γ H2AX-spezifischen Antikörper in 5 % BSA in PBST inkubiert (1:500; ü. N.; 4 °C) wurden. Nachdem überschüssiger Primärantikörper mittels PBS entfernt (2 x 5 min; RT) und mit PBS *high salt* (3 min; RT) sowie PBST (5 min; RT) gewaschen worden ist, wurden die Zellen mit dem Fluorochrom (FITC)-gekoppelten Sekundärantikörper in 5 % BSA in PBST unter Lichtausschluss inkubiert (Alexa Fluor® 488; 1:1000; 2 h; RT). Alle nachfolgenden Schritte wurden im Dunkeln ausgeführt. Die fixierten Zellen wurden mittels PBS (3 x 5 min; RT) und PBST (2 x Schwenken) gewaschen und anschließend mit DAPI in PBS (1:1000; 5 min; RT) inkubiert. Die Analyse der Fluoreszenzintensität erfolgte mittels des Mikrotiterplatten-Lesegerätes Infinite® F200 und der Software i-control™ (Fluorochrom (FITC) (γ H2AX): Exzitation: 485 nm, Emission: 535 nm, 50 Blitze, Integrationszeit: 700 μ s; DAPI (Zellkerne): Exzitation: 360 nm, Emission: 465 nm, 50 Blitze, Integrationszeit: 500 μ s). Die Fluoreszenzintensität des γ H2AX Signals, normalisiert auf die Intensität der Zellkerne (DAPI), wurde quantifiziert und in der unbehandelten Kontrolle auf 1,0 gesetzt. Das Ergebnis wurde zur Sicherheit mittels fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen und der Quantifizierung des Fluoreszenzsignals mittels ImageJ Software überprüft. Der Ablauf dieser Analysen ist in Abbildung 2.4 zusammenfassend dargestellt.

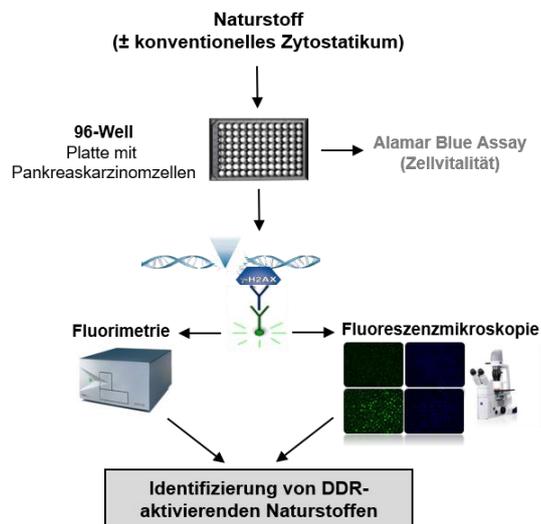


Abbildung 2.4: Gesamtfluoreszenzbasierte Analyse des γ H2AX Signals.

Um die Aktivierung der DNA-Schadensantwort zu ermitteln, wurde die Phosphorylierung an der Aminosäure Serin 139 des Histons 2AX (γ H2AX) mit Hilfe einer fluoreszenzbasierten Methode nach den verschiedenen Behandlungen quantitativ erfasst.

2.2.8.1.2 Ausbildung von nukleären γ H2AX-, 53BP1- und pATM-Foci

Zusätzlich wurde die Anzahl der gebildeten DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) untersucht. Die Analyse wurde mit Hilfe einer immunzytochemischen Färbung von γ H2AX, dem Surrogatmarker für DNA-Schaden, dem P53-bindenden Protein 1 (53BP1) und der an dem Serin 1981 autophosphoryliertem ATM (pATM) durchgeführt. Nach der Erkennung des Doppelstrangbruchs (DSB) durch den MRN-Komplex (Komplex aus MRE11 (*meiotic recombination 11*), RAD50 und NBS1 (Nibrin)) folgt die Rekrutierung der Proteinkinasen ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), ATR (*ataxia telangiectasia and RAD3 related*) und DNA-PKc (*protein kinase, catalytic subunit*). Dadurch findet eine Phosphorylierung des dem DSB am nächstgelegenen H2AX (γ H2AX-Focus) statt, welche mittels spezifischer Antikörperfärbung detektiert und quantifiziert werden kann. 53BP1-Foci stellen sowohl einen zusätzlichen Marker für DSBs als auch einen Marker für die Reparatur von DSBs über die Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) dar. Als Folge eines DSB wird das Protein aus dem Zytoplasma rekrutiert und bindet in der Nähe des DNA-Schadens an das Chromatin (Panier *et al.*, 2014; Zimmermann *et al.*, 2014). Darüber hinaus wurde die Anzahl der pATM-Foci bestimmt, welche ebenfalls als Maß für DSBs gelten. Nach der Bindung von ATM an den DSB, dissoziiert das zuvor inaktive Dimer in ein Monomer, wird autophosphoryliert und somit aktiviert (Bakkenist *et al.*, 2003). Sowohl die Anzahl der nukleären γ H2AX-Foci und der 53BP1-Foci als auch der pATM-Foci je Zellkern sind somit proportional zur Anzahl der zum Zeitpunkt der Analyse vorhandenen DSBs.

Für die immunzytochemische Analyse wurden die Zellen auf Deckgläsern ausgesät. Nach der gewünschten Behandlungsdauer wurden die Zellen mit 4 % Formaldehyd/PBS fixiert (15 min; RT) und anschließend mit eiskaltem Methanol permeabilisiert (≥ 20 min; -20 °C). Die darauffolgende Inkubation mit 5 % BSA in PBST (1 h; RT) diente der Absättigung unspezifischer Antigenbindungsstellen. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen mit γ H2AX (S139)-, 53BP1- bzw. pATM (S1981)-spezifischem Primärantikörper (1:500; ü. N.; 4 °C) inkubiert. Der ungebundene Primärantikörper wurde durch Waschen mit PBS (2 x 5 min), PBS *high salt* (3 min) und PBST (5 min) entfernt und die fixierten Zellen wurden mit Fluorochrom-gekoppeltem Sekundärantikörper in 5 % BSA in PBST unter Lichtausschluss inkubiert (Alexa Fluor® 488 oder 555; 1:1000; 2 h; RT). Alle nachfolgenden Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS (3 x 5 min) und zweifachem Schwenken in PBST wurden die auf den Deckgläsern befindlichen Zellen mit Hilfe von DAPI-haltigem Vectashield® eingedeckelt. Die mikroskopische Analyse erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Olympus BX43 und

der zugehörigen Bildgebungssoftware CellSens Dimension. Pro Bedingung wurden ≥ 50 Zellkerne hinsichtlich der Anzahl der vorhandenen nukleären Foci ausgewertet.

2.2.8.1.3 Analyse von S139 phosphoryliertem H2AX mittels Durchflusszytometrie

Zur Untersuchung der Fluoreszenzintensität von γ H2AX in den verschiedenen Zellzyklusphasen wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Wie zuvor beschrieben, wurden das verwendete Zellkulturmedium und die Zellen mit Hilfe von Zentrifugation (300 x g; 5 min; 4 °C; reduzierte Bremse) pelletiert und das Pellet in 200 μ l PBS resuspendiert. Danach wurden die Zellen mit eiskalter 1 %iger Formaldehydlösung in PBS auf Eis inkubiert (15 min), erneut pelletiert und mit eiskaltem 80 %igem Ethanol fixiert (≥ 2 h; -20 °C). Das Ethanol wurde durch Zentrifugation entfernt und das Pellet in 1 % BSA in PBST inkubiert (5 min; RT), um unspezifische Antigenbindungen zu blockieren. Anschließend wurden die Zellen mit dem γ H2AX-spezifischen Antikörper ebenfalls in 1 % BSA in PBST inkubiert (1:100; ü. N.; 4 °C). Der ungebundene Primärantikörper wurde durch Zentrifugation entfernt, sodass die Zellen mit Fluorochrom (FITC)-gekoppeltem Sekundärantikörper in 1 % BSA in PBST unter Lichtausschluss inkubiert werden konnten (Alexa Fluor® 488; 1:200; 1 h; RT). Nach dem Waschen mit 1 % BSA in PBST (2 min; RT) wurde das Pellet in 500 μ l PI-Lösung (100 μ g/ml DNase-freier RNase A + 10 μ g/ml PI in PBS) resuspendiert (1 h; RT). Zur Analyse der Phosphorylierung des H2AX in Abhängigkeit der Zellzyklusphasen wurde das Durchflusszytometer BD Accuri™ C6 mit der gleichnamigen Software genutzt. Um die Stärke der Phosphorylierung des H2AX der jeweiligen Zellzyklusphase zuzuordnen, wird die Intensität des γ H2AX-Fluoreszenzsignals auf den DNA-Gehalt bezogen.

2.2.8.2 Comet-Assay

Zusätzlich wurden DNA-Strangbrüche, d.h. Einzel- (*single-strand breaks*; SSBs) und Doppelstrangbrüche (*double strand breaks*; DSBs) sowie Alkali-labile Stellen mit Hilfe des alkalischen Comet-Assays auf Einzelzellebene detektiert (Olive *et al.*, 2006). Durch die Verwendung eines stark alkalischen Puffers werden alkalilabile Apurin- oder Apyrimidin-Stellen zu DNA-SSBs hydrolysiert. Diese können somit zusätzlich zu den bereits vorhandenen SSBs in der Einzelzellelektrophorese detektiert werden. DNA-Fragmente wandern in dem elektrischen Feld schneller als intakte DNA und bilden den Schweif der namensgebenden Kometen-ähnlichen Struktur. Über den Anteil der in dem

Schweif befindlichen DNA relativ zu der im Kern befindlichen DNA kann indirekt die Menge der DNA-Strangbrüche bestimmt werden.

Für den Comet-Assay werden die behandelten Zellen mit Hilfe von Trypsin/EDTA vereinzelt und auf zuvor mit Agarose beschichtete Objektträger übertragen. Dazu wurden die Zellen mit 37 °C vorgewärmter *low melting point* Agarose (0,5 %) versetzt, auf die Objektträger übertragen und anschließend bei – 20 °C gelagert (5 min). Es folgte eine Inkubation im Lysepuffer (1 h; 4 °C). Die Objektträger wurden anschließend in die Elektrophoresekammer überführt und mit dem Elektrophoresepuffer überschichtet, der zu einer Alkalidenaturierung der DNA führt (25 min; 4 °C). Nach anschließender Elektrophorese (25 min; 25 V; 300 mA; 4 °C) wurden die Proben mit Neutralisationspuffer (3 x 5 min; RT) neutralisiert, mit 80 % Ethanol fixiert (5 min; RT) und getrocknet (ü. N.; RT). Nach Anwendung des Fluoreszenzfarbstoffes PI (50 µg/ml PBS) wurde die DNA mikroskopisch sichtbar und der relative Anteil der DNA im Schweif im Vergleich zum Kern konnte mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiolab und der TriTek Comet Score™ Software Version 1.5 ausgewertet werden.

2.2.9 Analyse der Zytostatikaaufnahme

2.2.9.1 Nachweis von Cisplatin-DNA-Intrastrangverknüpfungen

Mit Hilfe des *Southwestern Blots* wurde die Menge der Cis-(GpG)-Intrastrangverknüpfungen als Maß für die Aufnahme von Cisplatin in die Zelle analysiert. Der DNA-Addukt-spezifische Antikörper ermöglicht eine immunologische Detektion der Cis-(1,2-GpG)-Intrastrangverknüpfungen (Liedert *et al.*, 2006).

Von der genomischen DNA (Abschnitt 2.2.3.1) wurde 1 µg in 100 µl TE-Puffer verdünnt und durch Erhitzen (10 min; 95 °C) denaturiert. Nach dem Abkühlen wurden 100 µl eiskaltes Ammoniumacetat (2 M) hinzugegeben. Bevor eine Nitrozellulosemembran in die Slot-Blot Apparatur eingelegt wurde, wurde diese in Ammoniumacetat (1 M) äquilibriert. Die DNA wurde in die Aussparungen der Apparatur pipettiert und mit Hilfe einer Vakuumpumpe auf die eingelegte Membran übertragen. Anschließend wurde die Membran mit Ammoniumacetat (1 M) und Wasser gewaschen und in 5 x SSC inkubiert (5 min; RT). Die DNA wurde durch Erhitzen auf der Membran fixiert (2 h; 80 °C). Nach Abkühlen der Membran wurden unspezifische Antigenbindungsstellen mit 5 %iger Magermilchpulverlösung in TBST abgesättigt (1 h; RT) und anschließend mit dem Primärantikörper (1:5000; ü. N.; 4 °C) gegen Cis-(1,2-GpG)-Intrastrangverknüpfungen

inkubiert. Ungebundener Primärantikörper wurde durch mehrmaliges Waschen mit TBST (3 x 5 min; RT) entfernt und darauffolgend mit dem Peroxidase-gekoppelten anti-Ratte-IgG Sekundärantikörper in 5 %iger Magermilchpulverlösung in TBST inkubiert (1:5000; 2 h; RT). Die Membran wurde nach erneutem mehrmaligem Waschen mit TBST (3 x 5 min; RT) mit einer ECL-Lösung inkubiert (1 min; RT). Die gleichmäßige Beladung der Membran mit der genomischen DNA wurde mit Hilfe einer Methylenblaufärbung (5 min; RT) überprüft. Die Intensität der Signale wurde mittels *Chemidoc Image* visualisiert und durch die Image Lab™ Software Version 6.0.1 quantifiziert.

2.2.9.2 Analyse der intrazellulären Doxorubicin-Konzentration

Kennzeichnend für das Anthrazyklinderivat Doxorubicin (Doxo) ist die inhärente fluoreszente, rote Farbe. Diese Eigenschaft ermöglicht die Detektion der intrazellulären Doxorubicin-Konzentration mit Hilfe der Durchflusszytometrie.

Für die Bestimmung der Aufnahme und des Effluxes von Doxorubicin wurden die Zellen unmittelbar nach der Behandlung (Doxo bzw. Naturstoff oder Naturstoff+Doxo), zur Bestimmung der Aufnahme, oder 4 h nach einem Medienwechsel, zur Bestimmung des Effluxes, analysiert. Die Zellen wurden vom Boden trypsiniert (10 min; 37 °C). Durch die Zentrifugation (300 x g; 5 min; 4 °C; reduzierte Bremse) wurden die Zellen pelletiert und anschließend mit 5 ml PBS gewaschen. Nach diesem Waschschrift wurden die Zellen abzentrifugiert (300 x g; 5 min; 4 °C; reduzierte Bremse) und in 500 µl PBS aufgenommen. Die Fluoreszenzintensität von Doxo in den Zellen der Zellsuspension wurde mit dem Durchflusszytometer BD Accuri™ C6 und der gleichnamigen Software analysiert. Dabei dient die gemessene Gesamtfluoreszenz (Exzitation: 499 nm; Emission: 521 nm) als Maß für die Menge an intrazellulärem Doxo.

2.2.10 TEAC Assay

Das antioxidative Potenzial der Naturstoffe wurde über den zellfreien *Trolox Equivalent Antioxidative Capacity* (TEAC)-Assay bestimmt (Miller *et al.*, 1993; Strube *et al.*, 1997; Re *et al.*, 1999). Diese Methode beruht auf der Reaktion von Diammonium-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonat (ABTS) mit den zu untersuchenden „Antioxidantien“. In einem oxidativen Milieu bildet ABTS ein stabiles, grünes Radikalkation, welches in der Kombination mit antioxidativen Substanzen seine Farbe verliert. Bei der Messung dient Trolox, Vitamin-E-Derivat, als antioxidative Referenzsubstanz. Die antioxidative Kapazität wird anhand des Vergleiches der Minderung der Extinktion durch verschiedene Konzentrationen von Trolox mit der zu untersuchenden Testsubstanz

ermittelt, weshalb das Ergebnis als Trolox-Äquivalent angegeben (TEAC-Wert) wird. Für diese Analyse wurde zunächst eine Arbeitslösung aus ABTS und APS erstellt (1:1, ü. N., 4 °C). Diese wurde mit 80 %igem Ethanol verdünnt, sodass bei einer photometrischen Messung bei einer Wellenlänge von 734 nm eine Absorption von 1,4 gemessen wird. Die zu testenden Substanzen und die Referenzsubstanz Trolox wurden ebenfalls mit 80 %igem Ethanol auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt (0; 0,5; 1; 1,5; 3 und 5 µM). 2 min nach Zugabe der verdünnten Arbeitslösung zu der Substanzlösung wurde die Abnahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 734 nm gemessen. Das Ergebnis der Absorptionsmessung wird der Konzentration des Naturstoffes bzw. der Referenzsubstanz zugeordnet. Der TEAC-Wert ergibt sich aus dem Verhältnis der Steigung der ausgelösten Veränderung der Absorption durch die Testsubstanz und der Steigung der ausgelösten Veränderung der Absorption durch die Referenzsubstanz Trolox.

2.2.11 Isolierung und Kultivierung primärer Rattenhepatozyten

Primäre metabolisch kompetente Rattenhepatozyten wurden mittels Perfusion der Leber isoliert. Zur Rattenleberperfusion wurden ausschließlich männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 150 und 200 g verwendet. Die Tiererhaltung erfolgte in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT), Düsseldorf in Rattenkäfigen unter künstlichen Tag-Nacht-Lichtverhältnissen. Die Tiere hatten zu jeder Zeit Zugang zu Trinkwasser und Trockenfutter. Als Grundlage für die Perfusion diente die zweistufige *in situ* Perfusionstechnik nach Seglen (Seglen, 1976). Zur Vorbereitung auf die Perfusion wurde das Präparationsbesteck autoklaviert, die Perfusionsmedien sterilfiltriert und auf 42 °C erwärmt. Das Tier wurde mittels Ketamin/Xylazin-Injektionsnarkose (100 mg/kg KG bzw. 5 mg/kg KG) narkotisiert. Zuerst wurde die Bauchdecke des Tieres eröffnet und die Leber und ihre Gefäßsysteme freigelegt. Es wurde eine leichte Ligatur um die Pfortader des Tieres gelegt. Anschließend wurde 100 µl Heparin-Lösung in die untere Hohlvene injiziert, um eine vorzeitige Blutgerinnung zu verhindern. Eine Braunüle wurde in die Pfortader eingeführt, sodass die Perfusionsmedien durch die Rattenleber geleitet werden können. Unmittelbar nach dem Einstechen wurde die Ligatur um die Pfortader festgezogen und die untere Hohlvene durchtrennt, sodass das Blut und das Perfusat abfließen konnten. Der erste Perfusionsschritt diente der vollständigen Entblutung der Leber. Hierzu wurde ein EGTA-haltiger Puffer (PP1) verwendet, der durch den Ca²⁺-Entzug zu einem Lösen der Desmosomen aus ihrem Zellverband führt. Bei dem zweiten Perfusionsschritt wurde der Puffer mit Collagenase (PP2) versetzt. Dieses Perfusionsmedium bewirkt eine vollständige Vereinzelung der Zellen des Leberparenchyms, welches überwiegend aus

Hepatozyten besteht. Bei Feststellung einer makroskopisch sichtbaren, netzartigen Oberflächenstruktur der Leber konnte diese heraus präpariert und in den Waschpuffer überführt werden. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Hepatozyten aus der Leber herausgeschwemmt und über Zellsiebe (200 μ M bzw. 100 μ M) filtriert. Die entstandene Zellsuspension wurde auf vier Mehrzweckröhrchen (50 ml) verteilt und anschließend zur Abtrennung der Zellrümmen zentrifugiert (3 min; 300 rpm; RT). Nach mehrmaligem Waschen mit dem Waschpuffer wurden die Pellets in 16 ml Waschpuffer vereinigt, mit 32 ml einer Percoll-Lösung versetzt und anschließend zentrifugiert (5 min; 2100 rpm; RT). Das daraus resultierende Pellet wurde in 20 ml Williams E-Medium, versetzt mit *Hepatocyte Cocktail*, 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin, resuspendiert und für folgende Zelleexperimente in verschiedene Plattenformate, welche zuvor kollageniert (7 μ g/cm²) wurden, ausgesät. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und einer Atmosphäre von 5 % CO₂. Die Hepatozyten wurden 24 h nach der Aussaat behandelt.

2.2.12 Kombinationsindex

Um zu überprüfen, ob eine Kombinationsbehandlung aus einem Naturstoff und einem Zytostatikum synergistische oder additive Zytotoxizität bewirkt, wurde der Kombinationsindex (KI) bestimmt. Dieser ermöglicht eine Aussage über die Stärke der Wirkung von Kombinationsbehandlungen. Ein KI < 1 ist indikativ für einen synergistischen Effekt, ein KI = 1 einen additiven Effekt, während ein KI > 1 auf einen antagonistischen Effekt schließen lässt. Der KI wurde mit Hilfe der CompuSyn Software ermittelt (Chou, 2010). Die Bestimmung des KI erfolgte bei Vitalitätsbestimmungen mittels des Alamar Blue[®]-Assays.

2.2.13 Statistische Analysen

Falls in den Legenden nicht anders dargestellt, wurden die erhobenen Daten als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM) dargestellt. Die Überprüfung auf statistische Signifikanz erfolgte, je nach Anzahl der zu vergleichenden Gruppen, mit Hilfe des zweiseitigen, ungepaarten t-Tests nach Student (Student, 1908) oder der *One-way Analysis of Variance* (ANOVA) mit *Dunnett's* Korrektur für multiple Vergleiche. Als statistisch signifikant wurde eine Zufallswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % angenommen ($p \leq 0,05$), welche mit „*“ (t-Test) oder „#“ (ANOVA) versehen wurden.

3 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Naturstoffen, die Mechanismen der DNA-Schadensantwort (DDR) modulieren. Dabei wurden nicht nur Naturstoffe berücksichtigt, die per se einen Einfluss auf die DDR zeigen, sondern auch Naturstoffe, die die durch konventionelle Tumortheraeutika-induzierte DDR beeinflussen. In dieser Arbeit wurden die konventionellen Tumortheraeutika Cisplatin (Cis) als Beispiel eines synthetischen Zytostatikums und Doxorubicin (Doxo) als Vertreter der aus Bakterien isolierten Anthrazykline verwendet. Auch die vielfältigen durch Zytostatika-induzierbaren DNA-Schäden sollten dadurch abgebildet werden. Als *in vitro*-Modell wurden die Pankreaskarzinomzellen BxPC3 und SU.86.86 eingesetzt. Pankreaskarzinome sind für ihre hohe Behandlungsresistenzen und der damit einhergehenden schlechten Prognose dieser malignen Erkrankung bekannt. Dies ist u. a. durch die Mutation im Tumorsuppressorgen P53 begründet, die in beiden Zelllinien vorkommt. Zudem unterscheiden sich die ausgewählten Zelllinien in ihrem Onkogen-Status. BxPC3 besitzt ein wildtypisches *KRAS*, wohingegen SU.86.86 eine aktivierende Mutation in diesem Gen aufweist, d. h. onkogenes *KRAS* (Abbildung 8.1 des Anhangs).

3.1 Charakterisierung der zytotoxischen Aktivität der Naturstoffe

Um die Sensitivität der Pankreaskarzinomzellen BxPC3 und SU.86.86 gegenüber den 296 Naturstoffen aus der Naturstoffdatenbank zu untersuchen, wurde zunächst die Vitalität nach einer Dauerbehandlung von 72 h über einen Konzentrationsbereich von 0,1 bis 100 μM mit Hilfe des Alamar Blue[®]-Assays, der die metabolische Aktivität der Zellen aufzeigt, untersucht. Aus den resultierenden Dosis-Wirkungskurven geht hervor, dass ca. 50 % der getesteten Naturstoffe unter den gegebenen Bedingungen keinen Einfluss auf die Vitalität der beiden Pankreaskarzinomzellen zeigen. Die Mehrheit der Naturstoffe wies eine IC_{50} (*inhibitory concentration 50 %*) zwischen 0,01 μM und 50 μM auf (Abbildung 3.1 (A)).

Für drei ausgewählte Naturstoffe (*Secalonic acid F* (SA); *5-epi-Nakijiquinone Q* (NQ) und *5-epi-Illimaquinone* (IQ)) sind die Dosis-Wirkungskurven exemplarisch dargestellt und ermöglichen die Bestimmung der jeweiligen IC_{50} . Diese liegt für SA bei 3 μM , für NQ bei 2 bzw. 5 μM und für IQ bei 1,5 und 8 μM für BxPC3- bzw. SU.86.86-Zellen (Abbildung 3.1 (B)). Weiterführende Experimente wurden nur mit denjenigen Naturstoffen durchgeführt, bei denen eine IC_{50} im getesteten Dosisbereich bestimmt werden konnte, sodass eine

biologische Aktivität gewährleistet ist. Darüber hinaus wurde die IC_{50} der beiden verwendeten Zytostatika, Cisplatin (Cis) und Doxorubicin (Doxo) ermittelt. Aus den Dosis-Wirkungskurven ergibt sich, dass beide Zelllinien gleichermaßen sensitiv gegenüber Doxo sind (IC_{50} : 0,3 μ M), jedoch BxPC3-Zellen im Vergleich zu SU.86.86-Zellen sensitiver gegenüber Cis sind (IC_{50} : 2,5 μ M für BxPC3 und 5 μ M für SU.86.86) (Abbildung 8.2 des Anhangs).

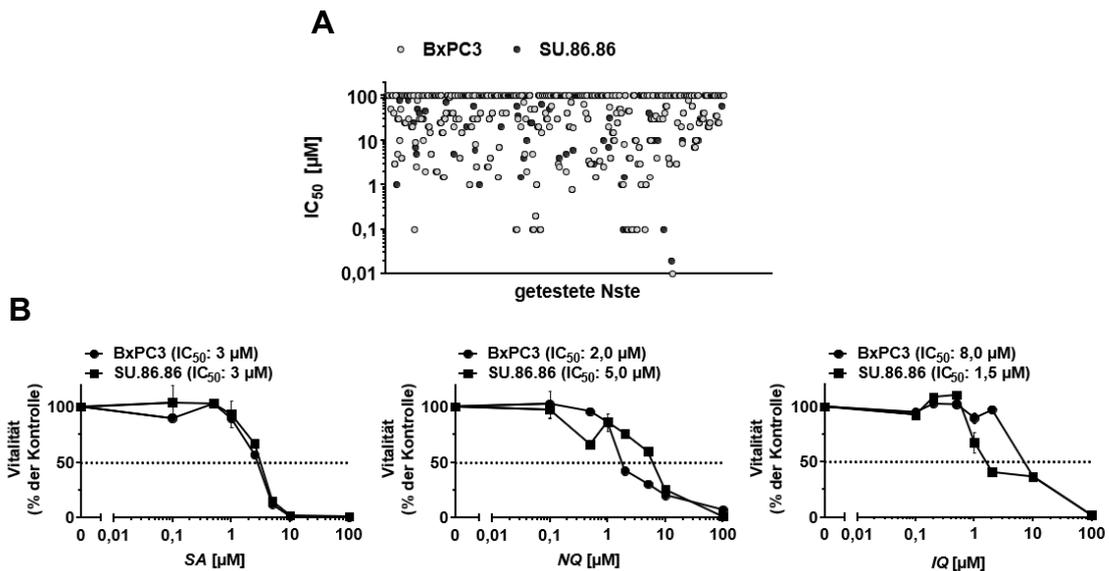


Abbildung 3.1: Effekte der Naturstoffe auf die Zellvitalität von Pankreaskarzinomzellen.

Pankreaskarzinomzellen (BxPC3 und SU.86.86) wurden für die Bestimmung des jeweiligen IC_{50} -Wertes nach 72 h Behandlung mit Konzentrationen zwischen 0,1 μ M und 100 μ M des jeweiligen Naturstoffes behandelt. Die Zugabe des Naturstoffes erfolgte 24 h nach Aussaat. Die metabolische Aktivität der Zellen, die als Maß für die Vitalität dient, wurde mit dem Alamar Blue®-Assay bestimmt. A: Die ermittelten IC_{50} wurden mit Hilfe einer Punktauftragung dargestellt. Jeder Punkt entspricht hierbei der IC_{50} eines bestimmten Naturstoffes (Nste) in einer der beiden Zelllinien (grau: BxPC3; schwarz: SU.86.86). B: Repräsentative Dosis-Wirkungskurven von drei ausgewählten Naturstoffen (*Secalonic acid F* (SA); *5-epi-Nakijiquinone Q* (NQ) und *5-epi-Illimaquinone* (IQ)). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent der unbehandelten Kontrolle (= 100 %) (n=3; N=4). Die dieser Abbildung zugrunde liegenden Daten (A und B) sind Tabelle 8.1 und Tabelle 8.2 des Anhangs zu entnehmen.

3.2 Einfluss der Naturstoffe auf den DNA-Schaden und die DNA-Schadensantwort in der Mono- und Kombinationstherapie

Die DDR ist eine Reaktion der Zellen auf durch unterschiedliche Noxen verursachte DNA-Schäden. Diese lösen eine Kaskade von Ereignissen aus, die die DNA-Reparatur, den Zellzyklusarrest, der mehr Zeit für eine gezielte DNA-Reparatur gewährt, oder den programmierten Zelltod (Apoptose) nach sich zieht. Mitglieder der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)-Superfamilie stellen die Schlüsselenzymen der DDR dar (Shiloh, 2001; Yang *et al.*, 2003; Harper *et al.*, 2007). Hierzu gehören die Serin/Threonin-Proteinkinasen ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3 related*) sowie auch die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs).

3.2.1 Analyse von S139 phosphoryliertem H2AX als Surrogatmarker für DNA-Schäden und der DNA-Schadensantwort

Während der DDR wird das Histon 2AX (*H2A histone family, member X*) durch diese Proteinkinasen an seinem Serin 139 phosphoryliert (γ H2AX) und dient als Surrogatmarker für DNA-Schäden und DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) (Olive, 2004; Kinner *et al.*, 2008; Valdiglesias *et al.*, 2013). Zur Klärung, ob die aus unterschiedlichen Organismen isolierten Naturstoffe aus der Naturstoffdatenbank die DDR allein oder in Kombination mit Cis oder Doxo beeinflussen, erfolgte die Etablierung eines immunzytochemischen Screening-Verfahrens, das den Anstieg oder die Abnahme der Phosphorylierung von γ H2AX über ein Gesamtfluoreszenzsignal als Marker für DNA-Schäden detektiert. Dazu wurden die Zellen mit Naturstoff-Konzentrationen im Bereich der jeweiligen IC₅₀ behandelt. Eine Behandlung mit 5 μ M Cis bzw. 0,3 μ M Doxo führte zu einer halb-maximalen Schadensantwort. Diese Konzentrationen ergaben sich aus einem Vorversuch und ermöglichen eine Detektion der Modulation der DDR (Abbildung 8.3 des Anhangs).

Die Resultate der Analysen zeigen, dass 13 der insgesamt 296 Naturstoffe in Monobehandlung dazu in der Lage sind, die Menge an γ H2AX um mindestens 30 % in BxPC3 zu steigern (Abbildung 3.2 (A)). In SU.86.86 sind es 16 Naturstoffe, die wirksam sind (Abbildung 3.2 (G)). Zu den potentesten Naturstoffen in beiden Zelllinien zählen *Secalonic acid F* (SA), *5-epi-Nakijiquinone Q* (NQ) und *5-epi-Illimaquinone* (IQ). In BxPC3-Zellen zeigen zusätzlich *Kahalalide F* und (*S*)-*cis-Resorcylicide* einen starken Anstieg in der Fluoreszenzintensität. Einen spezifischen Anstieg nur in SU.86.86-Zellen

ist bei den Naturstoffen *Tylophorinine* (TP), *Beauvercin J* (BJ) und *Coniellin A* (CA) zu detektieren. In der Kombination mit Cis steigern acht (Abbildung 3.2 B) bzw. 19 Naturstoffe (Abbildung 3.2 (H)) die induzierte DDR um $\geq 30\%$, wohingegen bei 58 (Abbildung 3.2 B) bzw. 50 Naturstoffen (Abbildung 3.2 (H)) eine $\geq 20\%$ ige Abnahme des γ H2AX-Signals detektiert wurde. Die Ergebnisse der Doxo-Kombinationsbehandlungen zeigen, dass in BxPC3-Zellen die Doxo stimulierte DDR durch 13 Naturstoffe weiter gesteigert und durch 57 Naturstoffe gemindert wird (Abbildung 3.2 (C)). Eine Potenzierung der durch Doxo stimulierte Fluoreszenzintensität von γ H2AX in SU.86.86-Zellen findet durch 45 Naturstoffe, eine Reduzierung durch 38 Naturstoffe statt (Abbildung 3.2 (J)). In mehr als 50 % der Fälle ist die durch die Naturstoffe hervorgerufene Modulation der stimulierten DDR für beide Zytostatika gleich. Eine zusammenfassende Tabelle ist dem Anhang zu entnehmen (Tabelle 8.3).

SA, NQ und IQ gehören zu den potentesten Naturstoffen (Abbildung 3.2 (D-F, K-L)). In dieser Screening-Methode konnte in den verwendeten Zelllinien für diese Naturstoffe ein Anstieg in der γ H2AX-Fluoreszenzintensität nach Monotherapie sowie ein potenzierender Effekt nach der Behandlung mit Cis oder Doxo detektiert werden. Basierend auf den Ergebnissen des Screenings wurde ein Naturstoffset aus zehn Naturstoffen ausgewählt, die sowohl die DDR per se als auch in Kombination mit Cis und/oder Doxo beeinflussen, aber auch eine Substanz, die in diesen Versuchen keinen Einfluss auf die DDR zeigt. Eine Auflistung dieser Substanzen zeigt Tabelle 3.1.

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob in verschiedenen Phasen des Zellzyklus befindliche Zellen durch die Behandlung mit den Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cis oder Doxo gleich oder unterschiedlich stark geschädigt werden. Durchflusszytometrische Analysen erlauben die Bestimmung der Stärke des γ H2AX-Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit des DNA-Gehaltes, sodass untersucht werden kann, ob DNA-Schäden nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus auftreten. In dem FACS-basierten Assay wurde der Einfluss von SA, NQ und IQ auf die DNA-Schäden in Abhängigkeit der Zellzyklusphasen untersucht. Es zeigt sich, dass das Auftreten des DNA-Schadens in den verschiedenen Phasen durch die Naturstoffe nicht beeinflusst wird (Abbildung 8.4 und Abbildung 8.5 des Anhangs) und somit keine Zellzyklus-spezifischen DNA-schädigenden Effekte der Naturstoffe zu verzeichnen sind. Ebenfalls lassen die Ergebnisse vermuten, dass auch in der Kombinationsbehandlung die DNA-schädigende Wirkung der Chemotherapeutika durch die Naturstoffe nicht modifiziert wird.

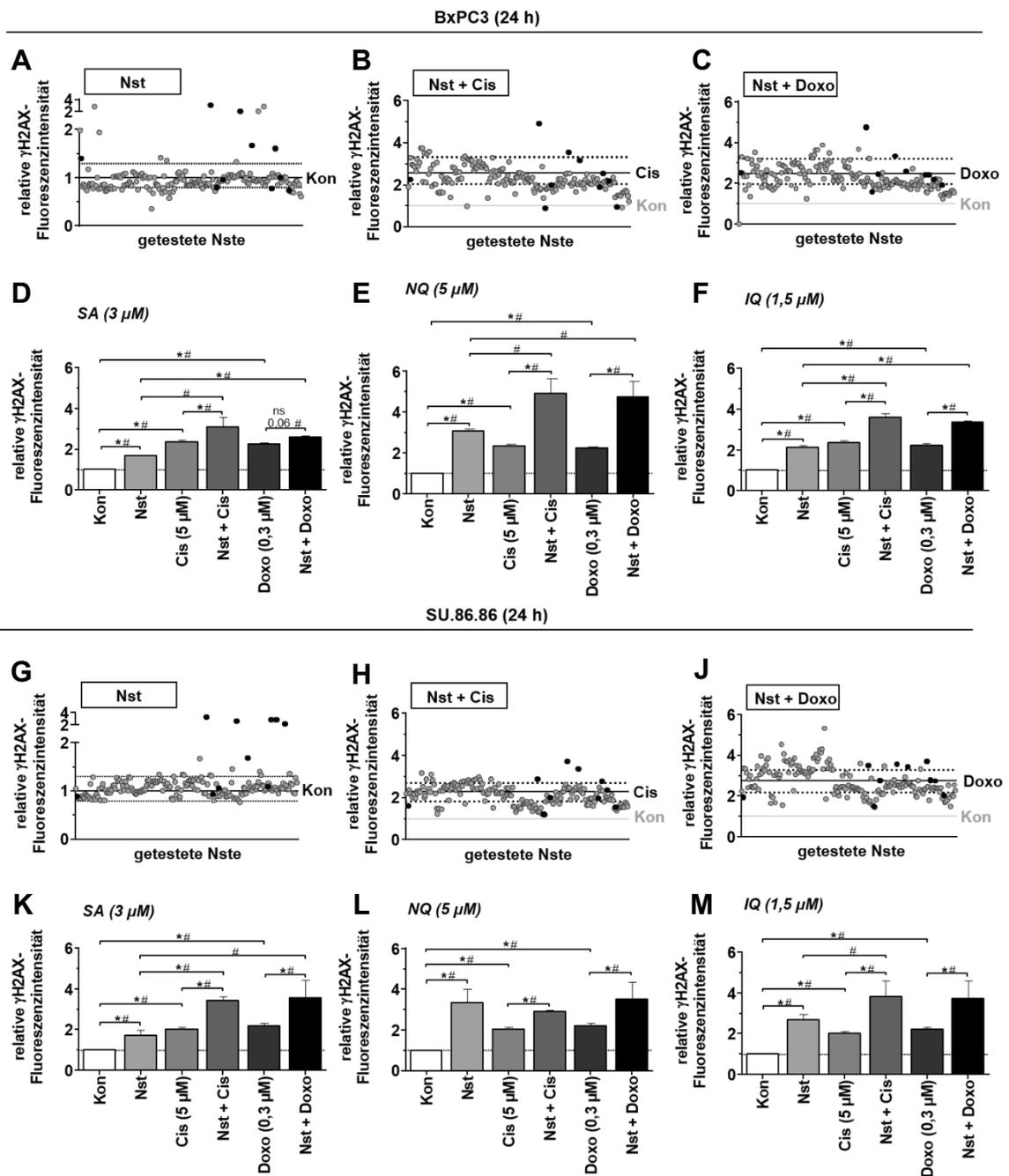


Abbildung 3.2: Einfluss der Naturstoffe auf die Gesamtfluoreszenz von γ H2AX in Mono- und Kombinationsbehandlung.

Um den Aktivitätsstatus der DNA-Schadensantwort (DDR) zu ermitteln, wurden BxPC3- und SU.86.86 Zellen für 24 h mit subtoxischen Konzentrationen der Naturstoffe (Nste) ($IC_{50} < 100 \mu M$) allein oder in Kombination mit $5 \mu M$ Cisplatin (Cis) oder $0,3 \mu M$ Doxorubicin (Doxo) behandelt. Anschließend wurde die Modulation der Phosphorylierung von γ H2AX (*H2A histone family, member X* an Serin 139 phosphoryliert) über das Gesamtfluoreszenzsignal als Marker für DNA-Schäden detektiert. A-C, G-J: Die Punktauftragung zeigt den Effekt der getesteten Naturstoffe auf das Gesamtfluoreszenzsignal von γ H2AX allein (A, G) oder in Kombination mit Cis (B, H) bzw. Doxo (C, J). Jeder Punkt entspricht hierbei dem Ergebnis eines bestimmten Naturstoffes in BxPC3-Zellen (A-C) bzw. SU.86.86-Zellen (G-J). Dargestellt sind Mittelwerte als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle (= 1,0) ($n = 2$; $N = 4$). Die Linien markieren die Abnahme der Stärke des Fluoreszenzsignales um $\geq 20\%$ im Vergleich zur Kontrolle bzw. zu Cis/Doxo oder eine Zunahme von $\geq 30\%$ im Vergleich zur Kontrolle bzw. Cis/Doxo. Die für weitere Experimente verwendeten Naturstoffe sind schwarz markiert. D-F, K-M: Repräsentative Ergebnisse von drei ausgewählten Naturstoffen (SA, NQ, IQ). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle (= 1,0) ($n = 3$; $N = 4$). Student's *t*-Test * $p \leq 0,05$; One-way ANOVA # $p \leq 0,05$. IQ: 5-epi-*l*lomaquinone, Kon: Kontrolle; NQ: 5-epi-Nakijiquinone Q; SA: Secalonic acid F. Die dieser Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.3 des Anhangs zu entnehmen.

Tabelle 3.1: Einfluss von zehn ausgewählten Naturstoffen auf die Gesamtfluoreszenz von γ H2AX.

Um den Aktivitätsstatus der DNA-Schadensantwort (DDR) zu ermitteln, wurden BxPC3- und SU.86.86 Zellen für 24 h mit subtoxischen Konzentrationen der Naturstoffe (Nst) ($IC_{50} < 100 \mu\text{M}$) allein (basal) oder in Kombination mit $5 \mu\text{M}$ Cisplatin (Cis) oder $0,3 \mu\text{M}$ Doxorubicin (Doxo) behandelt. Anschließend wurde die Modulation der Phosphorylierung von γ H2AX (*H2A histone family, member X* an Serin 139 phosphoryliert) über das Gesamtfluoreszenzsignal als Marker für DNA-Schäden detektiert. Aufgelistet sind zehn der vielversprechendsten Naturstoffe, die sowohl die DDR per se als auch in Kombination mit Cis und/oder Doxo beeinflussen, aber auch eine Substanz, die in diesem Versuch keinen Einfluss auf die DDR zeigte. Ebenso ist der Effekt der verwendeten Zytostatika in beiden Zelllinien aufgezeigt. Grün markierte Werte zeigen eine Abnahme um $\geq 20\%$ im Vergleich zur Kontrolle bzw. zu Cis oder Doxo, rot markierte Werte zeigen eine Zunahme von $\geq 30\%$ im Vergleich zur Kontrolle bzw. Cis oder Doxo. Dargestellt sind Mittelwerte für BxPC3- und SU.86.86-Zellen als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle (= 1,0).

Nst	BxPC3 (24 h)			SU.86.86 (24 h)		
	basal	+Cis	+Doxo	basal	+Cis	+Doxo
Kontrolle (Kon)	1,00	2,56	2,47	1,00	2,29	2,74
<i>5-epi-Illimaquinone</i> (IQ)	2,13	3,57	3,34	2,63	3,72	3,58
<i>5-epi-Nakijiquinone Q</i> (NQ)	3,08	4,92	4,75	3,33	2,89	3,51
<i>Beauvericin</i> (BV)	0,97	2,01	2,47	1,06	2,02	2,75
<i>Beauvericin J</i> (BJ)	0,74	0,95	1,92	2,19	1,56	2,01
<i>Coniellin A</i> (CA)	1,00	2,20	2,19	2,83	2,38	2,75
<i>Fusarielin J</i> (FJ)	0,79	1,91	2,42	1,09	1,99	3,71
<i>Hexaprenylhydroquinone</i> (HQ)	1,41	2,26	2,54	0,89	1,61	1,94
<i>Secalonic acid F</i> (SA)	1,67	3,17	2,61	1,69	3,38	3,44
<i>Tylophorinine</i> (TP)	1,61	2,54	2,42	2,89	2,78	2,78
<i>Viriditoxin</i> (VT)	0,80	0,90	1,60	0,93	1,21	1,49

Die Aktivierung von H2AX wurde ebenfalls mittels der Western Blot-Analyse nach 24-stündiger Behandlung für die Naturstoffe des Naturstoffsets allein und in Kombination mit Cis bzw. Doxo in SU.86.86-Zellen untersucht (Abbildung 8.6 des Anhangs). Hierbei zeigt sich, dass unter anderem CA, VT und TP in der Lage sind, die durch Cis- oder Doxo-induzierte DDR zu modulieren. Zu den auffälligsten und stärkere Modulationen hervorrufenden Naturstoffen zählen auch hier SA, NQ und IQ, die zusätzlich in BxPC3-Zellen untersucht wurden (Abbildung 3.3). Die Ergebnisse deuten an, dass eine Monobehandlung mit SA, NQ oder IQ in beiden getesteten Pankreaskarzinomzelllinien zu einem Anstieg der Proteinmenge von γ H2AX führt. Die Resultate der Western Blot-Analyse weisen für Cis eine Aktivierung von H2AX in BxPC3- und SU.86.86-Zellen auf. In der Kombination mit Cis wird das γ H2AX-Fluoreszenzsignal durch SA und NQ in beiden Zelllinien potenziert. Auch für Doxo zeigt sich eine Phosphorylierung des H2AX, die durch die drei zuvor auffälligsten Naturstoffe gesteigert wird. Dies spiegelt für SA und NQ das Ergebnis des Screenings wider (Abbildung 3.2 (D-E und K-L)). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die ausgewählten Naturstoffe in der Lage sind, die DDR zu aktivieren und nach Zytostatika-Behandlung zu modulieren.

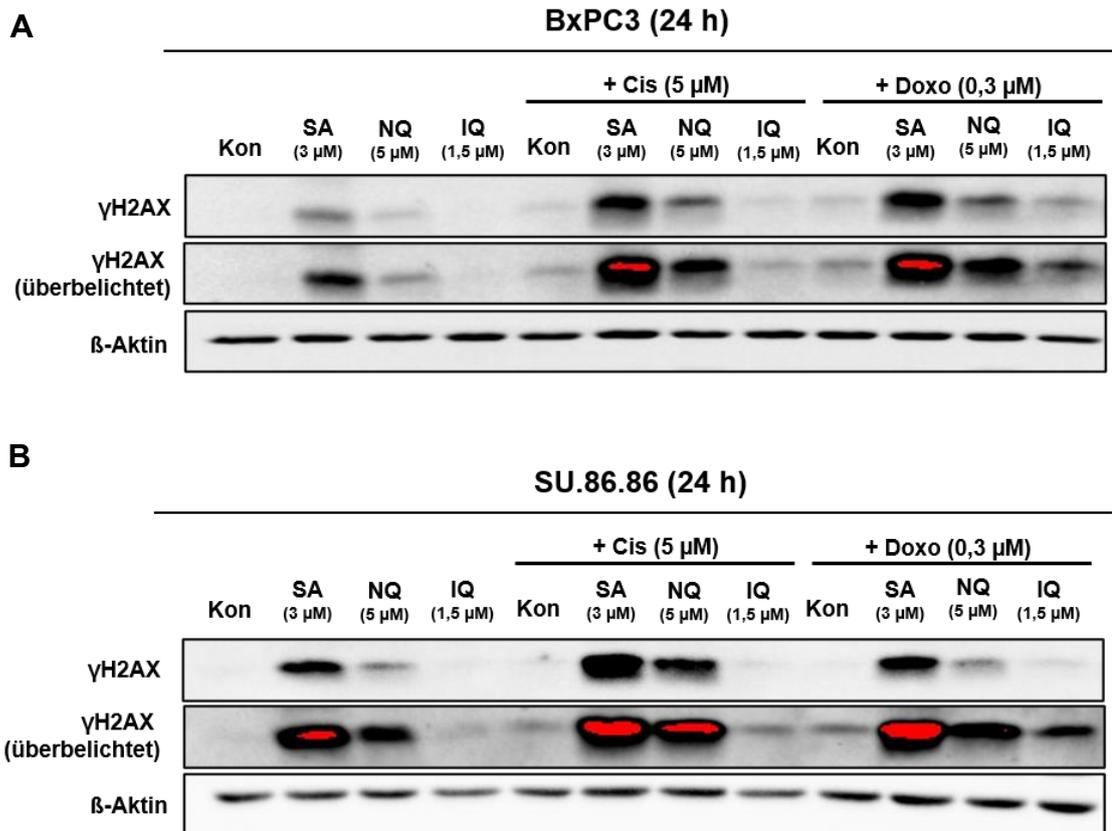


Abbildung 3.3: Einfluss der Naturstoffe allein und in Kombination mit ausgewählten Zytostatika auf die Proteinmenge von γ H2AX.

Um den Aktivitätsstatus der DNA-Schadensantwort (DDR) zu ermitteln, wurden BxPC3- (A) und SU.86.86-Zellen (B) für 24 h mit ausgewählten Naturstoffen allein oder in Kombination mit 5 μ M Cisplatin (Cis) oder 0,3 μ M Doxorubicin (Doxo) behandelt. Anschließend wurde die Modulation der Phosphorylierung von γ H2AX (*H2A histone family, member X* an Serin 139 phosphoryliert) über Proteinmenge mittels der Western Blot-Analyse als Marker für DNA-Schäden detektiert. Die Expression des Zytoskelettproteins β -Aktin dient als Ladekontrolle. IQ: *5-epi-Illimaquinone*, Kon: Kontrolle; NQ: *5-epi-Nakijiquinone Q*; Nst: Naturstoff; SA: *Secalonic acid F*.

3.2.2 Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf die Ausbildung von DNA-Strangbrüche nach Mono- bzw. Kombinationsbehandlung

Um die Art der zugrunde liegenden DNA-Schäden aufzuklären, die in den bisherigen Untersuchungen zu einer Potenzierung des γ H2AX-Signals geführt haben, wurde zunächst die Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) nach der Behandlung mit dem Naturstoff allein oder in Kombination mit Cis oder Doxo untersucht. Dazu wurde die Anzahl der nukleären γ H2AX-Foci pro Zellkern für das Naturstoffset untersucht (Abbildung 8.7 und Abbildung 8.8 des Anhangs). In BxPC3-Zellen steigert BV die Anzahl der durch Doxo hervorgerufenen γ H2AX-Foci. In SU.86.86-Zellen induzieren HQ und TP in der Monobehandlung mehr γ H2AX-Foci als in der unbehandelten Kontrolle detektierbar sind. In der Kombination von BJ und Cis wird die Anzahl der γ H2AX-Foci im Vergleich zu Cis allein reduziert. Für SA, NQ und IQ wurden zusätzlich zu den γ H2AX-

Foci auch nukleäre 53BP1-Foci und pATM-Foci pro Zellkern nach 24-stündiger Behandlung mittels immunzytochemischer Färbung dieser Proteine bestimmt (Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5) sowie die Anzahl der kolokalisierten γ H2AX/53BP1- und der kolokalisierten γ H2AX/pATM-Foci als spezifischster Indikator für DSBs untersucht (Abbildung 8.9; Abbildung 8.10; Abbildung 8.11 und Abbildung 8.12). Dabei zeigt sich, dass SA und NQ die Anzahl der γ H2AX-Foci pro Zellkern signifikant in beiden Zelllinien erhöhen. Die Anzahl dieser ist bei der Behandlung mit der gleichen Konzentration der Naturstoffe in SU.86.86-Zellen deutlich höher als in BxPC3-Zellen. IQ induziert nur in SU.86.86-Zellen die Anzahl an γ H2AX-Foci im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dieser Effekt ist bei der Analyse der Anzahl an 53BP1-Foci nicht erkennbar, lediglich die Anzahl der kolokalisierten γ H2AX/53BP1-Foci ist nach der Behandlung mit NQ in BxPC3-Zellen signifikant erhöht. Eine vermehrte Bildung der pATM-Foci sowie der kolokalisierten γ H2AX/pATM-Foci ist in den BxPC3-Zellen nach Behandlung mit SA detektierbar. NQ beeinflusst die Anzahl der pATM-Foci sowie der kolokalisierten γ H2AX/pATM-Foci in SU.86.86-Zellen, in BxPC3-Zellen jedoch nur die Bildung der kolokalisierten γ H2AX/pATM-Foci. Diese Resultate deuten darauf hin, dass SA oder NQ in der Monobehandlung DSBs hervorrufen, da die Anzahl an kolokalisierten γ H2AX/53BP1- und γ H2AX/pATM-Foci durch diese Behandlung erhöht wird. Darüber hinaus ist zu vermuten, dass eine Behandlung mit IQ zwar zu einer Aktivierung von H2AX führt, jedoch in der Monobehandlung nicht direkt zu DSBs.

Eine Aktivierung der DDR mit Cis bzw. Doxo führt in beiden Zelllinien zu einer erhöhten Anzahl von γ H2AX-, kolokalisierten γ H2AX/53BP1-, pATM- und kolokalisierten γ H2AX/pATM-Foci. In der Kombination von SA und Cis ist die Anzahl der pATM-Foci in beiden Zelllinien im Vergleich zur Cis-Monobehandlung reduziert. In SU.86.86 ist die Anzahl der kolokalisierten γ H2AX/pATM-Foci nach der Behandlung mit SA und Cis im Vergleich zu der Cis-Monobehandlung ebenfalls minimiert. NQ führt zu keiner Modulation der durch die Cis-Behandlung hervorgerufenen nukleären Foci. IQ hingegen erhöht die Menge an γ H2AX-Foci in SU.86.86-Zellen im Vergleich zu Cis allein. Bei der Kombinationsbehandlung mit Doxo zeigt sich, dass SA zu einer Abnahme der kolokalisierten γ H2AX/53BP1-Foci in BxPC3-Zellen sowie zu einer Reduktion der kolokalisierten γ H2AX/pATM-Foci in SU.86.86-Zellen führt. NQ steigert die durch Doxo verursachten kolokalisierten γ H2AX/pATM-Foci in SU.86.86-Zellen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass SA sowohl in der Kombination mit Cis als auch mit Doxo zu einer Reduktion der durch die Zytostatika hervorgerufenen DSBs führt. Die Resultate der Kombinationsbehandlung von NQ und Doxo sprechen dafür, dass die Anzahl der DSBs im Vergleich zur Doxo-Monobehandlung potenziert wird. Die Kombinationsbehandlung

aus IQ und Cis führt zu einer erhöhten Anzahl an nukleären γ H2AX-Foci, woraus man schließen kann, dass die DDR durch diese Behandlung vermehrt aktiviert wird.

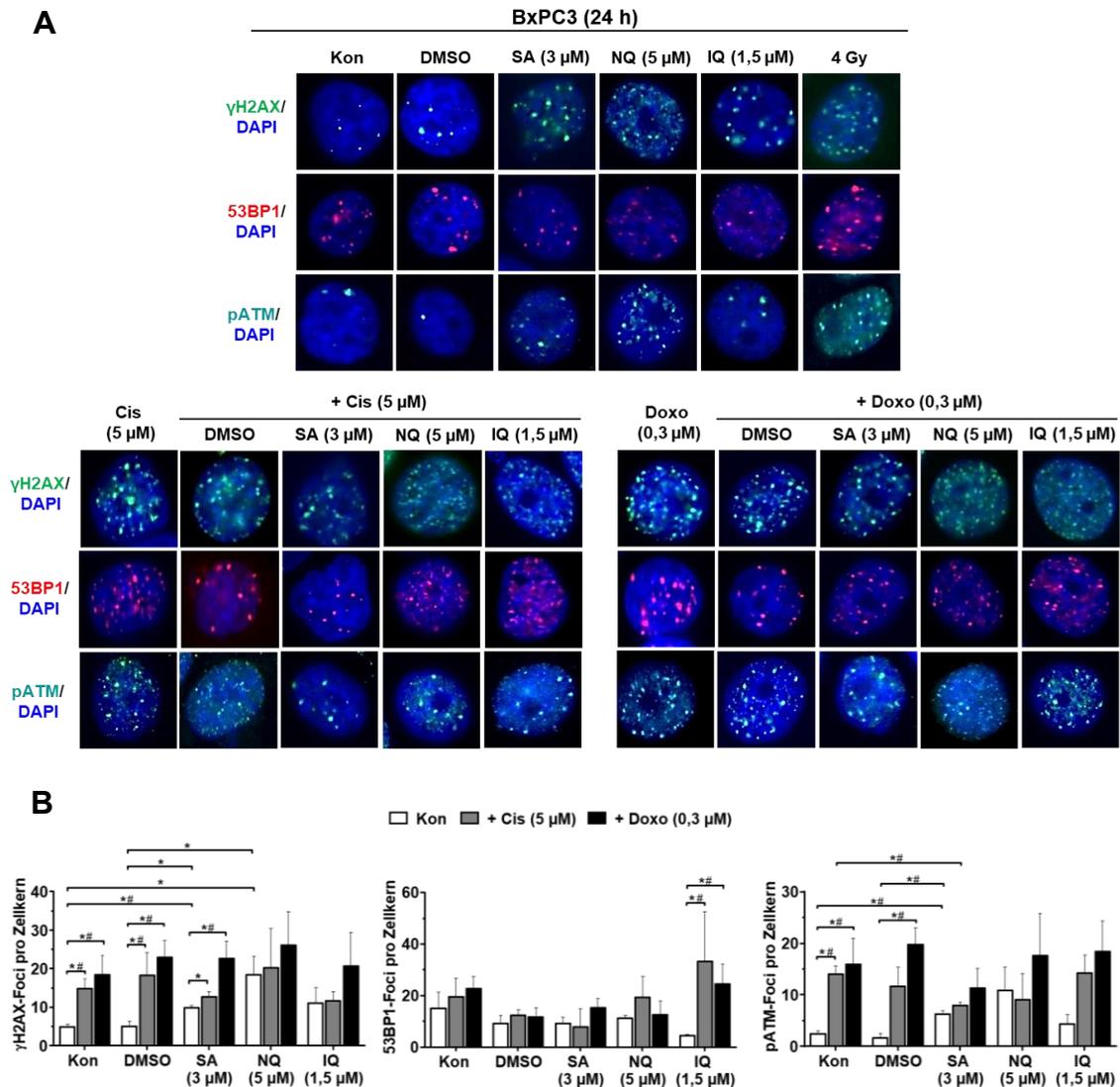


Abbildung 3.4: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf die Ausbildung nukleärer γ H2AX-, 53BP1- und pATM-Foci in BxPC3-Zellen.

Um die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) zu bestimmen, wurde die Anzahl an nukleären S139 phosphorylierten H2AX (γ H2AX)-, 53BP1- und pATM-Foci ermittelt. Dazu wurden BxPC3-Zellen für 24 h mit einer Konzentration im Bereich der IC_{50} der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 μ M Cisplatin (Cis) oder 0,3 μ M Doxorubicin (Doxo) behandelt. A: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen die Formation der jeweiligen Foci nach der Mono- oder Kombinationsbehandlung. B: Quantitative Auswertung der jeweiligen Foci pro Zelle. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM ($n = 3$, $N \geq 50$ Zellen pro Experiment). Student's t -Test $*p \leq 0,05$; One-way ANOVA $^{\#}p \leq 0,05$. 53BP1: P53-bindenes Protein 1; ATM: Serin/Threonin-Kinase *ataxia telangiectasia mutated*; DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol; IQ: *5-epi-Illimaquinone*, Kon: Kontrolle; NQ: *5-epi-Nakijiquinone Q*; p: phospho-; SA: *Secalonic acid F*. Die der Abbildung zugrunde liegenden Originaldaten sind Tabelle 8.4 für γ H2AX-, Tabelle 8.5 für 53BP1- und Tabelle 8.6 für pATM-Foci des Anhangs zu entnehmen.

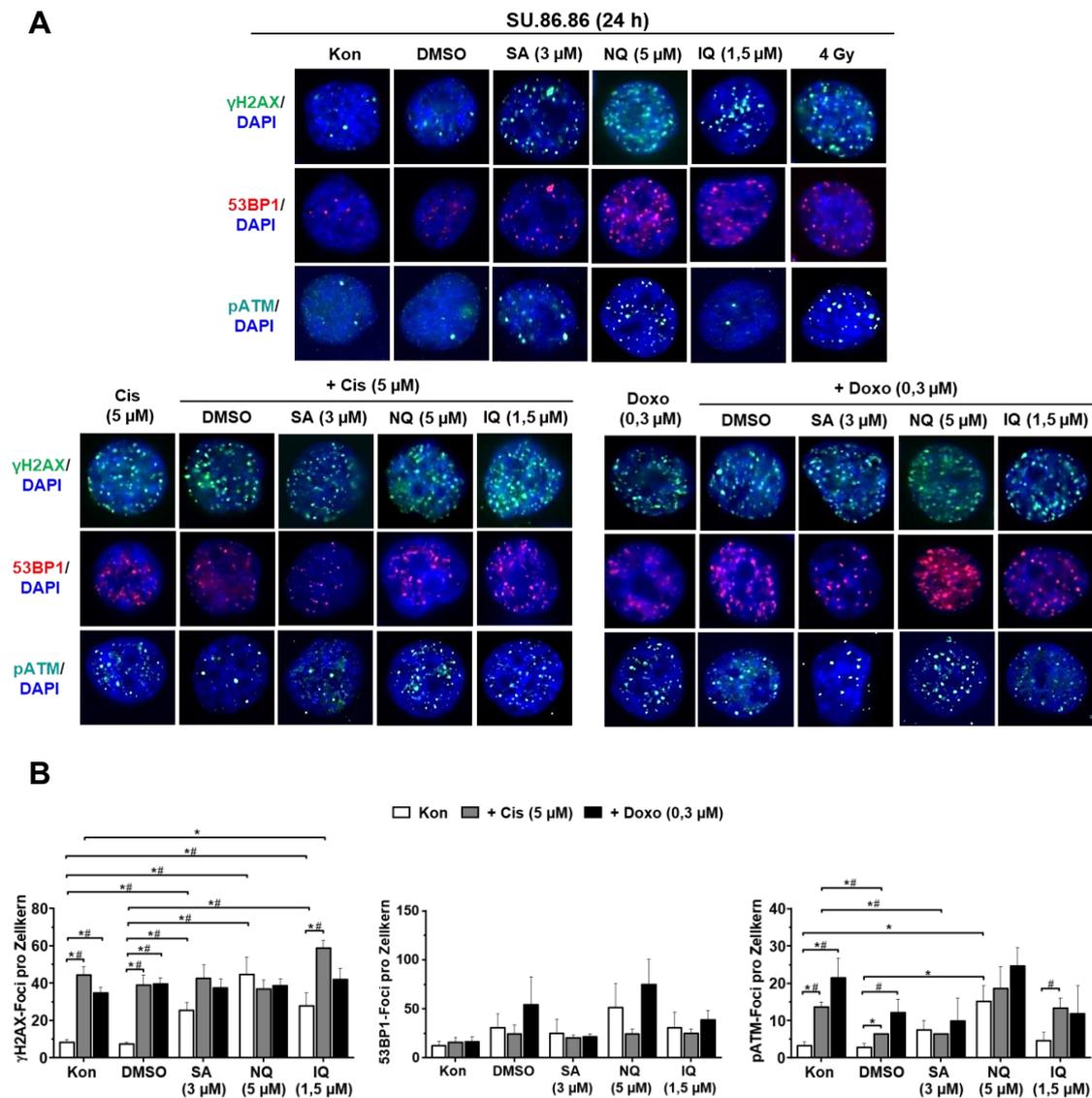


Abbildung 3.5: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf die Ausbildung nukleärer γ H2AX-, 53BP1- und pATM-Foci in SU.86.86-Zellen.

Um die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) zu bestimmen, wurde die Anzahl an nukleären S139 phosphorylierten H2AX (γ H2AX) -, 53BP1- und pATM-Foci ermittelt. Dazu wurden BxPC3-Zellen für 24 h mit einer Konzentration im Bereich der IC_{50} der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 μ M Cisplatin (Cis) oder 0,3 μ M Doxorubicin (Doxo) behandelt. A: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen die Formation der jeweiligen Foci nach der Mono- oder Kombinationsbehandlung. B: Quantitative Auswertung der jeweiligen Foci pro Zelle. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM ($n = 3$, $N \geq 50$ Zellen pro Experiment). Student's t -Test $*p \leq 0,05$; One-way ANOVA $\#p \leq 0,05$. 53BP1: P53-bindenes Protein 1; ATM: Serin/Threonin-Kinase *ataxia telangiectasia mutated*; DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol; IQ: *5-epi-Illimaquinone*, Kon: Kontrolle; NQ: *5-epi-Nakijiquinone* Q; p: phospho-; SA: *Secalonic acid F*. Die der Abbildung zugrunde liegenden Originaldaten sind Tabelle 8.4 für γ H2AX-, Tabelle 8.5 für 53BP1- und Tabelle 8.6 für pATM-Foci des Anhangs zu entnehmen.

Die Untersuchung der nukleären γ H2AX-, 53BP1- und pATM-Foci ermöglichen lediglich eine Aussage über die Ausbildung von DSBs. Jedoch führen neben diesen auch andere DNA-Strangbrüche bzw. die Ausbildung von apurine/aprimidine (AP)-Stellen zu einer Aktivierung von H2AX. Die Gesamtheit der SSBs und DSBs sowie der Basenschäden wurde unter Zuhilfenahme des alkalischen Comet-Assays in SU.86.86-Zellen bestimmt (Abbildung 3.6 und Abbildung 8.13). Hier zeigt sich eine statistisch signifikant erhöhte Menge von DNA im Schweif nach der Behandlung mit NQ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. IQ und SA weisen lediglich eine steigende Tendenz auf. Sowohl die Behandlung mit Cis als auch mit Doxo führen, wie erwartet, zu einer vermehrten Entstehung von DNA-Fragmenten. Weder SA noch NQ oder IQ bewirken eine signifikante Modulation der durch die Zytostatika ausgelösten DNA-Schäden. Lediglich die Kombination von IQ und Cis zeigt eine marginale, nicht signifikante Steigerung der DNA-Fragmente im Vergleich zur Cis-Monobehandlung. Die restlichen getesteten Naturstoffe haben ebenfalls keinen Einfluss auf die im Comet-Assay detektierbaren DNA-Schäden (Abbildung 8.13 des Anhangs). Diese Ergebnisse liefern Anhaltspunkte dafür, dass die Menge an DNA-Schäden durch NQ in der Monobehandlung stark gesteigert wird. Dies spiegeln die bisherigen Daten wider (Abbildung 3.2, Abbildung 3.3 und Abbildung 3.5). Darüber hinaus ist zu vermuten, dass die gesteigerte Aktivierung von H2AX nicht nur auf die Ausbildung von DSBs zurückzuführen ist.

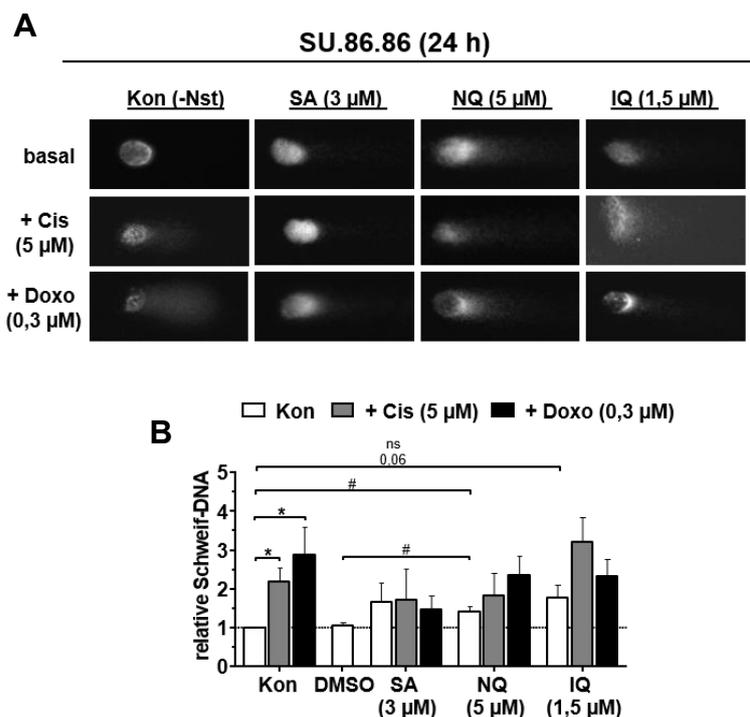


Abbildung 3.6: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf die Ausbildung von DNA-Strangbrüchen und Basenschäden.

Mit Hilfe des alkalischen Comet-Assays wurde die Menge an Einzel- (*single-strand breaks*; SSBs) und Doppelstrangbrüchen (*double strand breaks*; DSBs) sowie Basenschäden auf Einzelzellebene detektiert. Dazu wurden SU.86.86-Zellen für 24 h mit einer Konzentration im Bereich der IC_{50} der ausgewählten Naturstoffe (Nst) allein (basal) oder in Kombination mit 5 μ M Cisplatin (Cis) oder 0,3 μ M Doxorubicin (Doxo) behandelt. Die Kometen wurden mittels Mikroskopie visualisiert und die Intensität der DNA im Schweif quantifiziert. A: Repräsentative Mikroskopbilder zeigen die Formation der Kometen der Mono- oder Kombinationsbehandlung. B: Quantitative Auswertung der Intensität der Schweif-DNA. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM (n = 2, N = 50 Zellen). Student's *t*-Test * $p \leq 0,05$; One-way ANOVA # $p \leq 0,05$. IQ: *5-epi-Illimaquinone*, Kon: Kontrolle; NQ: *5-epi-Nakijiquinone* Q; SA: *Secalonic acid* F. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.7 des Anhangs zu entnehmen.

Bei dem Vergleich der Ergebnisse der bisherigen Versuche mit den zehn favorisierten Naturstoffen (Tabelle 3.1) zeigt sich, dass die Naturstoffe SA, NQ und IQ am vielversprechendsten erscheinen. Sie weisen den stärksten Effekt bei der Phosphorylierung von H2AX auf (Abbildung 3.2 und Abbildung 3.3) und auch die Anzahl der nukleären γ H2AX-Foci ist erhöht (Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5). Ein Blick auf die Fachliteratur bestärkt die These, dass eine Interaktion mit verschiedenen Faktoren der DDR möglich ist. Da die DNA-Schäden und die Modulation der DDR im Fokus dieser Arbeit stehen, wurden weitere Experimente zur detaillierteren Charakterisierung des Einflusses der Naturstoffe auf die DDR mit diesen drei Naturstoffen in Mono- und Kombinationsbehandlung fortgesetzt.

3.2.3 Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf verschiedene Faktoren der DNA-Schadensantwort nach Mono- bzw. Kombinationsbehandlung

Für die genauere Betrachtung des Einflusses der Naturstoffe auf die DDR, wurden weitere, ausführliche Western Blot-Analysen nach 24-stündiger Mono- bzw. Kombinationsbehandlung für SA, NQ oder IQ und Cis bzw. Doxo durchgeführt. Im Mittelpunkt standen vor allem Proteine der DDR, die durch die Proteinkinasen ATM und ATR reguliert werden sowie die Aktivierung dieser Kinasen selbst. Abbildung 3.7 zeigt die Ergebnisse der Western Blot-Analysen für BxPC3- (A) und SU.86.86-Zellen (B). Nach Behandlung mit 3 μM SA wird die 32 kDa Untereinheit des Replikationsproteins A2 (RPA32) in SU.86.86-Zellen phosphoryliert (pRPA32). Eine Aktivierung der Proteine RPA32, ATR, ATM, des KRAB-assoziierten Proteins 1 (KAP1) und des Tumorsuppressors P53 tritt nach einer Behandlung mit 5 μM NQ in BxPC3-Zellen auf (pATR, pATM, pKAP1, pP53). In SU.86.86-Zellen kommt es im Vergleich hierzu zu keiner Phosphorylierung von ATR, dafür wird aber die Checkpointkinase 1 (CHK1) deutlich phosphoryliert (pCHK1). Eine Behandlung von 1,5 μM IQ aktiviert ATR sowohl in BxPC3-Zellen als auch in SU.86.86-Zellen. Zusätzlich wird P53 in letzteren phosphoryliert.

Um eine Modulation der DDR durch die Naturstoffe zu analysieren, wurde diese in den Zellen mit Hilfe von 5 μM Cis oder 0,3 μM Doxo angeregt. In dem Ergebnis der Western Blot-Analysen in BxPC3-Zellen wird deutlich, dass im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine Behandlung mit Cis zu einer Aktivierung aller untersuchten Proteine führt. Dies gilt ebenso für SU.86.86-Zellen, mit Ausnahme von RPA32. Im Vergleich zur Cis-Monobehandlung führt eine Kombinationsbehandlung aus SA und Cis in den getesteten Zelllinien zu einer Abnahme der Phosphorylierung von ATM, P53, CHK1 und CHK2. Die Proteine ATR, KAP1 und RPA32 werden durch SA nach Cis-induzierter DDR unterschiedlich beeinflusst. In BxPC3-Zellen wird die Menge an pKAP1 nach der Kombinationsbehandlung aus SA und Cis reduziert, wohingegen in SU.86.86-Zellen die Menge an pKAP1 und pRPA32 nach dieser erhöht ist. In der zuletzt genannten Zelllinie wird die Phosphorylierung von ATR bei kombinierter Behandlung von SA und Cis im Vergleich zur Cis-Monobehandlung minimiert.

Die Behandlung mit NQ löst in BxPC3- und SU.86.86-Zellen eine verstärkte Phosphorylierung einiger durch Cis aktivierten Proteine der DDR aus, wozu unter anderem KAP1 und RPA32 gehören. Besonders auffällig ist hier die Aktivierung von KAP1 durch die Kombinationsbehandlung aus NQ und Cis. Im Vergleich zur Cis-

Monobehandlung wird die Phosphorylierung von CHK1 durch eine Kombination mit NQ reduziert. Die Untersuchungen der durch Cis-aktivierten Proteine pATM, pATR und pCHK2 zeigen, dass eine Kombinationsbehandlung aus NQ und Cis in den getesteten Zelllinien zu unterschiedlichen Modulationen dieser Proteine führt. In BxPC3-Zellen ist eine vermehrte Aktivierung von ATM zu verzeichnen, wohingegen die Phosphorylierung von CHK2 abnimmt. In SU.86.86-Zellen wird durch die Behandlung mit NQ und Cis lediglich die Phosphorylierung von ATR erhöht.

Eine Kombinationsbehandlung aus IQ und Cis führt zu einer Beeinflussung der nach Cis-Behandlung aktivierten Proteine der DDR, jedoch ist diese im Vergleich mit den Resultaten der Kombinationsbehandlungen aus Cis und SA bzw. NQ weniger vielfältig. In BxPC3-Zellen zeigen die Untersuchungsergebnisse, dass es im Vergleich zur Cis-Monobehandlung bei der Kombination mit dem Naturstoff IQ zu einer stärkeren Phosphorylierung von ATM kommt, die Phosphorylierung von KAP1 jedoch abnimmt. Des Weiteren lassen die Ergebnisse vermuten, dass in SU.86.86-Zellen eine Reduktion der Phosphorylierung von ATR durch eine Kombinationsbehandlung aus IQ und Cis hervorgerufen wird.

Die Resultate der Western Blot-Analysen zeigen, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, für Doxo eine Aktivierung aller untersuchten Proteine in BxPC3- und SU.86.86-Zellen. Die Ausprägung variiert hierbei jedoch. Bei der Untersuchung der Modulation der Doxo-induzierten DDR durch SA stellt sich heraus, dass es im Vergleich zur Doxo-Monobehandlung in beiden Zelllinien zu einer Abnahme der Phosphorylierung von ATM, KAP1, P53, CHK1 und CHK2 kommt. Eine vermehrte Aktivierung von RPA32 durch die Kombination aus SA und Doxo ist in SU.86.86-Zellen erkennbar.

Eine Kombinationsbehandlung aus NQ und Doxo hingegen führt in beiden Zelllinien zu einer stärkeren Phosphorylierung des bereits durch Doxo-aktivierten RPA32. Im Vergleich zur Doxo-Monobehandlung nimmt die Aktivierung von ATM nach der Behandlung mit NQ und Doxo jedoch ab. In BxPC3-Zellen tritt nach der Kombinationsbehandlung aus NQ und Doxo im Vergleich zu einer Doxo-Monobehandlung zusätzlich eine Abnahme der Phosphorylierung von CHK1 auf, wohingegen in SU.86.86-Zellen die Phosphorylierung der Proteine ATR und KAP1 zunimmt.

Des Weiteren weisen die Ergebnisse der Kombinationsbehandlung aus IQ und Doxo in BxPC3-Zellen darauf hin, dass die Phosphorylierung von ATR und CHK1 im Vergleich

zur Doxo-Monobehandlung deutlich gesteigert wird, die Aktivierung von ATM ist durch IQ und Doxo jedoch vermindert. Für SU.86.86-Zellen konnte nach der Behandlung mit IQ und Doxo lediglich eine Abnahme der Phosphorylierung von pCHK2 ermittelt werden. Eine Übersicht über die Modulation der DDR durch die Naturstoffe allein und/oder in Kombination mit Cis oder Doxo einschließlich von γ H2AX zeigt Tabelle 3.2.

Zusammenfassend deuten die Befunde darauf hin, dass die getesteten Naturstoffe unterschiedliche Signalwege der DDR beeinflussen. SA scheint einen Einfluss auf den ATM-CHK2-Signalweg der DDR zu haben, da es sowohl in der Kombination mit Cis als auch mit Doxo zu einer Beeinflussung der Phosphorylierung der an diesem Signalweg beteiligten Proteine kommt. Auch die Entstehung von replikativem Stress ist durch eine Behandlung mit SA nicht auszuschließen. Darüber hinaus legen die Resultate nahe, dass eine Behandlung mit SA in SU.86.86 zu einer Aktivierung verschiedener DNA-Reparaturwege führt, die durch RPA vermittelt werden. Die Ergebnisse für die Behandlung mit NQ deuten an, dass der dominante Effekt der Modulation der DDR auf replikativen Stress zurückzuführen ist, da vor allem die Proteine ATR und RPA32 beeinflusst werden. Jedoch scheint es als Reaktion auf einen DNA-Schaden zu einer Beeinflussung des Zellzyklus zu kommen, da KAP1 phosphoryliert wird. IQ führt in den getesteten Zelllinien zu diversen Befunden, die ebenfalls auf eine Interaktion mit dem ATR-CHK1-Signalweg sowie eine Modulierung des Zellzyklus hindeuten.

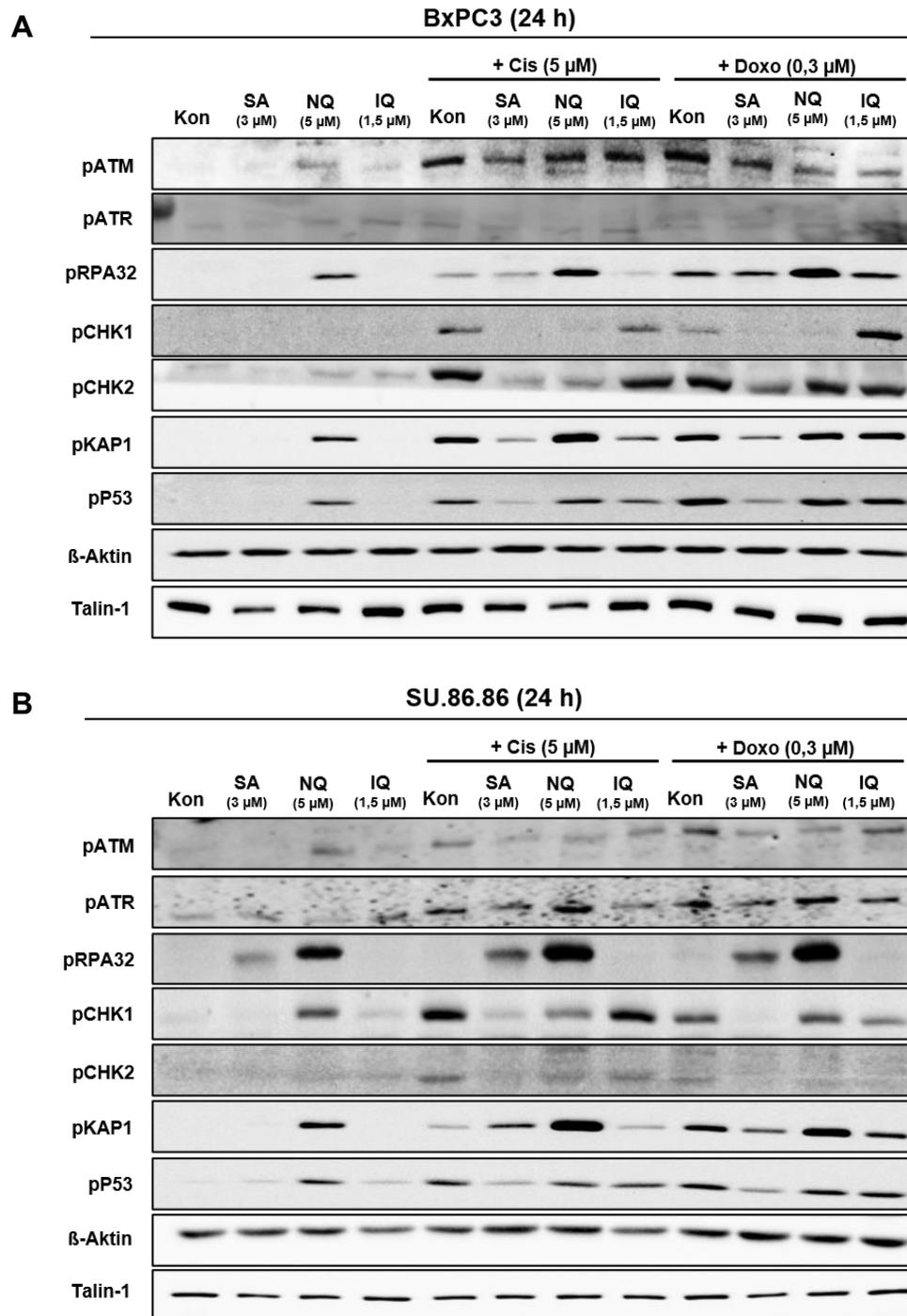


Abbildung 3.7: Western Blot-Analysen zur Charakterisierung des Einflusses ausgewählter Naturstoffe auf die DNA-Schadensantwort (DDR) in BxPC3- und SU.86.86-Zellen.

Für die Western Blot-Analysen wurden BxPC3- (A) und SU.86.86-Zellen (B) für 24 h mit einer Konzentration im Bereich der IC_{50} der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 μ M Cisplatin (Cis) oder 0,3 μ M Doxorubicin (Doxo) behandelt. Mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern wurde der Aktivierungsstatus der DDR untersucht. Die Expression des Zytoskelettproteins β -Aktin und Talin-1 dienen als Ladekontrolle. Kon: Kontrolle; ATM: *ataxia telangiectasia mutated*; ATR: *ataxia telangiectasia and RAD3 related*; CHK: Checkpointkinase; IQ: *5-epi-Illimaquinone*; KAP1: *KRAB-associated protein 1*; NQ: *5-epi-Nakijiquinone*; p: phospho-; p53: Tumorsuppressorprotein; RPA32: Replikationsprotein A2, 32 kDa Untereinheit; SA: *Secalonic acid F*.

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der Resultate der Western Blot-Analysen zur Charakterisierung des Einflusses von ausgewählten Naturstoffen auf die DNA-Schadensantwort (DDR).

Für die Western Blot-Analysen wurden BxPC3- und SU.86.86-Zellen für 24 h mit einer Konzentration im Bereich der IC₅₀ der ausgewählten Naturstoffe allein (basal) oder in Kombination mit 5 µM Cisplatin (Cis) oder 0,3 µM Doxorubicin (Doxo) behandelt. Mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern wurde der Aktivierungsstatus der DDR untersucht. Dargestellt ist das unterschiedliche Ausmaß der Aktivierung der an der DDR beteiligten Proteine im Vergleich zur Kontrolle bzw. zu Cis oder Doxo (Abbildung 3.7). 0: kein Effekt; +/-: moderater Effekt; ++/- -: starker Effekt; +++/- - -: sehr starker Effekt. ATM: *ataxia telangiectasia mutated*; ATR: *ataxia telangiectasia and RAD3 related*; CHK: Checkpointkinase; IQ: *5-epi-llimaquinone*; KAP1: *KRAB-associated protein 1*; NQ: *5-epi-Nakijiquinone Q*; p: phospho-; P53: Tumorsuppressorprotein; RPA32: Replikationsprotein A2, 32 kDa Untereinheit; SA: *Secalonic acid F*.

		BxPC3 (24 h)			SU.86.86 (24 h)		
		basal	+Cis	+Doxo	basal	+Cis	+Doxo
SA	pATM	0	-	-	0	-	-
	pATR	0	0	0	0	-	0
	pRPA32	0	0	0	+	+	+
	pCHK1	0	-	-	0	-	-
	pCHK2	0	-	-	0	-	-
	pKAP1	0	-	-	0	+	-
	pP53	0	-	-	0	-	-
	γH2AX	++	+++	+++	++	+++	+++
NQ	pATM	+	+	-	+	0	-
	pATR	+	0	0	0	+	+
	pRPA32	++	++	++	++	++	++
	pCHK1	0	-	-	++	-	0
	pCHK2	0	-	0	0	0	-
	pKAP1	++	+	0	++	++	+
	pP53	++	0	0	++	0	0
	γH2AX	+	++	++	+	++	++
IQ	pATM	0	+	-	0	0	0
	pATR	+	0	+	+	-	0
	pRPA32	0	0	0	0	0	0
	pCHK1	0	0	++	0	0	0
	pCHK2	0	0	0	0	0	-
	pKAP1	0	-	0	0	0	0
	pP53	0	0	0	+	0	0
	γH2AX	0	0	+	+	0	+

3.3 Modulation der Zytotoxizität durch Kombinationsbehandlungen

Zur Abschätzung, ob die nach 24 h ermittelten DNA-Schäden in der Konsequenz zum Zelltod führen, wurden verschiedenste Kombinationsbehandlungen für 72 h mit den drei favorisierten Naturstoffen und den Zytostatika durchgeführt. Die Vitalität der Zellen wurde mittels Alamar Blue®-Assay bestimmt. Um die Stärke des Effektes der Kombinationsbehandlung zu bewerten, wurde der Kombinationsindex (KI) ermittelt. Ein $KI < 1$ zeigt einen synergistischen Effekt, ein $KI = 1$ einen additiven Effekt und ein $KI > 1$ deutet auf einen antagonistischen Effekt hin. Der KI wurde mit Hilfe der CompuSyn-Software ermittelt (Chou, 2010). Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationskombinationen der Naturstoffe und der Zytostatika behandelt. Die Konzentrationen liegen im Bereich der IC_{20} , IC_{50} und IC_{80} der jeweiligen Substanz. Eine detaillierte Zusammenstellung der Resultate für BxPC3-Zellen ist Abbildung 8.14, für SU.86.86-Zellen Abbildung 8.15 des Anhangs zu entnehmen. Die Kombinationsindexe der in den bisherigen Experimenten getesteten Konzentrationen sind in Abbildung 3.8 zusammengefasst.

Bei dem Vergleich der einzelnen Kombinationsbehandlungen zeigt sich, dass SA in der Kombination mit Cis in BxPC3- und SU.86.86-Zellen sowohl zu synergistischen als auch zu additiven zytotoxischen Effekten führt (Abbildung 8.14 (C) und Abbildung 8.15 (C)). Die in den zuvor genannten Experimenten verwendete Behandlung von 3 μ M SA in der Kombination mit 5 μ M Cis ruft in BxPC3-Zellen einen synergistischen und in SU.86.86-Zellen einen additiven zytotoxischen Effekt hervor (Abbildung 3.8 (A, C)). Die verschiedenen Kombinationsbehandlungen mit Doxo führen hauptsächlich zu additiven zytotoxischen Effekten, lediglich die Kombination aus 5 μ M SA und 0,3 μ M Doxo in BxPC3-Zellen erweist sich als stark antagonistische Kombinationsbehandlung (Abbildung 8.14 (C) und Abbildung 8.15 (C)). In der Kombination von 3 μ M SA mit 0,3 μ M Doxo, die bei den durchgeführten Experimenten genutzt wurde, zeigt sich ein additiver zytotoxischer Effekt (Abbildung 3.8 (B, D)). Eine Konzentration von 5 μ M NQ ergibt in der Kombination mit 5 μ M Cis in beiden Tumorzelllinien einen synergistischen zytotoxischen Effekt, wohingegen in der Kombination mit 0,3 μ M Doxo ein additiver Effekt detektierbar ist (Abbildung 3.8). Bei der geringen Konzentration von Cis in der Kombination mit 5 μ M NQ in BxPC3-Zellen konnte ebenfalls ein synergistischer Effekt detektiert werden. Sowohl für BxPC3- als auch für SU.86.86-Zellen wurde ein synergistischer bzw. ein additiver Effekt in der Kombination mit Doxo und 5 μ M NQ festgestellt (Abbildung 8.14 (E) und Abbildung 8.15 (E)). In BxPC3-Zellen wirkt eine Behandlung mit 1,5 μ M IQ in der Kombination mit 5 μ M Cis leicht antagonistisch, in SU.86.86-Zellen jedoch additiv. Die Resultate der Behandlung mit 0,3 μ M Doxo und

1,5 μM IQ lassen in BxPC3-Zellen einen synergistischen, in SU.86.86-Zellen einen additiven zytotoxischen Effekt erkennen (Abbildung 3.8). Die vielversprechendsten Effekte bei Kombination von IQ und Cis zeigen sich bei einer Konzentration von 3,5 μM IQ. In der Kombination mit 0,3 μM Doxo wirkt IQ am effektivsten, d.h. dass in dieser Kombination die meisten additiven und synergistischen zytotoxischen Effekte auftreten (Abbildung 8.14 (G) und Abbildung 8.15 (G)). Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass NQ über die verschiedenen Zellsysteme und Zytostatika am besten geeignet ist, um in der Kombination stark additive oder synergistische zytotoxische Effekte auszulösen. Jedoch zeigen SA und IQ auch in vereinzelt Kombinationsbehandlungen synergistische Effekte auf.

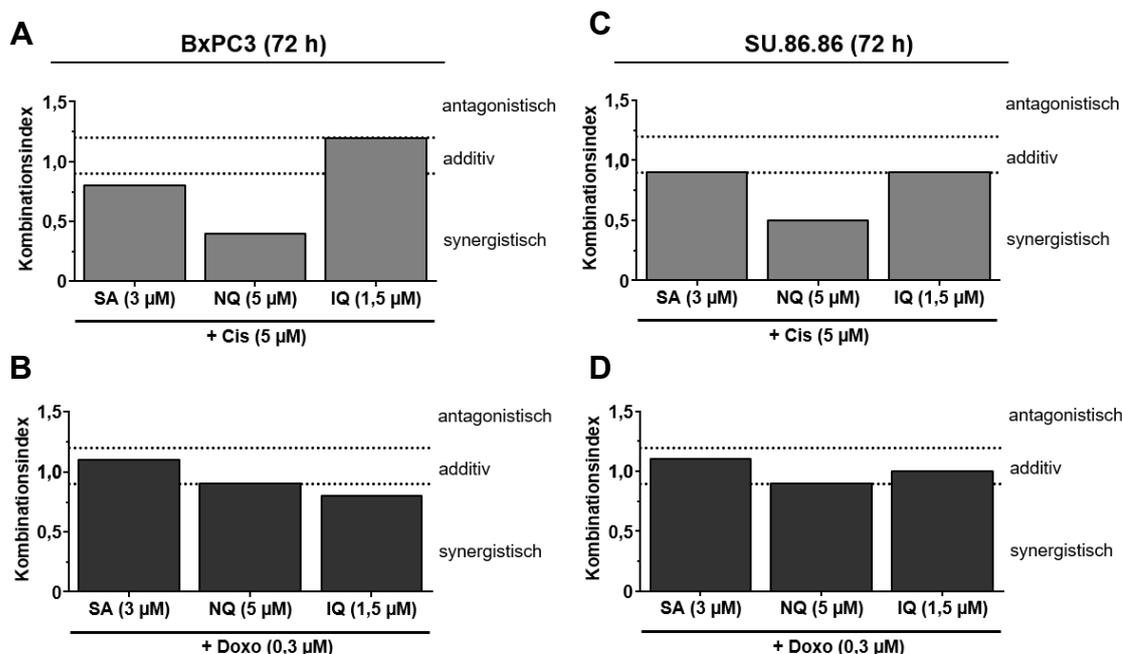


Abbildung 3.8: Einfluss der Kombinationsbehandlung aus Naturstoffen und Zytostatikum auf die Vitalität der Pankreaskarzinomzellen.

Um den Einfluss der Kombinationsbehandlungen auf die Vitalität zu untersuchen, wurden BxPC3- (A, B) und SU.86.86-Zellen (C, D) für 72 h mit Konzentrationskombinationen der Naturstoffe und Cisplatin (Cis) (A, C) bzw. Doxorubicin (Doxo) (B, D) behandelt. Die verwendeten Konzentrationen der einzelnen Substanzen liegen im Bereich der IC_{20} , IC_{50} und IC_{80} der jeweiligen Substanz. Mittels Alamar Blue[®]-Assay wurde die Vitalität ermittelt und der Kombinationsindex zur Bewertung des zytotoxischen Effektes mit Hilfe der CompuSyn-Software bestimmt. Dargestellt sind die ermittelten Kombinationsindexe der zuvor getesteten Konzentrationen. Es wird zwischen antagonistischen, additiven und synergistischen Effekten unterschieden. IQ: 5-*epi*-Iliquinone; NQ: 5-*epi*-Nakijiquinone Q; SA: Secalonic acid F. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.8 des Anhangs zu entnehmen.

3.4 Einfluss der ausgewählten Naturstoffe in Mono- bzw. Kombinationstherapie auf die Zellzyklusverteilung

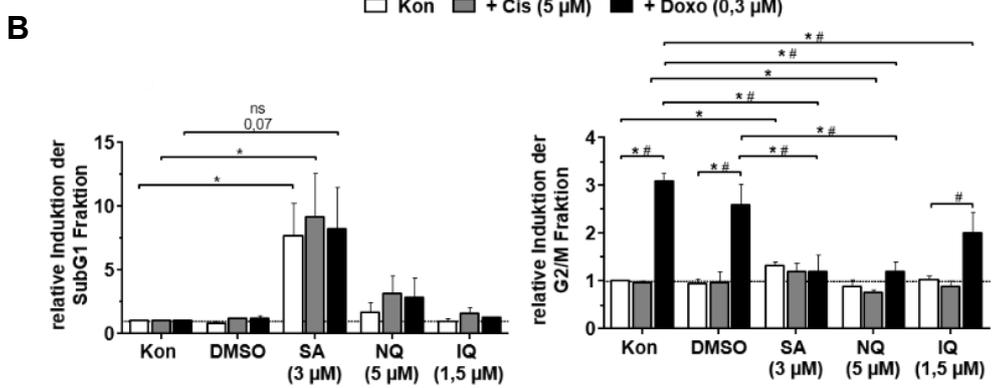
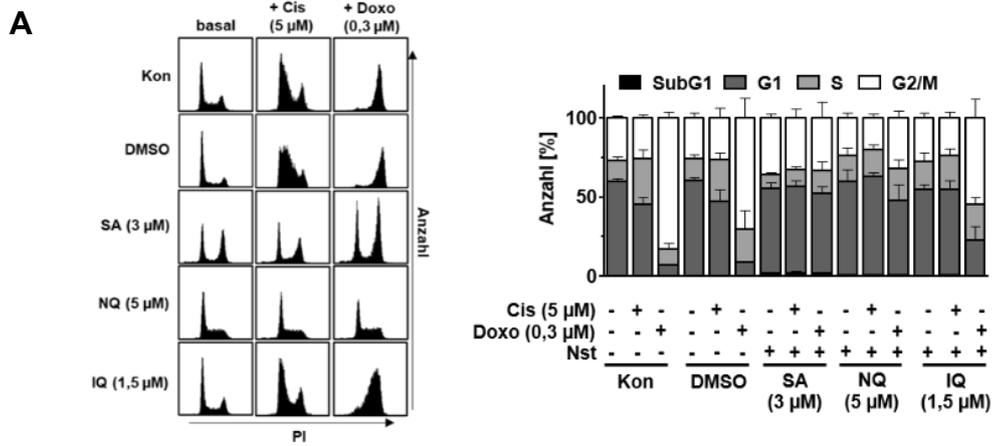
Zur Überprüfung, ob die beschriebenen Unterschiede in der Vitalität nach der Behandlung mit den Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cis bzw. Doxo auf vermehrter Apoptose beruhen oder mit einem Zellzyklusarrest einhergehen, ausgelöst durch vermehrte DNA-Schäden, wurde der Einfluss der Mono- oder Kombinationstherapie auf die Zellzyklusverteilung mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Dazu wurde die Verteilung der Zellen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus nach 24- und 72-stündiger Behandlung mit den zuvor ermittelten Konzentrationen analysiert (Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10). Der Einfluss der Naturstoffe auf die Induktion der Apoptose ergeben sich bei der Betrachtung der Anzahl der Zellen in der SubG1-Fraktion (Abbildung 3.9 (B, D) und Abbildung 3.10 (B, D)). Die Resultate der durchflusszytometrischen Untersuchungen weisen darauf hin, dass SA in BxPC3-Zellen nach 24- und 72-stündiger Behandlung zu einem Anstieg der SubG1-Fraktion führt, die die apoptotische Zellpopulation darstellt. Diese vermehrte Anzahl an Zellen in der SubG1-Fraktion nach einer Behandlung mit SA ist bei den Analysen in SU.86.86-Zellen als Tendenz ebenfalls zu erkennen. Eine 72-stündige Behandlung von BxPC3-Zellen mit NQ hat eine signifikante Induktion der SubG1-Fraktion zur Folge, wohingegen die Ergebnisse der Untersuchung in SU.86.86-Zellen nach NQ-Behandlung nur auf eine tendenzielle Zunahme der apoptotischen Zellen hindeuten. Die verwendeten Zytostatika zeigen ebenfalls einen Einfluss auf die Anzahl der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen. In beiden Zelllinien steigt nach einer 72-stündigen Monobehandlung mit Cis die Anzahl der Zellen in der SubG1-Fraktion, diese Induktion des apoptotischen Zelltods ist allerdings nach 24 h noch nicht detektierbar. Bei den Ergebnissen der Kombinationsbehandlung von BxPC3-Zellen mit SA und Cis fällt auf, dass die Anzahl der sich in der SubG1-Fraktion befindlichen Zellen sowohl nach 24 als auch nach 72 h im Vergleich zur Cis-Monobehandlung potenziert werden kann. Dies deutet sich ebenfalls als Trend in SU.86.86-Zellen für die Kombinationsbehandlung aus SA und Cis. Vergleichbare Resultate liefert die Kombinationsbehandlung aus NQ und Cis. Nach 72-stündiger Behandlung mit diesen beiden Substanzen stellt sich heraus, dass NQ in der Lage ist, die durch Cis-induzierte Apoptose zu verstärken. Die Monobehandlung mit dem Zytostatikum Doxo bewirkt nach 72-stündiger Behandlung einen Anstieg in der SubG1-Fraktion, die zu einem früheren Zeitpunkt noch nicht detektierbar ist. Bei einem Vergleich der Doxo-Monobehandlung mit einer Kombinationsbehandlung aus SA und Doxo wird deutlich, dass der Anteil der Zellen in der SubG1-Fraktion in BxPC3- und SU.86.86-Zellen nach einer 24-stündigen Kombinationsbehandlung vergrößert ist. Dieser Effekt ist

nach einer Behandlungsdauer von 72 h hingegen nicht mehr zu erkennen. Auffällige Ergebnisse ergeben sich nach einer 72-stündigen Kombinationsbehandlung aus NQ und Doxo. Im Gegensatz zu den bisherigen Untersuchungen lässt sich hier in BxPC3-Zellen eine Abnahme der Zellanzahl in der SubG1-Fraktion im Vergleich zur Doxo-Monobehandlung erkennen.

Der Einfluss der getesteten Naturstoffe in Mono- bzw. Kombinationstherapie auf die Zellzyklusprogression zeigt sich bei der Betrachtung der anteiligen Zellen in der G₂/M-Phase (Abbildung 3.9 (B, D) und Abbildung 3.10 (B, D)). Der Naturstoff SA löst in der Monobehandlung in BxPC3-Zellen nach 24 h eine Zunahme der Zellen in der G₂/M-Phase aus. Den Resultaten nach NQ-Monobehandlung in SU.86.86-Zellen ist zu entnehmen, dass nach einer 24-stündigen Behandlung die Anzahl der in der G₂/M-Phase befindlichen Zellen im Vergleich zur Kontrolle minimiert ist. Darüber hinaus stellt sich heraus, dass IQ in der Monobehandlung keinen Effekt auf die Zellzyklusprogression hat. In den Analysen in beiden Zelllinien zeigt sich, dass eine 24-stündige Monobehandlung mit Cis noch keinen Einfluss auf die Zellzyklusprogression hat, der Anteil der sich in der G₂/M-Phase befindenden Zellen steigt jedoch nach einer Behandlungsdauer von 72 h an. Dieser durch Cis erhöhte Anteil an wird in Kombination mit SA in BxPC3-Zellen bei einer Behandlungsdauer von 72 h teilweise aufgehoben. Die Ergebnisse der 24- und 72-stündigen Behandlung mit NQ und Cis geben ebenfalls Hinweise darauf, dass durch diese Kombinationsbehandlung die Zellzahl in der G₂/M-Phase reduziert wird. Die Monobehandlung mit Doxo resultiert in beiden Zelllinien in einem Anstieg der G₂/M-Zellpopulation, und hat demnach einen Zellzyklusblock in der G₂/M-Phase zur Folge. Für alle getesteten Naturstoffe ist eine Abnahme dieser Zellpopulation in der 24-stündigen Kombinationsbehandlung zu sehen.

Auf Basis der Daten zur SubG1-Fraktion und zur Zellzyklusprogression scheint es möglich, dass SA zusammen mit Cis bzw. Doxo in der Lage ist, den Zellzyklusarrest zu verhindern oder aufzuheben und somit die Menge an apoptotischen Zellen zu erhöhen. Darüber hinaus liegt die Vermutung nahe, dass NQ in der Kombination mit Cis eine ähnliche Wirkung hat. In der Kombination mit NQ und Doxo jedoch führt die Reduktion der in der G₂/M-Phase befindlichen Zellen durch diese Behandlung zu einer Aufhebung der Apoptose-auslösenden Wirkung von Doxo. Die Abnahme der Zellen in der G₂/M-Fraktion nach der Kombinationsbehandlung aus IQ und Doxo lässt auch hier vermuten, dass IQ in der Lage ist, den durch Doxo ausgelösten Zellzyklusarrest zu unterbinden.

BxPC3 (24 h)



BxPC3 (72 h)

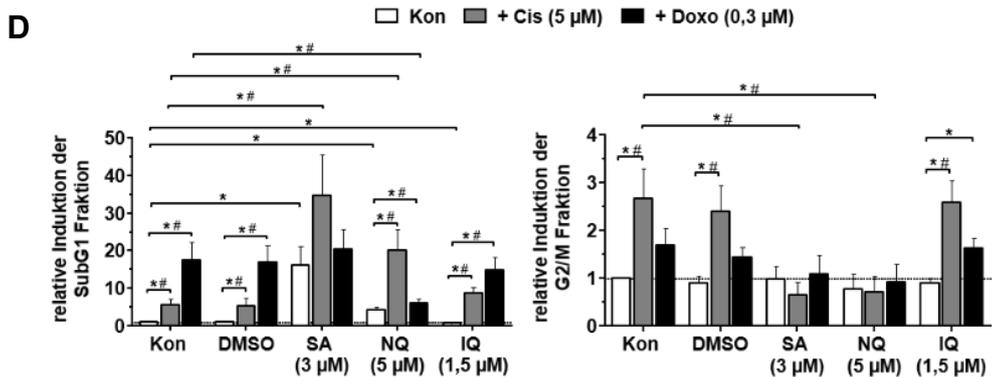
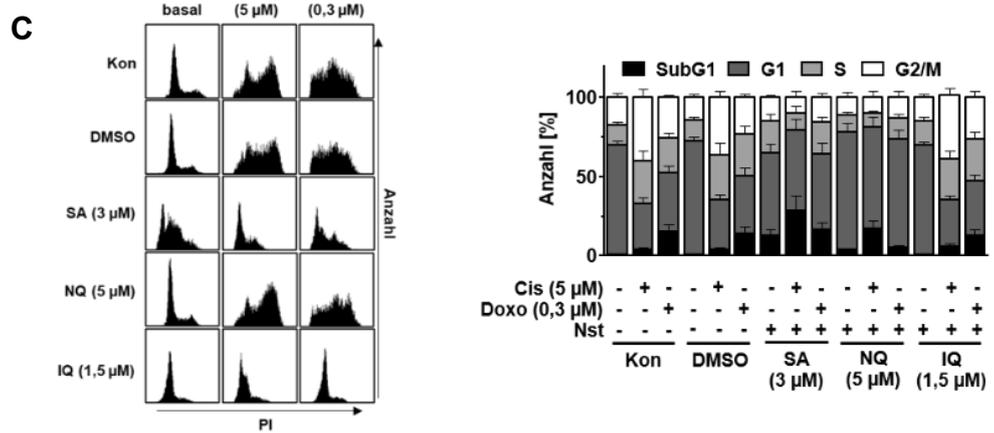
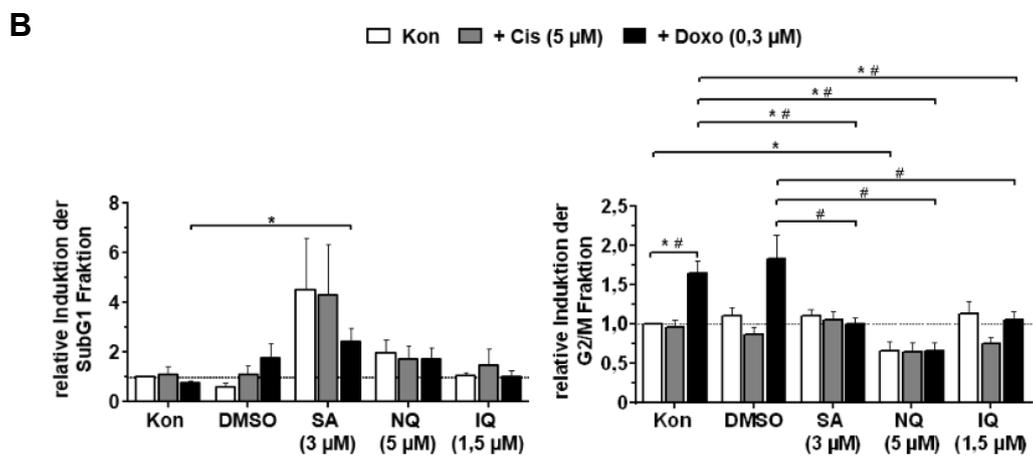
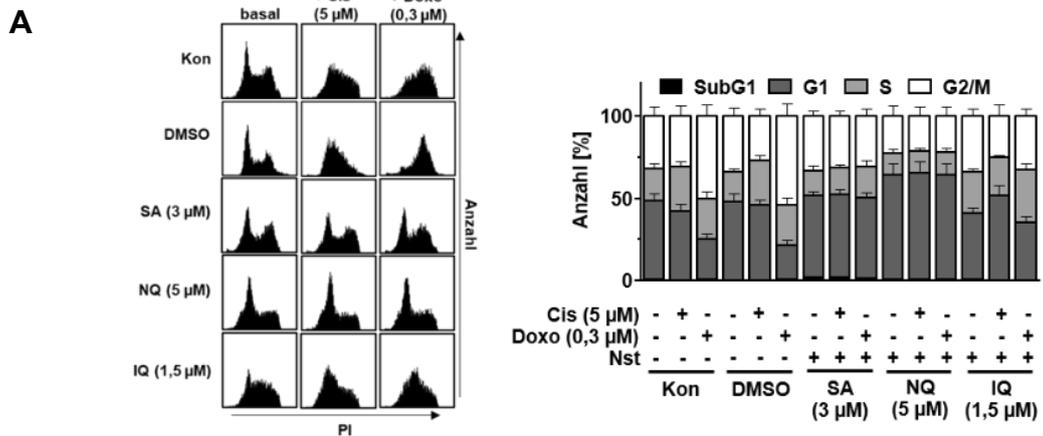


Abbildung 3.9: Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses von ausgewählten Naturstoffen und Zytostatika (Mono- und Kombinationsbehandlung) auf die Zellzyklusverteilung von BxPC3-Zellen.

BxPC3-Zellen wurden für 24 (A; B) und 72 h (C; D) mit einer Konzentration im Bereich der IC_{50} der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 μ M Cisplatin (Cis) oder 0,3 μ M Doxorubicin (Doxo) behandelt. Anschließend wurde die Zellzyklusverteilung mittels eines Durchflusszytometers ermittelt. A; C: Gezeigt sind Zellzyklusverteilungen der unterschiedlichen Bedingungen und die quantitative Auswertung der Verteilung. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM in Prozent der gemessenen Gesamtzellzahl ($n = 3$, $N = 1$). B; D: Quantitative Auswertung der Anteile an Zellen in der SubG1- bzw. der G₂/M-Phase des Zellzyklus. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM relativ zur Kontrolle ($n = 3$, $N = 1$). Student's *t*-Test * $p \leq 0,05$; One-way ANOVA # $p \leq 0,05$. Cis: Cisplatin; Doxo: Doxorubicin; IQ: *5-epi-Illimaquinone*, Kon: Kontrolle; NQ: *5-epi-Nakijiquinone* Q; SA: *Secalonic acid* F. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.9 des Anhangs zu entnehmen.

SU.86.86 (24 h)



SU.86.86 (72 h)

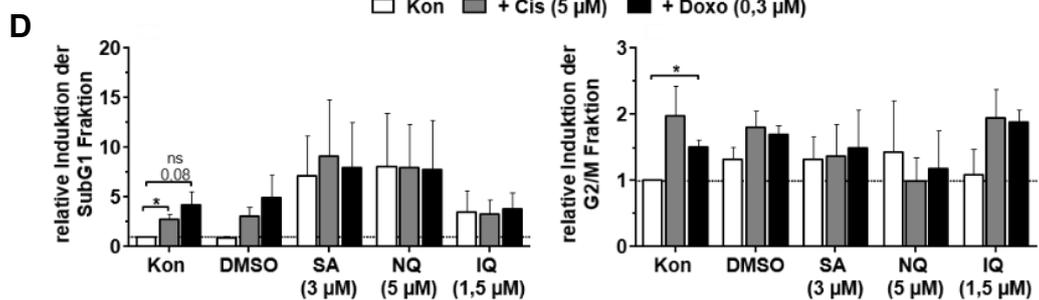
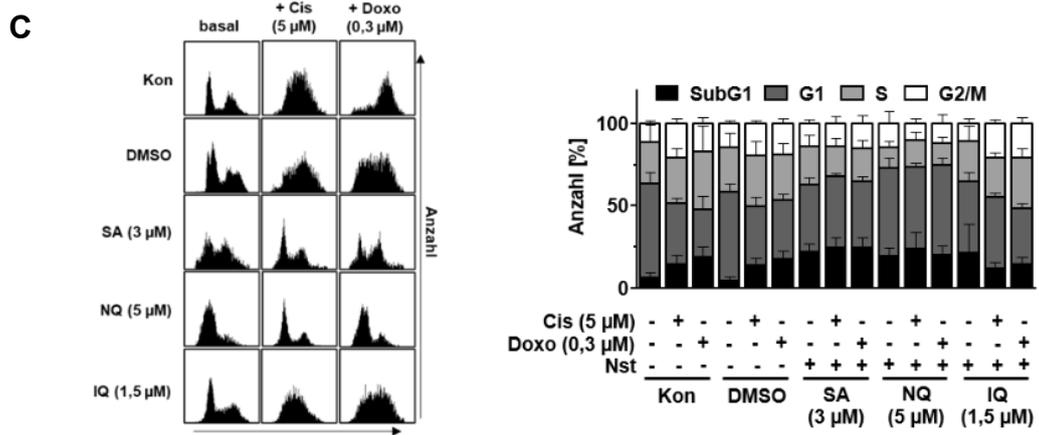


Abbildung 3.10: Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses von ausgewählten Naturstoffen und Zytostatika (Mono- und Kombinationsbehandlung) auf die Zellzyklusverteilung von SU.86.86-Zellen.

SU.86.86-Zellen wurden für 24 (A; B) und 72 h (C; D) mit einer Konzentration im Bereich der IC_{50} der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 μ M (Cis) oder 0,3 μ M Doxorubicin (Doxo) behandelt. Anschließend wurde die Zellzyklusverteilung mittels eines Durchflusszytometers ermittelt. A; C: Gezeigt sind Zellzyklusverteilungen der unterschiedlichen Bedingungen und die quantitative Auswertung der Verteilung. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM in Prozent der gemessenen Gesamtzellzahl ($n = 3$, $N = 1$). B; D: Quantitative Auswertung der Anteile an Zellen in der SubG1- bzw. der G_2/M -Phase des Zellzyklus. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM relativ zur Kontrolle ($n = 3$, $N = 1$). Student's *t*-Test * $p \leq 0,05$; One-way ANOVA # $p \leq 0,05$. Cis: Cisplatin; Doxo: Doxorubicin; IQ: 5-*epi*-Ilimaquinone, Kon: Kontrolle; NQ: 5-*epi*-Nakijiquinone Q; SA: Secalonic acid F. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.10 des Anhangs zu entnehmen.

Darüber hinaus sollte in weiteren Untersuchungen analysiert werden, ob die durch die Naturstoffe ausgelösten Effekte durch unterschiedliche Auswirkungen auf den Zellzyklus hervorgerufen werden. Um den Einfluss der Naturstoffe auf die Proliferationsaktivität zu untersuchen, wurde diese mittels immunzytochemischer Färbung nach 24-stündiger Mono- bzw. Kombinationsbehandlung untersucht. Der mitotische Index wurde als Indikator für die Proliferationsaktivität durch eine Färbung des für mitotische Zellen spezifischen Markers, phospho-Histon 3 (pH3), bestimmt (Abbildung 3.11). Im Vergleich zur Kontrolle verdreifacht sich der Anteil der pH3-positiven Zellen nach der Behandlung von SU.86.86-Zellen mit SA. Eine NQ-Monobehandlung von BxPC3-Zellen resultiert in einer Halbierung der Anzahl an Zellen, die sich im Mitosestadium befinden. Eine Monobehandlung mit Cis führt in BxPC3-Zellen ebenfalls zu einer Reduktion der pH3-positiven Zellen um mehr als 50 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dieser durch eine Cis-Behandlung ausgelöste Effekt wird in einer Kombinationsbehandlung von keinem der untersuchten Naturstoffe beeinflusst. Die Ergebnisse einer Doxo-Monobehandlung zeigen einen zelltypspezifischen Effekt auf den Anteil der mitotischen Zellen. In BxPC3-Zellen bewirkt die Monobehandlung eine Abnahme der Anzahl an in der Mitose befindlichen Zellen, wohingegen in SU.86.86-Zellen der Mitose-Index ansteigt. Im Vergleich zur Doxo-Monobehandlung verursacht eine kombinierte Behandlung aus NQ und Doxo in BxPC3-Zellen eine stärkere Reduktion der pH3-positiven Zellen. In SU.86.86-Zellen kommt es bei diesen Kombinationsbehandlungen zu keiner Modulation.

Aus diesen Daten ist abzuleiten, dass sich SU.86.86-Zellen durch die Monobehandlung mit SA häufiger in der Mitosephase befinden. Jedoch kann sich dieser Effekt in der Kombinationsbehandlung nicht durchsetzen. Durch die Behandlung mit NQ verringert sich die Anzahl an Zellen in der Mitose in BxPC3-Zellen, was ebenfalls in der Kombination mit Doxo sichtbar wird. IQ hat weder in der Mono- noch in der Kombinationsbehandlung einen Einfluss auf die sich in der Mitose befindlichen Zellen.

Durch die Analyse des mitotischen Index können die durchflusszytometrischen Untersuchungen ergänzt werden (Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10). Es ist davon auszugehen, dass SA in der Monobehandlung zu einer erhöhten Proliferationsaktivität und dadurch möglicherweise auch zu einer erhöhten Apoptoserate führt. Jedoch scheint es so, dass dieser Effekt von SA in der Kombination mit den verwendeten Zytostatika nicht der Grund für den vermehrten Zelltod ist. Durch die Behandlung mit dem Naturstoff NQ nimmt die Anzahl der in der Mitose befindlichen Zellen ab, sodass zu vermuten, dass NQ möglicherweise eine Verlangsamung des Zellzyklus bedingt. Dies könnte ein Grund für die Abnahme der Zelltod auslösenden Wirkung in der Kombination mit Doxo sein, da die Zytotoxizität dieses Zytostatikums abhängig von der Proliferationsgeschwindigkeit ist.

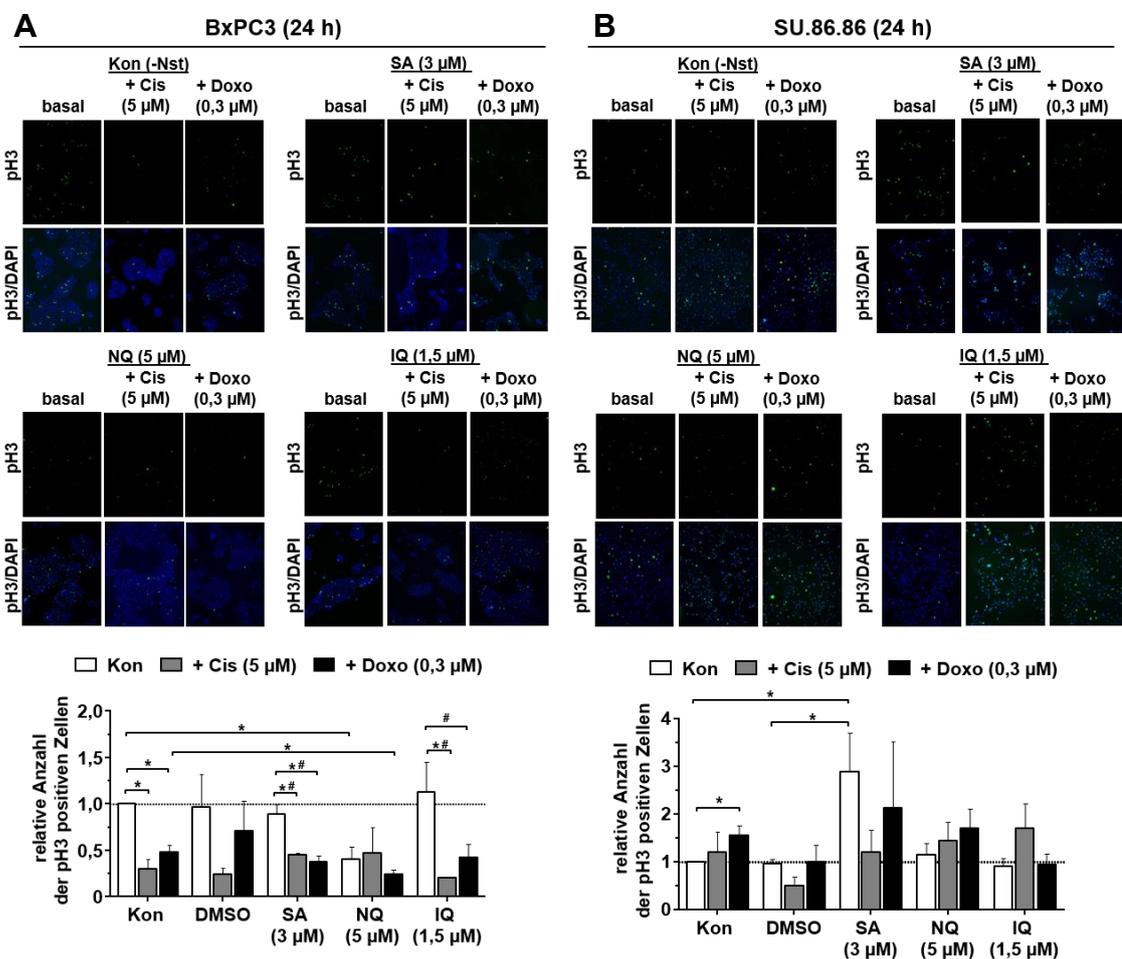


Abbildung 3.11: Einfluss der ausgewählten Naturstoffe und Zytostatika (Mono- und Kombinationsbehandlung) auf die mitotische Aktivität von Pankreaskarzinomzellen.

BxPC3- (A) und SU.86.86 (B)-Zellen wurden für 24 h mit einer Konzentration im Bereich der IC_{50} der ausgewählten Naturstoffe allein (basal) oder in Kombination mit 5 µM Cisplatin (Cis) oder 0,3 µM Doxorubicin (Doxo) behandelt. Anschließend wurde die Anzahl an phospho-Histon 3 (pH3)-positiven Zellen nach immunzytochemischer Färbung bestimmt. Dargestellt sind exemplarische Fluoreszenzaufnahmen sowie die quantitative Auswertung. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM relativ zur unbehandelten Kontrolle (= 1,0) (n = 3, N = 1). Student's *t*-Test **p* ≤ 0,05; One-way ANOVA #*p* ≤ 0,05. DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol; IQ: 5-*epi*-lismaquinone, Kon: Kontrolle; NQ: 5-*epi*-Nakijiquinone Q; Nst: Naturstoff; SA: *Secalonic acid F*. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.11 des Anhangs zu entnehmen.

3.5 Induktion von apoptotischem Zelltod

Um die molekularen Mechanismen des Zelltods, die zu den Unterschieden in der Vitalität der Pankreaskarzinomzellen nach Behandlung mit den Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cis bzw. Doxo führen, näher zu untersuchen, wurde der Zelltodmechanismus der Apoptose genauer betrachtet. Dazu wurde der Einfluss der Behandlungen auf die Aktivierung, d.h. auf die Spaltung der Vorläuferformen der Effektorcaspasen 3 und 7, die sowohl über den intrinsischen als auch über den extrinsischen Weg erfolgen kann, zunächst mittels Western Blot-Analysen untersucht (Abbildung 3.12 (A; C) und Abbildung 3.13 (A; C)). In beiden Zelllinien ist nach einer 24- ebenso wie nach einer 72-stündigen Behandlung mit SA eine vermehrte Menge der jeweiligen gespaltenen Form der Caspasen 3 und 7 detektierbar. In SU.86.86-Zellen bewirkt eine Behandlung mit NQ nach 72 h zu einer Aktivierung der beiden Caspasen, während nach 24 h lediglich Caspase 7 aktiviert wird. Eine Monobehandlung von BxPC3- und SU.86.86-Zellen mit Cis zieht nach einer Behandlungsdauer von 72 h eine Spaltung der Caspasen in deren aktivierte Form nach sich, die nach 24 h noch nicht erfolgt. Die Aktivierung der Caspasen wird durch eine Kombination aus SA und Cis im Vergleich zur Cis-Monobehandlung nach 24 h ebenso wie nach 72 h verstärkt. Dies gilt für BxPC3-Zellen und für SU.86.86-Zellen. In BxPC3-Zellen hat eine Kombinationsbehandlung von NQ und Cis nur einen geringen Einfluss auf die von Cis- ausgelöste Spaltung der Caspasen. Es zeigt sich sogar eine geringe Reduktion der Aktivierung im Vergleich zur Cis-Monobehandlung nach 72 h. In SU.86.86-Zellen hingegen resultiert eine Kombinationsbehandlung aus NQ und Cis und einer Behandlungsdauer von 24 h in einer vermehrten Spaltung beider Caspasen im Vergleich zur Behandlung mit Cis allein. Die Menge der aktivierten Form der Caspase 7 ist nach einer 72-stündigen Behandlung mit NQ und Cis leicht erhöht. Eine 72-stündige Kombinationsbehandlung aus IQ und Cis bewirkt einen leichten Anstieg der Menge an aktivierter Caspase 7 in BxPC3-Zellen und eine leichte Abnahme dieser aktivierten Caspase in SU.86.86-Zellen. Eine Behandlung mit Doxo ruft in beiden Zelllinien nach 24-stündiger Behandlung keine Spaltung der Caspasen hervor. Im Unterschied dazu steht das Ergebnis einer 72-stündigen Monobehandlung mit Doxo, bei der eine Aktivierung der Caspasen 3 und 7 erfolgt. Die Spaltung der Caspasen 3 und 7 wird in der Kombination aus SA und Doxo genauso beeinflusst wie in der Kombination mit Cis. Durch eine Kombinationsbehandlung aus SA und Doxo kommt es im Vergleich zu einer Doxo-Monobehandlung folglich zu einer vermehrten Spaltung der Caspasen. Nach einer Behandlungsdauer von 72 h verursacht NQ eine leichte Abnahme der durch Doxo induzierten-Caspasenspaltung in BxPC3-Zellen, in SU.86.86-Zellen jedoch einen Anstieg. Eine Behandlung mit IQ hat den gegenteiligen Effekt und resultiert in der

Kombination mit Doxo nach 72 h in BxPC3-Zellen in einer vermehrten Aktivierung der Caspasen, in SU.86.86-Zellen aber in einer verringerten Aktivierung.

Zusätzlich zu diesen Western Blot-Analysen wurde die biochemische Aktivität der Caspasen 3 und 7 fluorimetrisch mit Hilfe des Apo-ONE[®]-Assays quantifiziert (Abbildung 3.12 (B; D) und Abbildung 3.13 (B; D)). Bei diesem Assay erfolgt eine Freisetzung des fluoreszierenden Farbstoffes Rhodamin 110, nachdem das Substrat Z-DEVD-Rhodamin 110 von den Caspasen 3 und 7 spezifisch gespalten wird. Die Intensität des freigesetzten Farbstoffes gilt als Maß der Caspasenaktivität. SA induziert in beiden Zelllinien nach einer Behandlungsdauer von 24 h sowie auch nach 72 h die Caspasenaktivität. Das Ergebnis der Monobehandlung mit NQ bzw. IQ zeigt einen spezifischen Einfluss auf die Aktivität der Caspasen in SU.86.86-Zellen. Es zeichnet sich ein Anstieg der Caspasenaktivität nach 24-stündiger NQ-Monobehandlung ab, wohingegen eine 72-stündige IQ-Monobehandlung die Aktivität reduziert. Durch die Behandlung mit Cis wird die Aktivität der Caspasen in beiden Zelllinien nach einer Behandlungsdauer von 72 h erhöht. Verglichen mit der Cis-Monobehandlung steigert eine 24-stündige Kombinationsbehandlung aus SA und Cis die Caspasenaktivität in BxPC3- und SU.86.86-Zellen. Daneben kann ebenfalls eine Steigerung der Caspasenaktivität nach einer Kombinationsbehandlung aus NQ und Cis detektiert werden. Dies ist sowohl nach 24 h als auch nach 72 h in beiden Zelllinien zu beobachten. Eine Behandlung mit Doxo führt nach einer Behandlungsdauer von 72 h zu einer gesteigerten Caspasenaktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Aktivität der Caspasen wird durch eine 24-stündige Kombinationsbehandlung aus SA und Doxo, relativ zur Doxo-Monobehandlung, potenziert. In BxPC3-Zellen tritt nach 72 h eine Abnahme der Aktivität auf, verglichen mit Doxo allein. NQ bzw. IQ übt in der Kombination mit Doxo in beiden Zelllinien ähnliche Effekte auf die durch Doxo gesteigerte Caspasenaktivität aus. NQ zieht nach einer Behandlungsdauer von 24 h eine gesteigerte Aktivität nach sich, wohingegen nach 72 h eine verminderte Aktivität ermittelt wurde. Die Untersuchungen der Kombinationsbehandlung aus IQ und Doxo lassen erkennen, dass nach 72-stündiger Behandlung eine reduzierte Caspasenaktivität im Vergleich zu einer Doxo-Monobehandlung zu verzeichnen ist.

Mit Hilfe dieser beiden Analysen wurden die Spaltung der Vorläuferformen der Effektorcaspasen 3 und 7 sowie deren biochemische Aktivität untersucht. SA ist sowohl in der Mono- als auch in der Kombinationsbehandlung mit Cis bzw. Doxo in der Lage, die Spaltung der Caspasen und die Aktivität dieser zu steigern. Dies deutet auf eine vermehrte Aktivierung der apoptotischen Prozesse durch SA hin. Darüber hinaus zeigt

eine Behandlung mit NQ in der Kombination mit Cis nach einer Behandlungsdauer von 72 h eine erhöhte Aktivität der Caspasen, wobei keine vermehrte Spaltung der Caspasen auftritt. IQ scheint die Aktivität der Caspasen nach 72-stündiger Kombinationsbehandlung mit Doxo zu reduzieren, weist jedoch nur einen geringen Einfluss auf die Spaltung der Caspasen auf. Die Resultate der Western Blot-Analysen der Caspasenaktivierung und der biochemischen Untersuchung der Caspasenaktivität bestätigen, dass die Naturstoffe verschiedene apoptotische Mechanismen unterschiedlich stark beeinflussen.

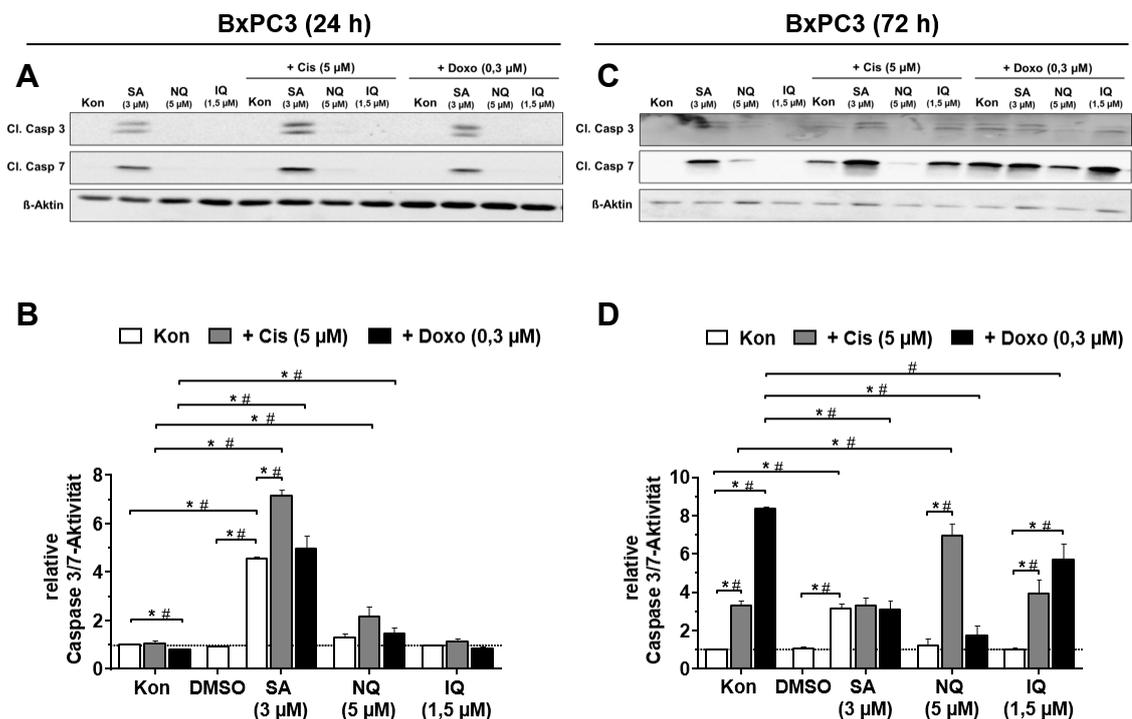


Abbildung 3.12: Analyse der Aktivierung und Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 in BxPC3-Zellen.

BxPC3-Zellen wurden für 24 h (A, B) bzw. 72 h (C, D) mit einer Konzentration im Bereich der IC_{50} der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 μ M Cisplatin (Cis) oder 0,3 μ M Doxorubicin (Doxo) behandelt. A, C: Die Caspasenaktivierung wurde mittels Western Blot-Analysen anhand des Nachweises der gespaltenen aktiven Caspasen (cl. Casp 3 und cl. Casp 7) bestimmt. Die Expression des Zytoskelettproteins β -Aktin dient als Ladekontrolle. C, D: Mittels Apo-ONE[®]-Assay wurde die Caspasenaktivität fluorimetrisch bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM als Vielfaches der Kontrolle (= 1,0) (n = 3, N = 4). Student's *t*-Test * $p \leq 0,05$; One-way ANOVA # $p \leq 0,05$. IQ: 5-*epi*-Ilimaquinone, Kon: Kontrolle; NQ: 5-*epi*-Nakijiquinone Q; Nst: Naturstoff; SA: Secalonic acid F. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.12 des Anhangs zu entnehmen.

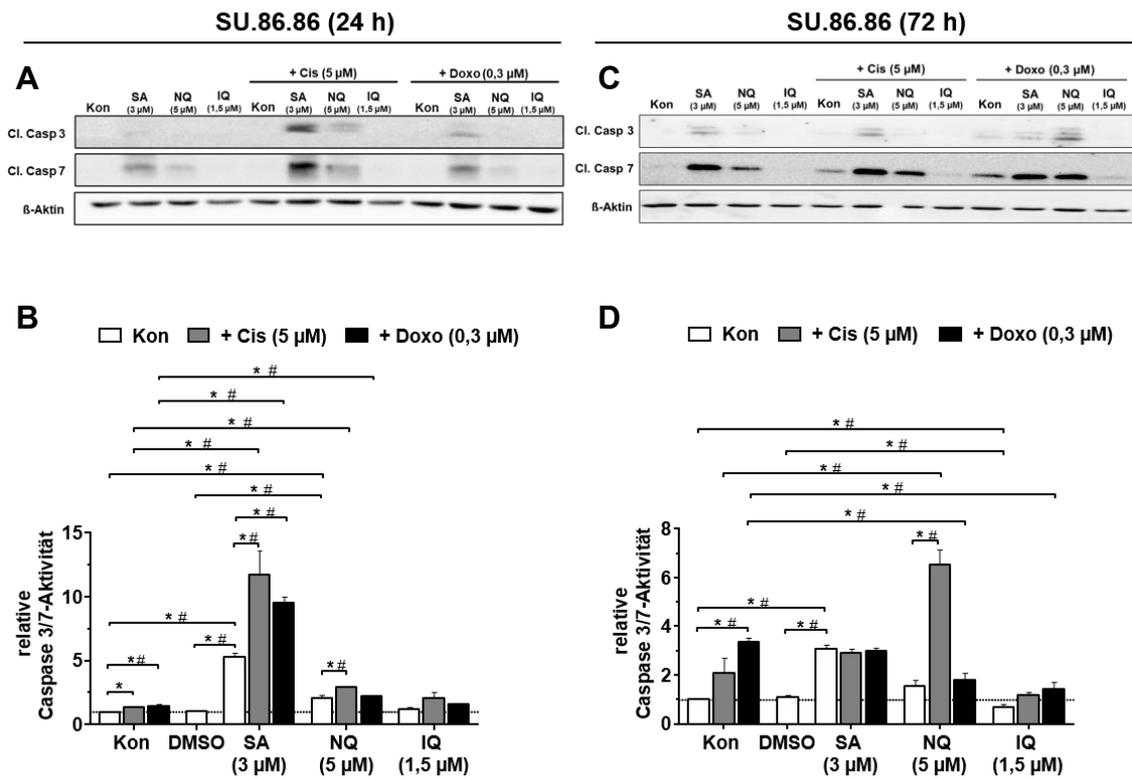


Abbildung 3.13: Analyse der Aktivierung und Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 in SU.86.86-Zellen.

SU.86.86-Zellen wurden für 24 h (A, B) bzw. 72 h (C, D) mit einer Konzentration im Bereich der IC_{50} der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 μ M Cisplatin (Cis) oder 0,3 μ M Doxorubicin (Doxo) behandelt. A, C: Die Caspasenaktivierung wurde mittels Western Blot-Analysen anhand des Nachweises der gespaltenen aktiven Caspasen (cl. Casp 3 und cl. Casp 7) bestimmt. Die Expression des Zytoskelettproteins β -Aktin dient als Ladekontrolle. C, D: Mittels Apo-ONE[®]-Assay wurde die Caspasenaktivität fluorimetrisch bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM als Vielfaches der Kontrolle (= 1,0) (n = 3, N = 4). Student's *t*-Test * $p \leq 0,05$; One-way ANOVA # $p \leq 0,05$. IQ: 5-*epi*-Ilimaquinone, Kon: Kontrolle; NQ: 5-*epi*-Nakijiquinone Q; Nst: Naturstoff; SA: Secalonic acid F. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.13 des Anhangs zu entnehmen.

3.6 Antioxidatives Potenzial ausgewählter Naturstoffe

Eine nähere Charakterisierung der Naturstoffe wurde durch die Bestimmung des antioxidative Potenzials, also die Fähigkeit freie Radikale abzubauen, mit Hilfe des TEAC-Assays ermöglicht. Eine Behandlung mit den beiden getesteten Zytostatika bringt bekannterweise eine vermehrte Bildung von ROS mit sich. Mittels des TEAC-Assays sollte daher untersucht werden, ob die durch die Naturstoffe ausgelösten Effekte möglicherweise auf eine Interaktion mit dem Antioxidanzsystem beruhen. Bei dem TEAC-Assay wird der durch eine antioxidativ wirkende Substanz hervorgerufene Farbverlust von Diammonium-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonat (ABTS) bzw. des Radikalkations untersucht. Als Referenzwert dient Trolox. Es zeigt sich, dass kein Naturstoff so stark antioxidativ wie Trolox wirkt. SA ist jedoch antioxidativer als DMSO (Abbildung 3.14). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die zuvor sichtbaren Effekte nicht auf die antioxidative Kapazität der getesteten Naturstoffe zurückzuführen ist.

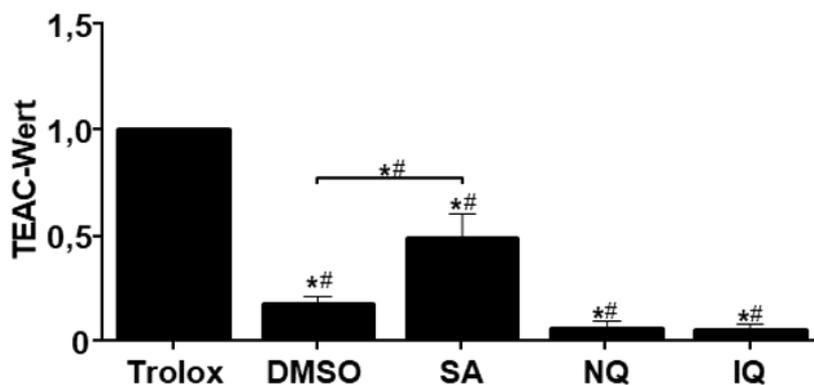


Abbildung 3.14: Antioxidatives Potenzial der ausgewählten Naturstoffe.

Das antioxidative Potenzial der Naturstoffe wurde über den zellfreien *Trolox Equivalent Antioxidative Capacity* (TEAC)-Assay bestimmt. Dazu wurden die Naturstoffe verdünnt (0; 0,5; 1; 1,5; 3 und 5 μM) und zu der Arbeitslösung aus ABTS und APS gegeben. Die Abnahme der Absorption, die auf der Reaktion der Substanzen mit dem grünen Radikalkation beruht, wurde bei einer Wellenlänge von 734 nm gemessen. Das Ergebnis der Absorptionsmessung wird der Konzentration des Naturstoffes bzw. der Referenzsubstanz zugeordnet. Der TEAC-Wert ergibt sich aus dem Verhältnis zwischen der Steigung der zu untersuchenden Substanz und der Steigung der Referenzsubstanz Trolox. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM aus drei unabhängigen Versuchen. Student's *t*-Test * $p \leq 0,05$; One-way ANOVA # $p \leq 0,05$. ABTS: Diammonium-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonat, APS: Ammoniumpersulfat; IQ: 5-*epi*-Iliquinone; NQ: 5-*epi*-Nakijiquinone Q; SA: *Secalonic acid F*. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.14 des Anhangs zu entnehmen.

3.7 Einfluss der Naturstoffe auf den Im- und Export der Zytostatika

Häufig tritt eine Resistenz gegenüber Zytostatika durch eine Modulation der Transportmechanismen in den Zellen auf. Um zu überprüfen, ob die bisherigen Ergebnisse auf eine Beeinflussung des Zytostatikaim- und -exports oder auf eine Modulation der DNA-Addukt-Formation zurückzuführen sind, wurde dies im Folgenden mittels Durchflusszytometrie und Southwestern Blot-Analysen und untersucht. Die Cis-(1,2-GpG)-Intrastrangverknüpfungen sind die für die Toxizität der Platinverbindungen relevantesten DNA-Addukte (Pinto *et al.*, 1985). Diese wurden in den Pankreaskarzinomzellen mit Hilfe von Southwestern Blot-Analysen unter der Verwendung eines Cis-DNA-Addukt-spezifischen Antikörpers erforscht. Dazu wurden die Zellen für 24 h mit dem Naturstoff allein bzw. mit dem Naturstoff in Kombination mit Cis behandelt und anschließend die Menge an Cis-(1,2-GpG)-Intrastrangverknüpfungen analysiert (Abbildung 3.15). Es zeigt sich, dass in SU.86.86-Zellen in der Kombination mit SA mehr Cis-(1,2-GpG)-Intrastrangverknüpfungen auftreten. Diese Beobachtung ist tendenziell ebenfalls in BxPC3-Zellen zu sehen. Darüber hinaus bewirkt die Kombinationsbehandlung aus NQ und Cis in beiden Zelllinien eine tendenziell erhöhte Menge an Verknüpfungen. Resümierend lässt sich sagen, dass die Anzahl der Cis-(1,2-GpG)-Intrastrangverknüpfungen durch SA und NQ erhöht wird, was die erhöhte Proteinmenge an γ H2AX erklären könnte (Abbildung 3.2 und Abbildung 3.3). Bei einer erhöhten Menge an Verknüpfungen wäre jedoch auch eine vermehrte Anzahl an nukleären γ H2AX-Foci zu erwarten, die jedoch nicht detektiert wurden (Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5). Dies gibt Hinweise darauf, dass SA und NQ möglicherweise die Schadenserkenkung bzw. -prozessierung beeinflussen.

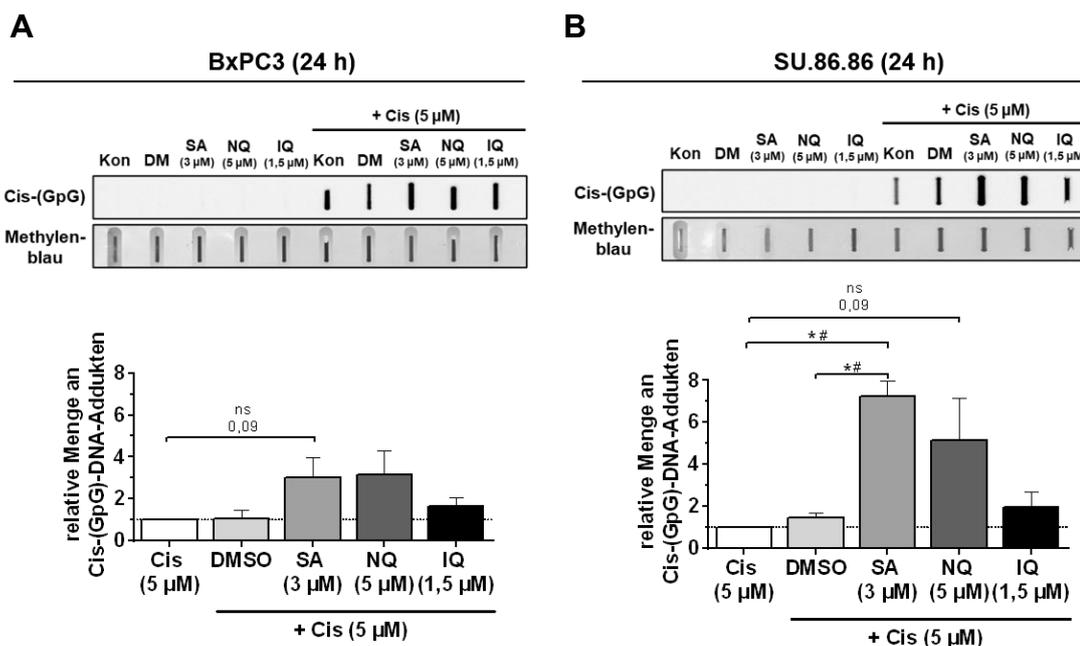


Abbildung 3.15: Einfluss der Naturstoffe auf die Cisplatin-induzierte Bildung von Cis-(1,2-GpG)-Intrastrangverknüpfungen.

BxPC3-Zellen (A) und SU.86.86-Zellen (B) wurden für 24 h in Ab- oder Anwesenheit von Cisplatin (Cis) mit den Naturstoffen behandelt. Anschließend wurde die Menge an Cis-(1,2-GpG)-DNA-Intrastrangverknüpfungen mit Southwestern Blot-Analysen untersucht. Es erfolgte eine densitometrische Auswertung der Blots und die Signalintensität wurde auf die Methylenblaufärbung als Maß für die Gesamt-DNA-Menge bezogen wie in den Methoden erläutert. Gezeigt sind exemplarische Southwestern-Blots oben sowie Mittelwerte + SEM relativ zur Cis-Monobehandlung (= 1,0) (n = 3; N = 1). Student's *t*-Test **p* ≤ 0,05; One-way ANOVA #*p* ≤ 0,05. Cis: Cisplatin; IQ: 5-*epi*-Iliquinone, NQ: 5-*epi*-Nakijiquinone Q; SA: *Secalonic acid F*. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.15 des Anhangs zu entnehmen.

Ob die Naturstoffe einen Einfluss auf die Menge an intrazellulärem Doxo haben, wurde mittels Durchflusszytometrie in SU.86.86-Zellen untersucht. Dazu wurde die für Doxo kennzeichnende inhärente Fluoreszenz (λ_{ex} 470 nm; λ_{em} 585 nm) genutzt. Die Zellen wurden für 24 h mit dem Naturstoff allein oder in Kombination mit Doxo behandelt. Anschließend wurde die Menge an intrazellulärem Doxo unmittelbar bzw. nach einer 4-stündigen Post-Inkubation in Abwesenheit von Doxo bestimmt, um sowohl den Import als auch den Export zu berücksichtigen. Es zeigt sich, dass keiner der untersuchten Naturstoffe den Import bzw. den Export von Doxo beeinflusst (Abbildung 3.16). Daraus ergibt sich, dass die in den bisherigen Experimenten detektierten Effekte nicht auf eine Modulation der beteiligten Transportmechanismen zurückzuführen sind.

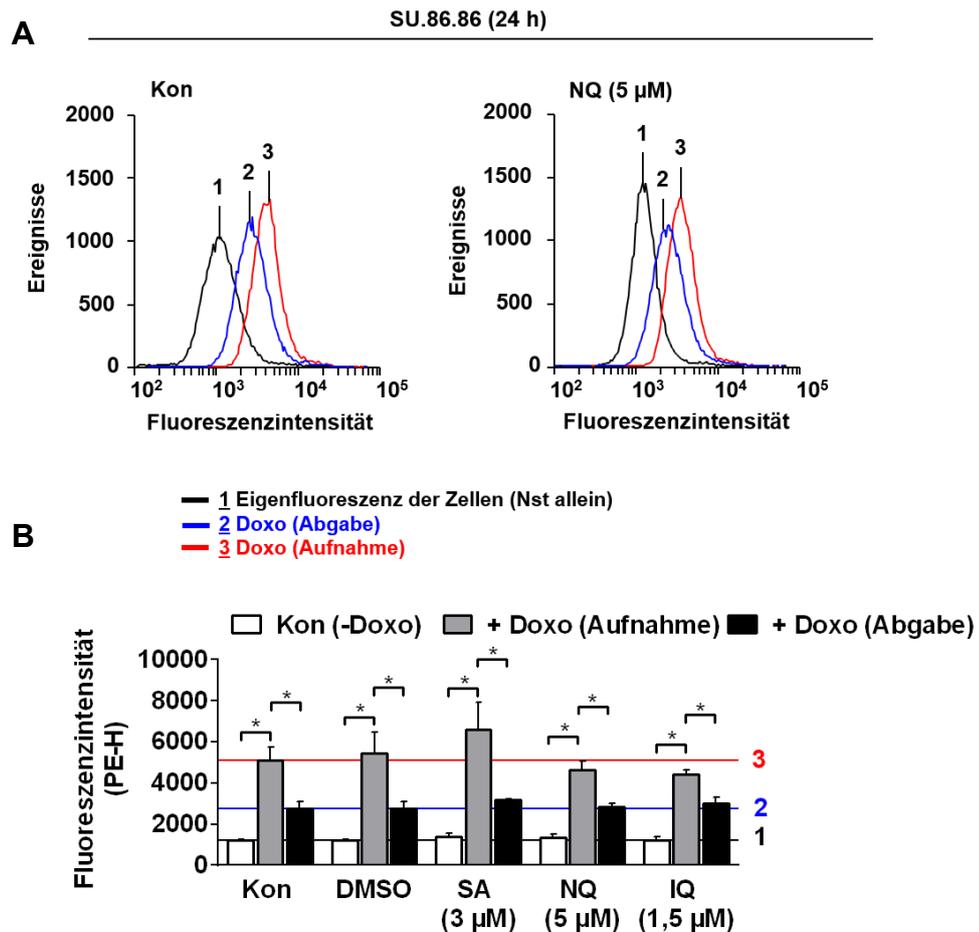


Abbildung 3.16: Einfluss der Naturstoffe auf die intrazelluläre Konzentration von Doxorubicin in SU.86.86-Zellen. SU.86.86-Zellen wurden für 24 h mit dem Naturstoff (Nst) allein oder in Kombination mit Doxorubicin (Doxo) behandelt. Anschließend wurde direkt oder nach 4 h Post-Inkubation in Abwesenheit von Doxo die intrazelluläre Doxo-Konzentration mittels Durchflusszytometrie analysiert. A: Repräsentative Daten der Analyse für die Kontrolle (Kon) (links) und *5-epi-Nakijiquinone* Q (NQ) (rechts) zeigen die Eigenfluoreszenz der Zellen bzw. des Nst (1), die Menge an intrazellulärem Doxo unmittelbar nach der Behandlung (3) und die Konzentration an Doxo in der Zelle nach einer Postinkubation von 4 h (2). B: Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität als Mittelwert + SEM (n = 3; N = 1). Student's *t*-Test *p ≤ 0,05; One-way ANOVA #p ≤ 0,05. Doxo: Doxorubicin; IQ: *5-epi-Illimaquinone*; SA: *Secalonic acid F*. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.16 des Anhangs zu entnehmen.

3.8 Charakterisierung der ausgewählten Naturstoffe in Tumorzellen verschiedener Herkunft und in Nicht-Tumorzellen

Die bisherigen Analysen erfolgten ausschließlich in Pankreaskarzinomzellen. Zur Untersuchung, ob der Einfluss der Naturstoffe auf andere Tumorentitäten und auf Normalgewebe mit den bisherigen Ergebnissen vergleichbar ist, wurden Experimente mit Tumorzellen verschiedener Herkunft und mit Nicht-Tumorzellen durchgeführt. Dies dient ebenfalls dazu, spezifische Effekte gegenüber den verschiedenen Entitäten herauszufinden.

3.8.1 Einfluss der Naturstoffe in Mono- bzw. Kombinationsbehandlung auf die Vitalität von Tumorzellen verschiedener Herkunft

Für die Bestimmung, ob SA, NQ und IQ auch in Tumorzellen verschiedener Herkunft zytotoxisch aktiv sind, wurden Vitalitätsuntersuchungen durchgeführt. Zunächst wurde mit Hilfe des Alamar Blue[®]-Assays bestimmt, welchen Einfluss die Naturstoffe auf die Vitalität der Kolonkarzinomzellen HT29 und HCT-116, der Lungenkarzinomzelllinie NCI-H1975 und der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 nach 72-stündiger Behandlung haben (Abbildung 3.17 und Tabelle 3.3). Die Grundlage für die Auswahl dieser Tumorzelllinien bzw. der zugrunde liegenden malignen Erkrankungen bildet die Behandlung mit platinierenden Agenzien oder Anthrazyklinen (Judson *et al.*, 2000; Ali *et al.*, 2013; Rivankar, 2014). SA zeigt in allen getesteten Zelllinien eine biologische Aktivität. Die IC₅₀-Werte liegen zwischen 3 und 5 µM für HT29-, HCT116- und NCI-H1975-Zellen. Einzig MDA-MB-231-Zellen sind weniger sensitiv gegenüber SA. Hier liegt die IC₅₀ bei ca. 35 µM. NQ weist für HCT116- und NCI-H1975-Zellen eine geringe IC₅₀ auf. Nach einer Behandlung mit IQ ist die IC₅₀ in den getesteten Zelllinien bei mehr als 20 µM. Bei dem Vergleich mit den Ergebnissen der Pankreaskarzinomzellen wird deutlich, dass SA in den Kolonkarzinomzellen HT29 und HCT-116 und in der Lungenkarzinomzelllinie NCI-H1975 zu ähnlichen IC₅₀ führt (Abbildung 3.1). Die Resultate der NQ-Monobehandlung belegen, dass dieser Naturstoff in den getesteten Pankreaskarzinomzellen und in den HCT116- und NCI-H1975-Zellen vergleichbare zytotoxische Effekte bedingt. Jedoch gibt es Unterschiede im Vergleich zu den HT29- und MDA-MB-231-Zellen. Darüber hinaus zeigt sich, dass IQ die Vitalität am effektivsten in den BxPC3- und SU.86.86-Zellen reduziert. Insgesamt weisen die Ergebnisse der Vitalitätsuntersuchungen darauf hin, dass die Beeinflussung der Vitalität durch die Naturstoffe Zelltyp-abhängig auftritt.

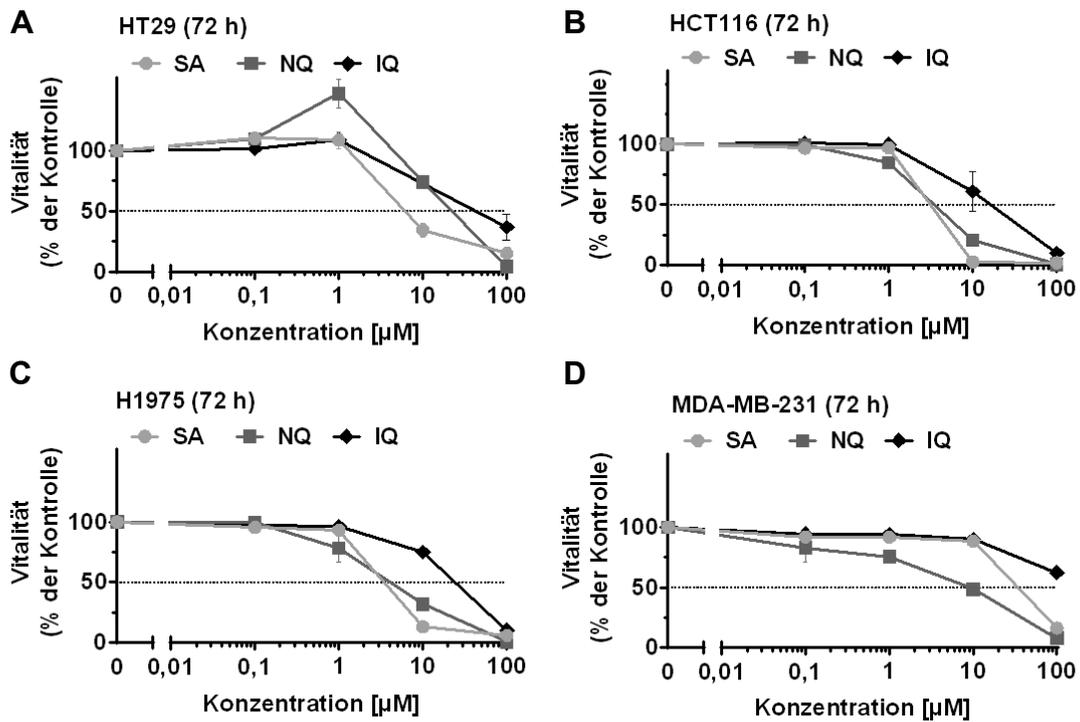


Abbildung 3.17: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf die Vitalität diverser Tumorzelllinien.

Für die Bestimmung der jeweiligen IC_{50} wurden diverse Tumorzellen für eine Behandlungsdauer von 72 h mit Konzentrationen zwischen 0,1 μM und 100 μM des jeweiligen Naturstoffes behandelt. Die Zugabe des Naturstoffes erfolgte 24 h nach der Aussaat. Die metabolische Aktivität der Zellen, die als Maß für die Vitalität dient, wurde mit dem Alamar Blue®-Assay bestimmt. Dargestellt sind die Dosis-Wirkungskurven für die einzelnen Zelllinien mit den drei ausgewählten Naturstoffen (*Secalonic acid F* (SA); *5-epi-Nakijiquinone Q* (NQ) und *5-epi-Illimaquinone* (IQ)). Abgebildet sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent der unbehandelten Kontrolle (= 100 %) (n=3; N=4). Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.17 des Anhangs zu entnehmen.

Tabelle 3.3: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf die Vitalität diverser Tumorzelllinien.

Für die Bestimmung der jeweiligen IC_{50} wurden diverse Tumorzellen für eine Behandlungsdauer von 72 h mit Konzentrationen zwischen 0,1 μ M und 100 μ M des jeweiligen Naturstoffes behandelt. Die Zugabe des Naturstoffes erfolgte 24 h nach der Aussaat. Die metabolische Aktivität der Zellen, welche als Maß für die Vitalität dient, wurde mit dem Alamar Blue® -Assay bestimmt. Dargestellt sind die gerundeten IC_{50} (n = 3; N = 4).

Zelllinie	IC_{50} [μ M]		
	SA	NQ	IQ
HT29	5	20	40
HCT-116	3	3	20
H1975	3	4	25
MDA-MB-231	35	10	n.d.

Um zu überprüfen, ob die Unterschiede in der Sensitivität der malignen Zellen gegenüber den Naturstoffen durch die Geschwindigkeit des Zellwachstums bedingt sind, wurde die Verdopplungszeit der einzelnen Zelllinien über Zellzahlzählung bestimmt (Tabelle 3.4). Es zeigt sich, dass die Sensitivität nicht mit der Verdopplungszeit korrespondiert. Demnach sind die zytotoxischen Effekte der Naturstoffe in den diversen Zelllinien zelltypspezifisch und nicht von der Geschwindigkeit des Zellwachstums abhängig.

Tabelle 3.4: Zusammenfassung der Wachstumsgeschwindigkeit diverser Tumorzellen.

Für die Bestimmung der Verdopplungszeit wurde die Zellzahl über Auszählung der ausgewählten Tumorzellen über einen Zeitraum von 96 h untersucht. Die Steigung der logarithmischen Trendlinie wurde zur Kalkulation der Verdopplungszeit genutzt. Es wird die Bezeichnung der Zelllinien, die Verdopplungszeit, die Herkunft und der Onkogenstatus zur besseren Charakterisierung der Zelllinien angegeben.

	Verdopplungszeit [h]	Herkunft	Onkogenstatus
BxPC3	32	Pankreas, human	<i>KRAS</i> WT
SU.86.86	44	Pankreas, human	<i>KRAS</i> mutiert
HT29	31	Kolon, human	<i>KRAS</i> WT
HCT-116	23	Kolon, human	<i>KRAS</i> mutiert
NCI-H1975	44	Lunge, human	<i>EGFR</i> mutiert (T790M)
MDA-MB-231	32	Brust, human	<i>ER-</i> , <i>PR-</i> , <i>HER2-</i>

3.8.2 Charakterisierung der ausgewählten Naturstoffe in Nicht-Tumorzellen

Bei der Behandlung mit herkömmlichen Zytostatika ist die fehlende Selektivität gegenüber den malignen Zellen ein häufiges Problem. Durch die Schädigung der Normalgewebszellen treten häufig unerwünschte Nebenwirkungen auf, die dosislimitierend für die Zytostatikabehandlung sind. Darüber hinaus stellt die Bioverfügbarkeit eine Herausforderung dar. Des Öfteren zeigen Substanzen, die in *in vitro* Untersuchungen vielversprechende Ergebnisse liefern, aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit *in vivo* bei der Behandlung von Tumoren keine signifikanten Effekte. Darüber hinaus spielt auch die Metabolisierung in der Leber eine entscheidende Rolle bei der Wirksamkeit von Substanzen. Diese Aspekte sollen im Folgenden berücksichtigt werden.

3.8.2.1 Einfluss von SA, NQ und IQ auf primäre humane Fibroblasten

Zur Testung, ob SA, NQ und IQ in einer Nicht-Tumorzelllinie genauso zytotoxisch aktiv sind wie in den getesteten Tumorzelllinien oder diese Substanzen selektiv auf maligne Zellen wirken, wurden zu Kontrollzwecken Vitalitätsuntersuchungen in primären humanen dermalen Fibroblasten (NHDF) durchgeführt. Mit Hilfe des Alamar Blue®-Assays wurde bestimmt, welchen Einfluss die Naturstoffe auf die Vitalität der NHDF bei einer 72-stündiger Behandlung haben (Abbildung 3.18 und Tabelle 3.5). Die IC_{50} für SA liegt bei 40 μ M, für NQ bei 5 μ M und für IQ bei 60 μ M. Im Vergleich zu den Ergebnissen der Tumorzellen (Abbildung 3.1 und Abbildung 3.17) ist die größte therapeutische Breite zwischen den getesteten Tumorzelllinien und den NHDF bei SA zu finden. Dies weist darauf hin, dass die Schädigung von Nicht-Tumorzellen bei einer Behandlung mit SA am geringsten ist. Um zu testen, ob die selektive Toxizität der Naturstoffe gegenüber den malignen Zellen durch die Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen bedingt ist, wurde die Verdopplungszeit der NHDF ebenfalls über Zellzahlzählung bestimmt (Tabelle 3.5). Es wird deutlich, dass die NHDF eine zu den SU.86.86- bzw. NCI-H1975-Zellen vergleichbare Proliferationsgeschwindigkeit aufweisen. Somit bestätigt auch diese Aussage, dass die zytotoxischen Effekte der Naturstoffe zelltypspezifisch und nicht von der Geschwindigkeit des Zellwachstums abhängig sind.

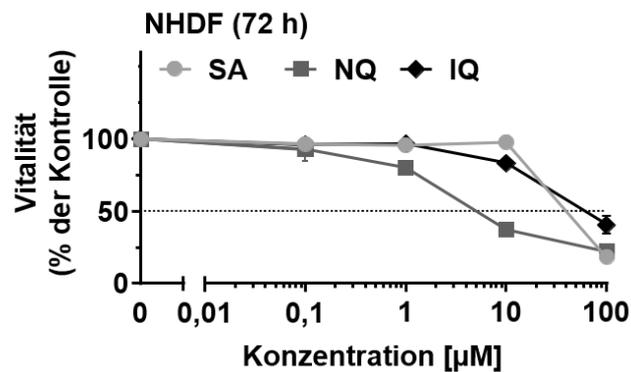


Abbildung 3.18: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf die Vitalität von primären humanen dermalen Fibroblasten.

Für die Bestimmung der jeweiligen IC_{50} wurden primäre humane dermale Fibroblasten (NHDF) für eine Behandlungsdauer von 72 h mit Konzentrationen zwischen 0,1 µM und 100 µM des jeweiligen Naturstoffes behandelt. Die Zugabe des Naturstoffes erfolgte 24 h nach der Aussaat. Die metabolische Aktivität der Zellen, die als Maß für die Vitalität dient, wurde mit dem Alamar Blue®-Assay bestimmt. Dargestellt ist die jeweilige Dosis-Wirkungskurve der drei ausgewählten Naturstoffe (*Secalonic acid F* (SA); *5-epi-Nakijiquinone Q* (NQ) und *5-epi-Illimaquinone* (IQ)). Abgebildet sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent der unbehandelten Kontrolle (= 100 %) ($n=3$; $N=4$). Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.17 des Anhangs zu entnehmen.

Tabelle 3.5: IC_{50} der getesteten Naturstoffe und Wachstumsgeschwindigkeit von primären humanen dermalen Fibroblasten.

Für die Bestimmung der jeweiligen IC_{50} wurden primäre humane dermale Fibroblasten (NHDF) für eine Behandlungsdauer von 72 h mit Konzentrationen zwischen 0,1 µM und 100 µM des jeweiligen Naturstoffes behandelt. Die Zugabe des Naturstoffes erfolgte 24 h nach der Aussaat. Die metabolische Aktivität der Zellen, die als Maß für die Vitalität dient, wurde mit dem Alamar Blue® -Assay bestimmt. Dargestellt sind die gerundeten IC_{50} ($n = 3$; $N = 4$). Für die Bestimmung der Verdopplungszeit wurde die Zellzahl über Auszählung der ausgewählten Tumorzellen über einen Zeitraum von 96 h untersucht. Die Steigung der logarithmischen Trendlinie wurde zur Kalkulation der Verdopplungszeit genutzt. Es wird die Bezeichnung der Zelllinien, die IC_{50} , die Verdopplungszeit und die Herkunft zur besseren Charakterisierung der Zelllinien angegeben.

Zelllinie	IC_{50} [µM]			Verdopplungszeit [h]	Herkunft
	SA	NQ	IQ		
NHDF	40	5	60	47	dermale Fibroblasten, human

Um zu überprüfen, welche Mechanismen hinter dem Vitalitätsverlust der Nicht-Tumorzelllinie nach Behandlung mit den Naturstoffen im Vergleich zu den zuvor genauer charakterisierten Pankreaskarzinomzellen stehen, wurden ausgewählte Experimente ebenfalls mit den NHDF durchgeführt. Ob der Einfluss der Naturstoffe auf die DDR der getesteten Pankreaskarzinomen und der NHDF unterschiedlich ist, wurde mit Hilfe von Western Blot-Analysen untersucht. Im Mittelpunkt der Analysen standen auch hier die Proteine, die durch ATM und ATR reguliert werden sowie die Aktivierung dieser Kinasen selbst. Für die Western Blot-Analysen wurden NHDF für 24 h mit den Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cis bzw. Doxo behandelt. Abbildung 3.19 zeigt das spezifische Ergebnis des Blots. Eine Behandlung mit SA führt zu einer vermehrten Phosphorylierung von ATM sowie von H2AX. Die Menge der Proteine pATR, pKAP1, pCHK1, pRPA32 und γ H2AX wird durch eine Monobehandlung mit NQ gesteigert. IQ hingegen verstärkt die Phosphorylierung von ATM und CHK1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Um die DDR zu aktivieren, wurden die Zellen mit 5 μ M Cis behandelt. Diese Behandlung führt zu einer Zunahme von u. a. pCHK1, pKAP1 und γ H2AX. Diese Cis-induzierte Schadensantwort wird durch die Naturstoffe selektiv beeinflusst. Im Vergleich zur Cis-Monobehandlung wird in der Kombinationsbehandlung mit SA die Menge an phosphoryliertem ATM, ATR, KAP1 und CHK1 erhöht. pATR, pKAP1, pCHK1, pRPA32 und auch γ H2AX treten zunehmend nach einer Behandlung mit NQ auf. Die Kombination aus Cis und IQ zeigt eine vermehrte Phosphorylierung von CHK1, aber die Menge an phosphoryliertem H2AX nimmt im Vergleich zu Cis allein ab. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle fördert die Behandlung mit Doxo die Phosphorylierung aller untersuchter Proteine der DDR, außer ATM. SA bewirkt in der Kombinationsbehandlung mit Doxo eine verminderte Phosphorylierung von ATR im Vergleich zu Doxo allein. NQ hingegen führt in der Kombinationsbehandlung mit Doxo zu einer erhöhten Menge von pATR, pRPA32 und γ H2AX. Die Phosphorylierung von p53 und H2AX wird durch eine Kombinationsbehandlung aus IQ und Doxo im Vergleich zur Doxo-Monobehandlung verringert. Die Ergebnisse der Western Blot-Analyse sind in der Tabelle 3.6 zusammengefasst. Insgesamt zeigt sich, dass, im Vergleich zu den Pankreaskarzinomzellen, in den NHDF unterschiedliche Proteine der DDR durch die Naturstoffe beeinflusst werden (Abbildung 3.7). Besonders auffällig ist bei diesem Vergleich die fehlende Potenzierung der Proteinmenge von γ H2AX in der Kombinationsbehandlung aus SA und Cis bzw. Doxo im Bezug zu der jeweiligen Zytostatika-Monobehandlung. Dies deutet auf eine geringere Aktivierung der DDR in NHDF hin. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass SA in der Kombination mit Cis vermehrt den ATR-CHK1-, aber auch den ATM-CHK2-Signalweg induziert. Die

Ergebnisse nach einer Behandlung mit NQ sind in den Pankreaskarzinomzellen und in den NHDF vergleichbar, weshalb auch in NHDF die Vermutung nahe liegt, dass dieser Naturstoff einen Einfluss auf den ATR-CHK1-Signalweg hat. IQ scheint in NHDF zu einer verminderten Aktivierung der DDR zu führen, da es zu einer geringeren Phosphorylierung von H2AX kommt. Diese Resultate geben Anhaltspunkte dafür, dass die zelltyp-spezifischen Unterschiede in der Vitalität durch unterschiedliche Beeinflussung der DDR begründet sein könnten.

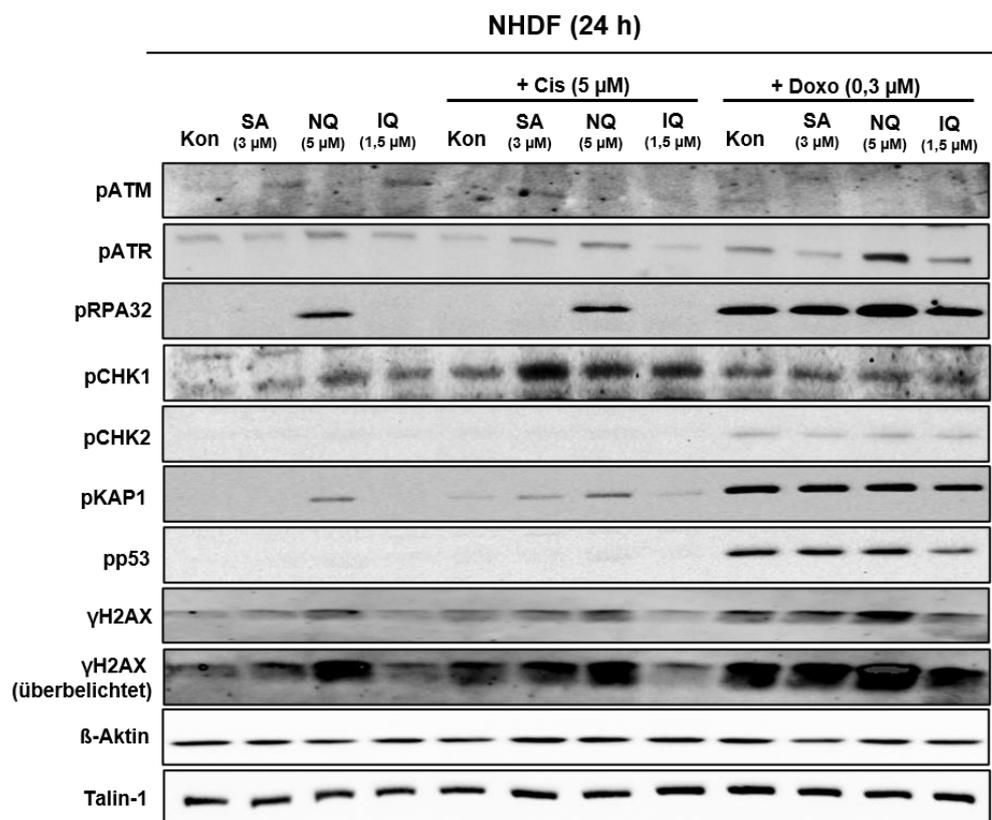


Abbildung 3.19: Western Blot-Analysen zur Erfassung der DNA-Schadensantwort (DDR) nach Behandlung mit ausgewählten Naturstoffen und Zytostatika in NHDF.

Für die Western Blot-Analysen wurden NHDF für 24 h mit einer Konzentration im Bereich der IC_{50} der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 μ M Cisplatin (Cis) oder 0,3 μ M Doxorubicin (Doxo) behandelt. Mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern wurde der Aktivierungsstatus der DDR untersucht. Die Expression des Zytoskelettproteins β -Aktin und Talin-1 dienen als Ladekontrolle. ATM: *ataxia telangiectasia mutated*; ATR: *ataxia telangiectasia and RAD3 related*; CHK: Checkpointkinase; IQ: *5-epi-Illimaquinone*; KAP1: *KRAB-associated protein 1*; NQ: *5-epi-Nakijiquinone*; p: phospho-; P53: Tumorsuppressorprotein; RPA32: Replikationsprotein A2, 32 kDa Untereinheit; SA: *Secalonic acid F*.

Tabelle 3.6: Zusammenfassung der Resultate der Western Blot-Analysen zur Charakterisierung des Einflusses von ausgewählten Naturstoffen auf die DNA-Schadensantwort (DDR).

Für die Western Blot-Analysen wurden NHDF für 24 h mit einer Konzentration im Bereich der IC₅₀ der ausgewählten Naturstoffe allein (basal) oder in Kombination mit 5 µM Cisplatin (Cis) oder 0,3 µM Doxorubicin (Doxo) behandelt. Mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern wurde der Aktivierungsstatus der DDR untersucht. Dargestellt ist das unterschiedliche Ausmaß der Aktivierung der an der DDR beteiligten Proteine im Vergleich zur Kontrolle bzw. zu Cis oder Doxo (Abbildung 3.19). 0: kein Effekt; +/-: moderater Effekt; ++/- -: starker Effekt; +++/- -: sehr starker Effekt. ATM: *ataxia telangiectasia mutated*; ATR: *ataxia telangiectasia and RAD3 related*; CHK: Checkpointkinase; IQ: *5-epi-Illiciquinone*; KAP1: *KRAB-associated protein 1*; NQ: *5-epi-Nakijiquinone Q*; p: phospho-; P53: Tumorsuppressorprotein; RPA32: Replikationsprotein A2, 32 kDa Untereinheit; SA: *Secalonic acid F*.

	SA			NQ			IQ		
	basal	+Cis	+Doxo	basal	+Cis	+Doxo	basal	+Cis	+Doxo
pATM	+	+	0	0	0	0	+	0	0
pATR	0	+	-	+	+	+	0	0	0
pRPA32	0	0	0	+	+	+	0	0	0
pCHK1	0	+	0	+	+	0	+	+	0
pCHK2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pKAP1	0	+	0	+	++	0	0	0	0
pP53	0	0	0	0	0	0	0	0	-
γH2AX	+	0	0	+	+	+	0	-	-

Um die Art der DNA-Schäden, die zu einer Aktivierung der DDR führen, auch in NHDF aufzuklären, wurde die Ausbildung von DSBs nach dem bekannten Behandlungsschema untersucht. Dazu wurde die Anzahl an nukleären γH2AX-, 53BP1- und pATM-Foci nach 24-stündiger Behandlung mittels immunzytochemischer Färbungen dieser Proteine bestimmt (Abbildung 3.20). Darüber hinaus wurde die Anzahl der kolokalisierten γH2AX/53BP1- und der kolokalisierten γH2AX/pATM-Foci als Indikator für DSBs betrachtet (Abbildung 8.16 und Abbildung 8.17 des Anhangs). Es zeigt sich, dass sowohl SA als auch NQ in einer Monobehandlung dazu in der Lage sind, die Anzahl an nukleären γH2AX-Foci signifikant zu erhöhen.

Eine Behandlung mit dem Zytostatikum Cis führt zu einem Anstieg der γH2AX-Foci im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Diese Anzahl an Foci wird durch keine Kombinationsbehandlung mit den getesteten Naturstoffen beeinflusst. Nach einer 24-stündigen Monobehandlung mit Doxo ist eine vermehrte Bildung von γH2AX-Foci zu beobachten. Zusätzlich wird die Zahl der 53BP1-, der pATM-, sowie der kolokalisierten γH2AX/53BP1- und γH2AX/pATM-Foci durch die Behandlung mit Doxo erhöht. Bei einer

Kombinationsbehandlung aus NQ und Doxo wird die Anzahl der 53BP1-Foci und kolokalisierten γ H2AX/53BP1-Foci hingegen reduziert. Im Gegensatz dazu wird durch eine kombinierte Behandlung aus IQ und Doxo die durch Doxo hervorgerufene Anzahl an pATM-Foci durch IQ gesteigert. Diese Untersuchungen zeigen, dass die Naturstoffe in NHDF nicht in der Lage sind, die durch Cis-induzierte Formation von DSBs zu beeinflussen, was im Gegensatz zu den ermittelten Ergebnissen in den getesteten Pankreaskarzinomzellen steht. Darüber hinaus lassen die Ergebnisse vermuten, dass eine Kombinationsbehandlung aus NQ und Doxo imstande ist, die Menge an DSBs in NHDF zu minimieren, während aus vorherigen Ergebnissen der gegenteilige Trend hervorgeht, dass NQ und Doxo die Anzahl an DSBs in den getesteten Pankreaskarzinomzellen potenziert (Abbildung 3.4, Abbildung 3.5, Abbildung 8.9, Abbildung 8.10, Abbildung 8.11 und Abbildung 8.12 des Anhangs). Das Ergebnis der Kombinationsbehandlung aus IQ und Doxo liefert Hinweise darauf, dass bei einer Behandlung mit IQ in der Kombination mit Doxo mehr DSBs entstehen. Dies konnte in den Pankreaskarzinomzellen nicht festgestellt werden. Insgesamt belegen die Ergebnisse dieser Analyse, dass die Naturstoffe die DDR der Pankreaskarzinomzellen und der NHDF unterschiedlich beeinflussen. In der Kombinationsbehandlung aus NQ und Doxo zeigen sich für diese Untersuchung besonders vielversprechende Ergebnisse, da diese Behandlung zu einer vermehrten Bildung von kolokalisierten γ H2AX/53BP1-Foci und somit zu DSBs in den Tumorzellen und gleichzeitig zu einer Reduktion dieser in den Nicht-Tumorzellen führt.

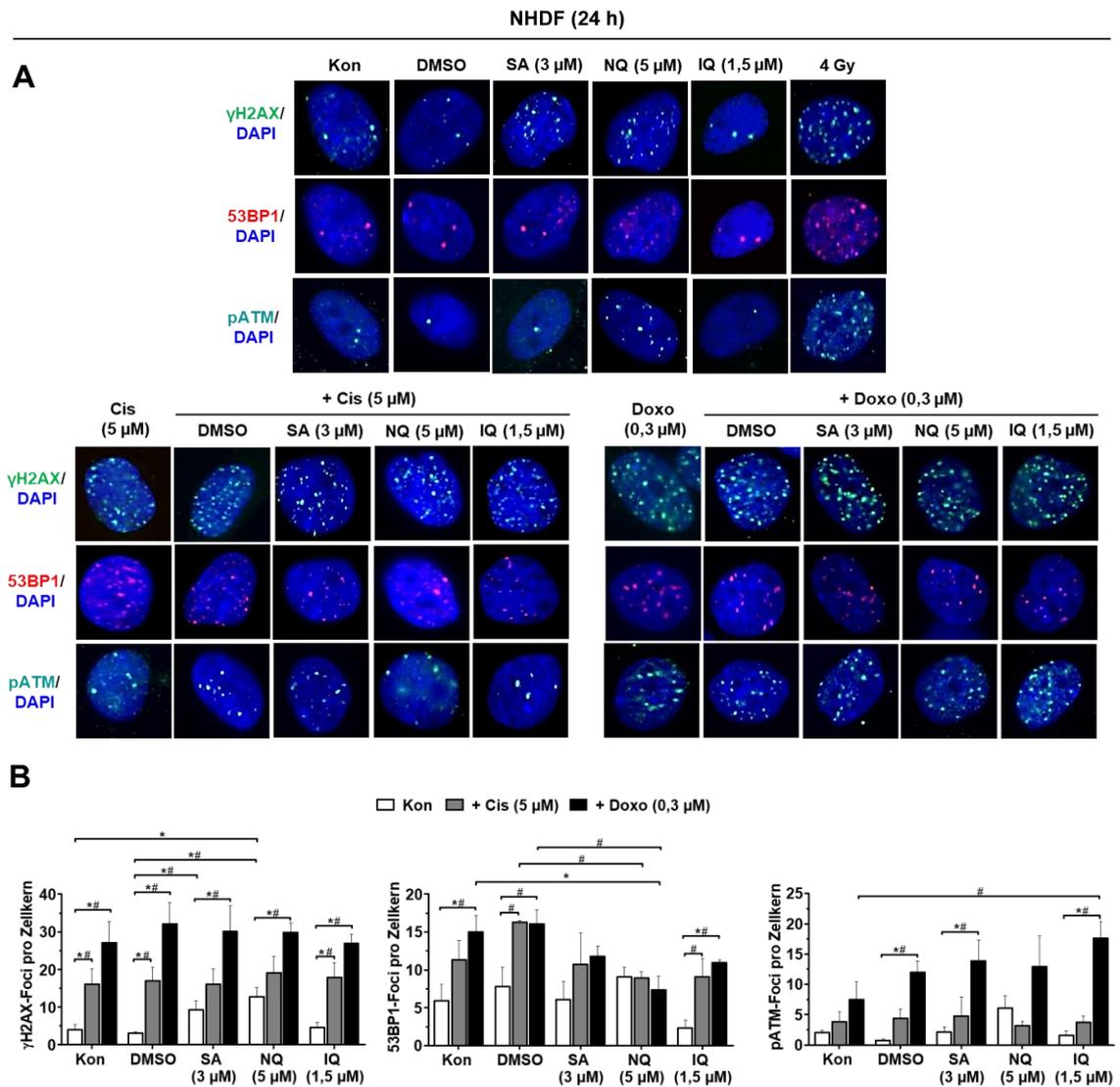


Abbildung 3.20: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf die Ausbildung nukleärer γ H2AX-, 53BP1- und pATM-Foci in NHDF.

Um die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen zu bestimmen, wurde die Anzahl an nukleären S139 phosphorylierten H2AX (γ H2AX)-, 53BP1- und pATM-Foci ermittelt. Dazu wurden NHDF für 24 h mit einer Konzentration im Bereich der IC_{50} der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 μ M Cisplatin (Cis) oder 0,3 μ M Doxorubicin (Doxo) behandelt. A: Repräsentative Mikroskopbilder zeigen die Formation der jeweiligen Foci nach der Mono- oder Kombinationsbehandlung. B: Quantitative Auswertung der jeweiligen Foci pro Zelle. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM ($n = 3$, $N \geq 50$ Zellen). Student's t -Test $*p \leq 0,05$; One-way ANOVA $\#p \leq 0,05$. DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol; IQ: 5-*epi-Ilimaquinone*, Kon: Kontrolle; NQ: 5-*epi-Nakijiquinone* Q; Nst: Naturstoff; p: phospho-; SA: *Secalonic acid F*. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.18 des Anhangs zu entnehmen.

Im Hinblick darauf, ob die nach 24 h ermittelten DNA-Schäden in der Konsequenz auch in NHDF zum Zelltod führen, wurden verschiedenste Kombinationsbehandlungen für 72 h mit SA, NQ und IQ in NHDF durchgeführt (Abbildung 3.21). Die Vitalität der Zellen wurde mittels Alamar Blue®-Assay bestimmt und, wie zuvor, wurde die Effektivität über den Kombinationsindex bestimmt. Im Gegensatz zu den Pankreaskarzinomzellen zeigt die Kombination aus SA sowie IQ und Cis sowie alle Kombinationen mit Doxo einen antagonistischen Effekt auf die Vitalität von NHDF. Ein synergistischer Effekt ist in der Kombination von NQ und Cis detektierbar. Dies lässt als wahrscheinlich erscheinen, dass die Naturstoffe SA und IQ in der Lage sind, die Zytotoxizität der Zytostatika in den Nicht-Tumorzellen zu minimieren und somit eine selektive Wirkung gegenüber den getesteten Pankreaskarzinomzellen zu zeigen.

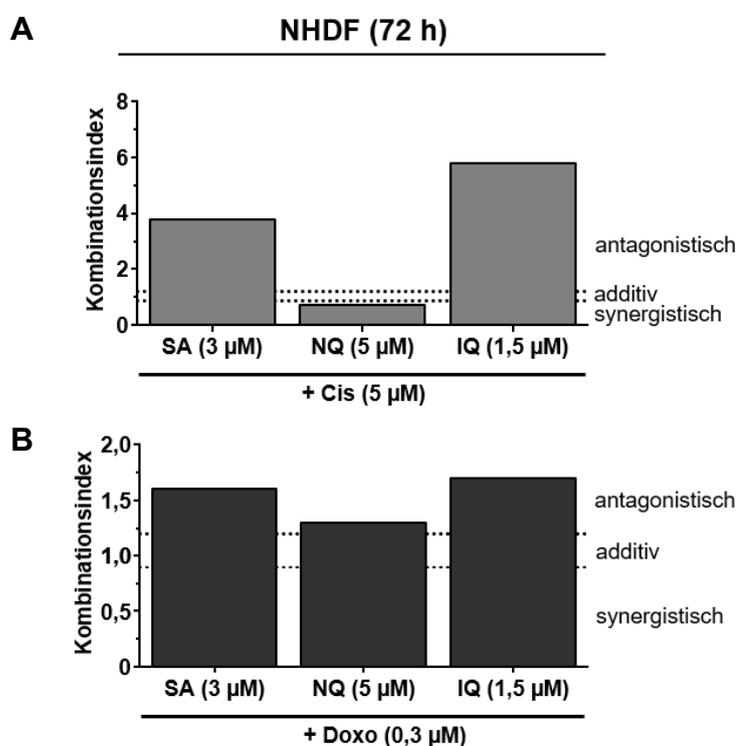


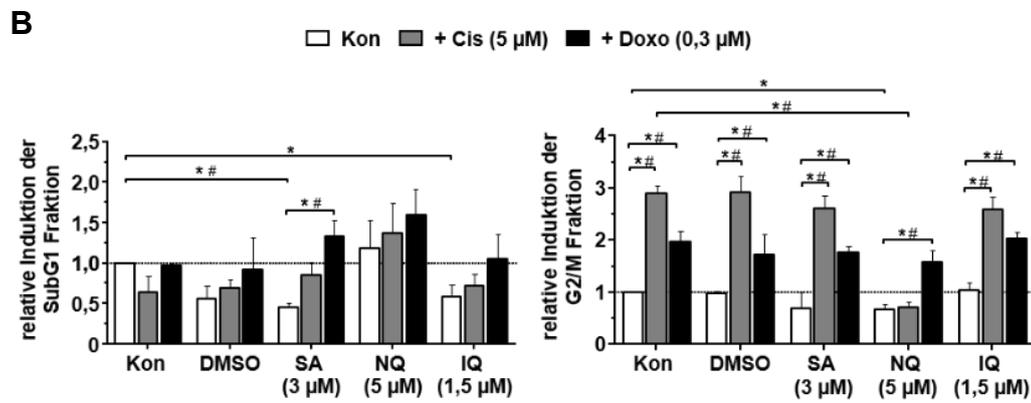
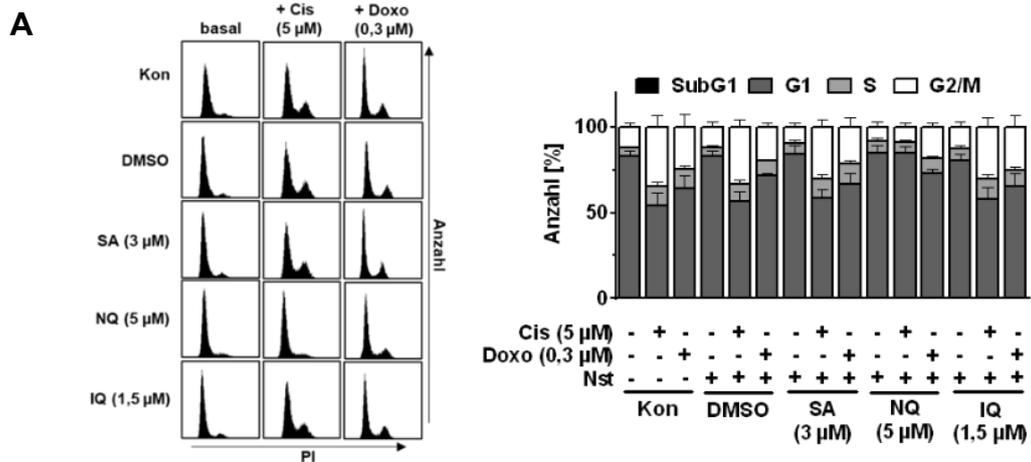
Abbildung 3.21: Einfluss der Kombinationsbehandlung auf die Vitalität von NHDF-Zellen

Um den Einfluss der Kombinationsbehandlungen auf die Vitalität zu untersuchen, wurden NHDF für 72 h mit Konzentrationskombinationen der Naturstoffe und Cisplatin (Cis) (A) bzw. Doxorubicin (Doxo) (B) behandelt. Die verwendeten Konzentrationen der einzelnen Substanzen liegen im Bereich der IC_{20} , IC_{50} und IC_{80} der jeweiligen Substanz. Mittels Alamar Blue®-Assay wurde die Vitalität ermittelt und der Kombinationsindex zur Bewertung des zytotoxischen Effektes mit Hilfe der CompuSyn-Software bestimmt. Dargestellt sind die ermittelten Kombinationsindexe der zuvor getesteten Konzentrationen. Es wird zwischen antagonistischen, additiven und synergistischen Effekten unterschieden. SA: Secalonic acid F; NQ: 5-epi-Nakijiquinone Q; IQ: 5-epi-Illimaquinone. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.19 des Anhangs zu entnehmen.

In NHDF wurde ebenfalls der Einfluss der Naturstoffe auf den Zellzyklus bzw. auf die Apoptose untersucht, um die Ursachen für die Unterschiede in der Vitalität zu ermitteln (Abbildung 3.22). Hierbei stellt sich heraus, dass SA und IQ nach 24-stündiger Behandlung eine Reduktion der SubG1-Fraktion auslösen. Nach 72-stündiger Behandlung lässt sich ein tendenzieller, statistisch jedoch nicht signifikanter Anstieg der SubG1-Fraktion durch NQ erkennen. Cis bewirkt nach 72 h einen signifikant erhöhten Anteil an Zellen in der SubG1-Phase. In der Kombinationsbehandlung von NQ und Cis zeigt sich, ähnlich wie bei der NQ-Monobehandlung, ein tendenzieller, statistisch jedoch nicht signifikanter Anstieg der SubG1-Fraktion im Vergleich zu der Cis-Behandlung allein. Die Menge an Zellen in der SubG1-Fraktion wird im Vergleich zur Kontrolle durch eine 72-stündige Behandlung mit Doxo gesteigert. Auch hier ist lediglich eine marginale Beeinflussung der durch die Doxo-Monobehandlung induzierten Steigerung der SubG1-Zellpopulation durch NQ zu verzeichnen.

Der Anteil der Zellen in der G₂/M-Phase lässt Rückschlüsse auf den Einfluss der getesteten Naturstoffe auf die Zellzyklusprogression von NHDF zu. Eine Behandlung mit dem Naturstoff NQ führt nach 24 h zu einer Abnahme der sich in der G₂/M-Phase befindlichen Zellen. Cis löst nach 24- als auch 72-stündiger Behandlung einen Anstieg der Menge an Zellen in der G₂/M-Phase aus. Dieser Anstieg wird zu beiden Analysezeitpunkten durch NQ aufgehoben. Auch Doxo sorgt für eine erhöhte Anzahl an Zellen in der G₂/M-Phase nach 24 h und 72 h. Die ausgewählten Naturstoffe haben keinen Einfluss auf die durch die Doxo-Behandlung erhöhte Anzahl an Zellen in dieser Zellzyklusphase. Im Vergleich mit den zuvor getesteten Pankreaskarzinomzellen stellt sich heraus, dass Prozesse des Zellzyklus und der Apoptose durch die Naturstoffe unterschiedlich beeinflusst werden. In NHDF verringert sich die Menge an Zellen in der SubG1-Phase durch eine Behandlung mit SA, wohingegen diese Behandlung in den Pankreaskarzinomzellen zu einer vermehrten Anzahl an Zellen in dieser Zellpopulation führt. Dies lässt weiterhin vermuten, dass eine Monobehandlung mit SA selektiv einen Zelltod in Tumorzellen verursacht. In der Kombinationsbehandlung von NQ und Cis bzw. Doxo wird die Menge an Zellen in der SubG1-Phase erhöht und die Menge an Zellen in der G₂/M-Phase wird durch die Kombination von NQ und Cis beeinflusst. Es ist möglich, dass NQ die Zellzykluskontrolle nach einer Kombinationsbehandlung aufhebt und die Zellen den Zellzyklus wie gewohnt durchlaufen können. Auffällig ist, dass es in NHDF, im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Pankreaskarzinomzellen, zu keiner Reduktion der Anzahl der in der G₂/M-Phase befindlichen Zellen nach Behandlung mit Doxo und den verwendeten Naturstoffen kommt. Es liegt nahe, dass die Naturstoffe in NHDF die Wirkung von Doxo auf die Zellzyklusprogression nicht modulieren können.

NHDF (24 h)



NHDF (72 h)

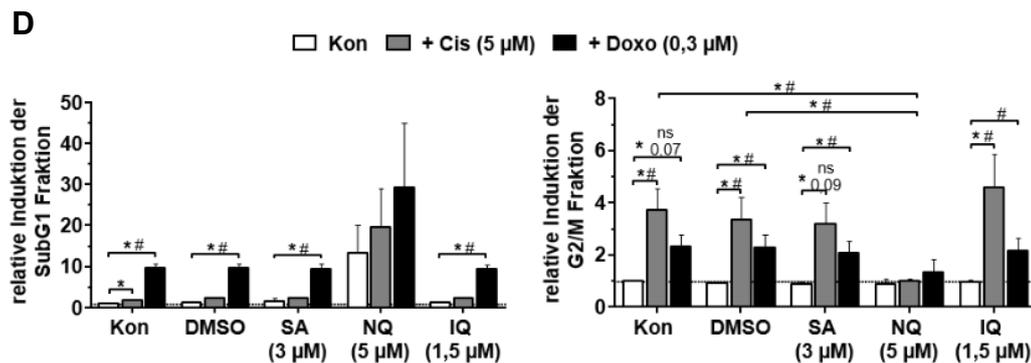
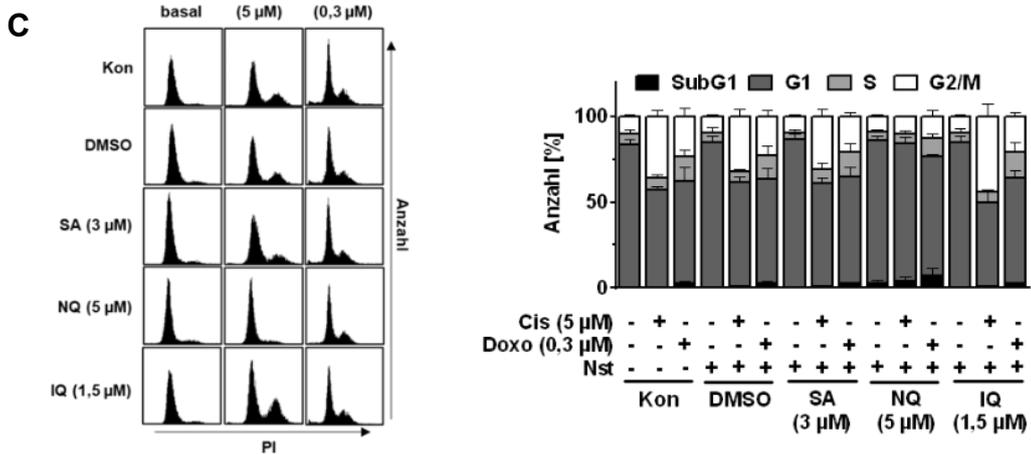


Abbildung 3.22: Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses von ausgewählten Naturstoffen und Zytostatika (Mono- und Kombinationsbehandlung) auf die Zellzyklusverteilung von NHDF.

NHDF wurden für 24 (A; B) und 72 h (C; D) mit einer Konzentration im Bereich der IC_{50} der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 μ M Cisplatin (Cis) oder 0,3 μ M Doxorubicin (Doxo) behandelt. Anschließend wurde die Zellzyklusverteilung mittels eines Durchflusszytometers ermittelt. A; C: Gezeigt sind Zellzyklusverteilungen der unterschiedlichen Bedingungen und die quantitative Auswertung der Verteilung. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM in Prozent der gemessenen Gesamtzellzahl ($n = 3$, $N = 1$). B; D: Quantitative Auswertung der Anteile an Zellen in der SubG1- bzw. der G_2/M -Phase des Zellzyklus. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM relativ zur Kontrolle ($n = 3$, $N = 1$). Student's *t*-Test * $p \leq 0,05$; One-way ANOVA # $p \leq 0,05$. Kon: Kontrolle; Nst: Naturstoff; SA: *Secalonic acid F*; NQ: *5-epi-Nakijiquinone Q*; IQ: *5-epi-Illimaquinone*. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.20 des Anhangs zu entnehmen.

Die Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 wurde in NHDF ebenfalls ermittelt, um die molekularen Mechanismen des Zelltods in nicht-malignen Fibroblasten im Vergleich zu den Pankreaskarzinomzellen zu untersuchen. Die Western Blot-Analysen zeigen, dass die Aktivierung der Caspasen nach 24 h Behandlung mit NQ am höchsten ist (Abbildung 3.23 (A; C)). Nach einer 24-stündigen Behandlung mit dem Zytostatikum Cis ist eine leicht vermehrte Spaltung der Caspasen zu detektieren, die durch SA und IQ leicht gesteigert wird. Doxo induziert sowohl nach 24 h als auch nach 72 h eine Spaltung der Caspasen. Bei der 24-stündigen Kombinationsbehandlung aus SA und Doxo tritt im Vergleich zu einer Doxo-Monobehandlung eine vermehrte Spaltung der Caspasen ein.

Die Caspasenaktivität wurde ebenfalls fluorimetrisch mittels Apo-ONE[®]-Assay nach 24 h und 72 h bestimmt (Abbildung 3.23 (B, D)). Nach 72-stündiger Behandlung mit dem Naturstoff SA ist eine verminderte Aktivität der Caspasen im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen. Doxo erhöht die Aktivität der Caspasen nach 24 h, die durch NQ noch weiter gesteigert wird. Der Trend dieser Potenzierung ist nach 72 h ebenfalls detektierbar. Schlussfolgernd ist zu vermuten, dass SA sowohl in der Mono- als auch in der Kombinationsbehandlung mit Cis bzw. Doxo in der Lage ist, die Spaltung der Caspasen und die Aktivität dieser zu steigern. Dies deutet, ebenso wie in den zuvor getesteten Pankreaskarzinomzellen, auf eine vermehrte Aktivierung der apoptotischen Prozesse durch SA hin. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass der Effekt in den Tumorzellen stärker ausgeprägt ist und somit der Zelltod in diesen Zellen im Vergleich zu den Nicht-Tumorzellen deutlich vermehrt auftritt. Darüber hinaus führt NQ in der Monotherapie zu einer Potenzierung der Spaltung der Caspasen und in der Kombinationsbehandlung mit Doxo zu einer erhöhten Aktivität im Vergleich zur Doxo-Monobehandlung. Es ist anzunehmen, dass eine Behandlung mit NQ zu einer Modulation der durch Doxo ausgelösten Zelltodmechanismen führt.

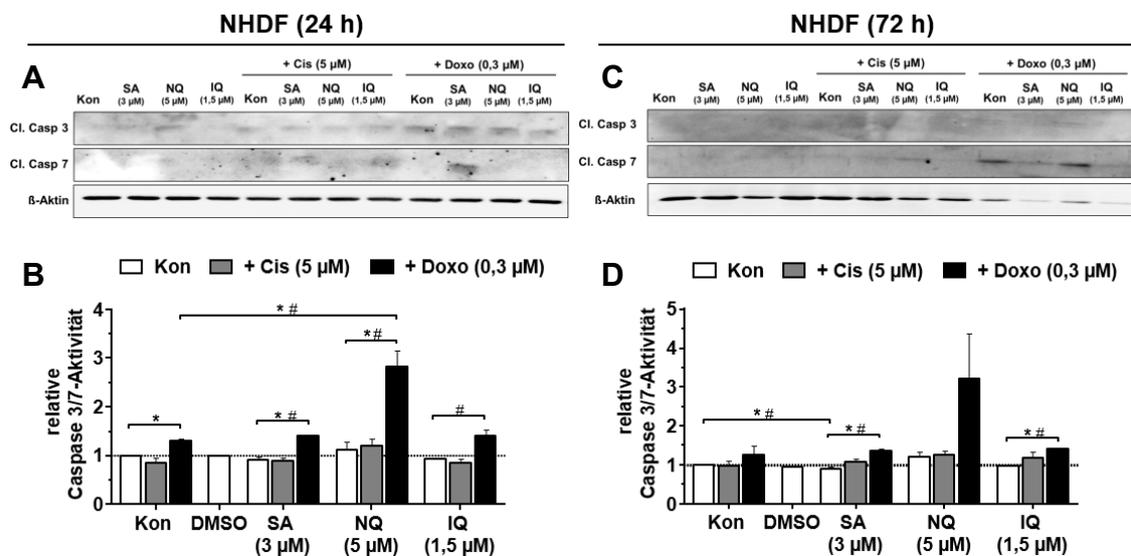


Abbildung 3.23: Analyse der Aktivierung und Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 in NHDF.

NHDF wurden für 24 h (A, B) bzw. 72 h (C, D) mit einer Konzentration im Bereich der IC₅₀ der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 μM Cisplatin (Cis) oder 0,3 μM Doxorubicin (Doxo) behandelt. A, C: Die Caspasenaktivierung wurde mittels Western Blot-Analysen anhand des Nachweises der gespaltenen aktiven Caspasen (cl. Casp 3 und cl. Casp 7) bestimmt. Die Expression des Zytoskelettproteins β-Aktin dient als Ladekontrolle. C, D: Mittels Apo-ONE®-Assay wurde die Caspasenaktivität fluorimetrisch bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM als Vielfaches der Kontrolle (= 1,0) (n = 3, N = 4). Student's *t*-Test **p* ≤ 0,05; One-way ANOVA #*p* ≤ 0,05. Kon: Kontrolle; Nst: Naturstoff; SA: *Secalonic acid F*; NQ: *5-epi-Nakijiquinone Q*; IQ: *5-epi-Illimaquinone*. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.21 des Anhangs zu entnehmen.

Die zytotoxischen Cis-(1,2-GpG)-DNA-Addukt wurden in NHDF ebenfalls mittels Southwestern Blot-Analysen untersucht (Abbildung 3.24). Auch hier sollte überprüft werden, ob die bisherigen Ergebnisse in Zusammenhang mit einer Beeinflussung des DNA-Addukt-Formation stehen. Die Ergebnisse der Analyse in den nicht-malignen Fibroblasten zeigen, dass die Naturstoffe die Menge an Cis-(1,2-GpG)-Intrastrangverknüpfungen nicht beeinflussen. Dies steht im Gegensatz zu den Resultaten in den Pankreaskarzinomzellen. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Naturstoffe selektiv nur in den Tumorzellen zu einer vermehrten Anzahl der zytotoxischen Cis-(1,2-GpG)-Intrastrangverknüpfungen führen und die Nicht-Tumorzellen vergleichsweise weniger stark beeinflusst werden.

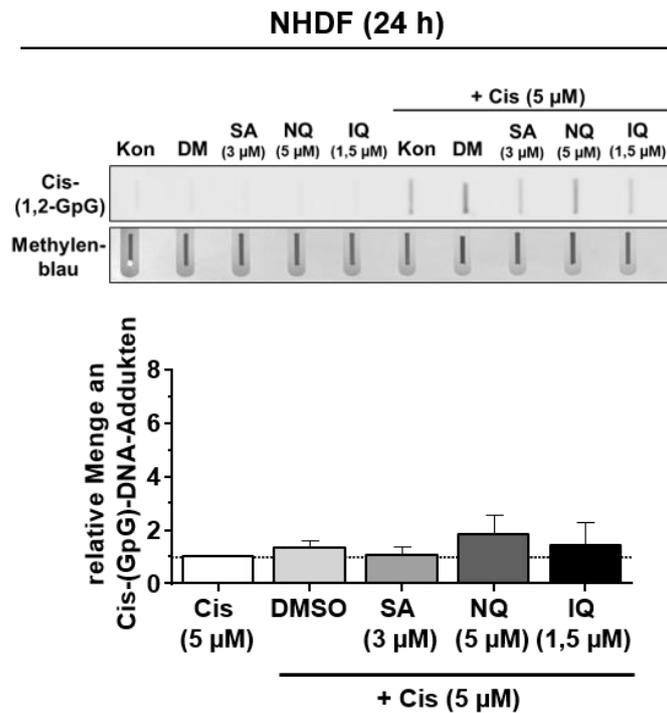


Abbildung 3.24: Einfluss der Naturstoffe auf die Cisplatin-induzierte Bildung von Cis-(1,2-GpG)-Intrastrangverknüpfungen in primären humanen Fibroblasten (NHDF).

NHDF wurden für 24 h in Abwesenheit oder Anwesenheit von Cisplatin (Cis) mit den Naturstoffen behandelt. Anschließend wurde die Menge an Cis-(1,2-GpG)-DNA-Intrastrangverknüpfungen mit Southwestern Blot-Analysen untersucht. Es erfolgte eine desitometrische Auswertung und die Signalintensität wurde auf die Methylenblaufärbung bezogen. Die Signalintensität der DNA der unbehandelten Kontrolle wurde subtrahiert. Gezeigt sind exemplarische Southwestern-Blots oben sowie Mittelwerte + SEM relativ zu Cis allein ($n = 3$; $N = 1$). Student's t -Test $*p \leq 0,05$; One-way ANOVA $^{\#}p \leq 0,05$. IQ: *5-epi-Illimaquinone*, NQ: *5-epi-Nakijiquinone Q*; SA: *Secalonic acid F*. Die der Abbildung zugrunde liegenden Daten sind Tabelle 8.22 des Anhangs zu entnehmen.

3.8.2.2 Einfluss der Naturstoffe in Mono- bzw. Kombinationstherapie auf die Vitalität primärer Rattenhepatozyten

Die Leber ist ein sehr wichtiges Organ für die Detoxifizierung von Substanzen aus dem Körper. Primäre Rattenhepatozyten-Kulturen ermöglichen Untersuchungen des Substanzmetabolismus, der Induktion von metabolisierenden Enzymen nach einer Behandlung und auch der Stoffwechsel-vermittelten Zytotoxizität. Analysen in primären Rattenhepatozyten können somit als Voruntersuchungen für *in vivo* Experimente genutzt werden und mögliche hepatotoxische Effekte aufdecken, die durch *in vitro* Untersuchungen in nicht-metabolisierenden Zellen aufgrund der fehlenden Möglichkeit der metabolischen Aktivierung nicht detektierbar sind. Um hepatotoxische Effekte zu analysieren, wurde der Einfluss der ausgewählten Naturstoffe auf die Vitalität primärer Rattenhepatozyten untersucht. Dies ermöglicht nicht nur die Analyse der Zytotoxizität der Naturstoffe selbst in Mono- bzw. Kombinationstherapie, sondern indirekt auch deren Metabolite, die während der Biotransformation in der Leber entstehen.

Dazu wurden primäre Rattenhepatozyten mittels Perfusion isoliert und nach einer 24-stündigen Anwachszeit erfolgte die Behandlung der Hepatozyten mit dem Naturstoff allein oder in Kombination mit Cis bzw. Doxo für 24 h bzw. 48 h (Abbildung 3.25). Als Positivkontrolle wurde das Alkylanz Methylmethansulfonat (MMS) mitgeführt. Nach 24-stündiger Behandlung zeigt sich für keinen der untersuchten Naturstoffe eine Abnahme der Vitalität. Nach 48 h ist ein Vitalitätsverlust von 25 % durch die Behandlung mit SA detektierbar. Die Behandlung mit Cis führt zu einer leicht verringerten Vitalität und liegt nach 48 h bei 90 %. Diese wird in der Kombination mit SA weiter reduziert, was für NQ und IQ allerdings nicht zu verzeichnen ist. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Naturstoffe NQ und IQ sowie deren Metabolite, weder in der Mono- noch in der Kombinationsbehandlung mit den Zytostatika hepatotoxische Effekte zeigen. Diese Naturstoffe können folglich *in vivo* Untersuchungen getestet werden. Das Ergebnis nach der Behandlung mit SA lässt den Rückschluss zu, dass leichte hepatotoxische Effekte zu verzeichnen sind. Im weiteren Verlauf muss untersucht werden, ob SA selbst oder entstehende Metabolite für diesen Effekt verantwortlich sind.

4 Diskussion

Krebserkrankungen zählen zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Die bei der Behandlung verwendeten konventionellen Tumorthapeutika schädigen u. a. die genomische DNA der malignen Zellen und führen über die Aktivierung der DNA-Schadensantwort (DDR) zum Zelltod (Woods *et al.*, 2013). Dieser Ansatz ist jedoch in vielen Fällen nur begrenzt wirksam. Zu den Herausforderungen der Krebstherapie gehören u. a. die hohe Toxizität gegenüber dem Normalgewebe, aber auch das Auftreten von Zytostatika-Resistenzen. Aus diesen Gründen ist der Bedarf an neuen Therapiemöglichkeiten hoch. Aufgrund der Regulation von DNA-Reparatur, der Aktivierung von Zellzyklus-Kontrollpunkten und der Apoptose sind vor allem Mechanismen der DDR attraktive Zielstrukturen für neue tumorthapeutische Ansätze (Harper *et al.*, 2007). Dabei wird vor allem darauf abgezielt, den DNA-Schaden in der G₁- oder S-Phase des Zellzyklus zu maximieren und die DNA-Reparatur in der G₂-Phase zu minimieren. Durch diese Strategie erhöht sich der Anteil der Zellen mit einem DNA-Schaden in der Mitose und daraus resultierend auch der Anteil der absterbenden Zellen (O'Connor, 2015).

Für die Entwicklung neuer, wirksamer Krebsmedikamente und Entdeckung neuer Leitsubstanzen werden, neben Antikörpern und Kinase-Inhibitoren für personalisierte Behandlungsansätze, vor allem Naturstoffe als Vorbild genutzt (Mann, 2002, Demain und Vaishnav, 2011, Kinghorn, EJ *et al.*, 2016, Lichota und Gwozdziński, 2018, Seca und Pinto, 2018, Ren, de Blanco *et al.*, 2019). Die chemischen Substanzen, die u. a. von Pflanzen, Pilzen, Bakterien oder marinen Organismen produziert werden, weisen vielfältige pharmakologische Wirkungen auf. Naturstoffe sind in der Vergangenheit häufig zur Behandlung von Tumoren eingesetzt worden, vor allem in der traditionellen chinesischen Medizin oder bei dem indischen Ayurveda (Farnsworth *et al.*, 1985; Cragg *et al.*, 1997). Viele der aktuellen Tumorthapeutika stammen aus natürlichen Quellen. Manche der isolierten Stoffe sind in der Lage, Signalwege oder Expressionen von Genen direkt oder indirekt zu beeinflussen, die an der Regulation des Zellzyklus, der Zelldifferenzierung, aber auch der Apoptose beteiligt sind (Pan *et al.*, 2011). Klassische Beispiele hierfür sind Irinotecan und Etoposid (Topoisomerasehemmer) sowie Paclitaxel und Vincristin (Mitosehemmer) (Nobili *et al.*, 2009). In diesem Zusammenhang sind vor allem Kombinationsbehandlungen in den Vordergrund gerückt. Durch die gleichzeitige Modulation mehrerer Signalwege soll das Risiko von Arzneimittelresistenzen verringert

und die Effektivität konventioneller Therapien gesteigert werden (Singh *et al.*, 2013; Housman *et al.*, 2014).

4.1 Faktoren der DNA-Schadensantwort als Zielstrukturen zur Behandlung von Tumoren

Die Mechanismen der DDR, die durch Doppelstrangbrüche (DSBs) oder Replikationsstress ausgelöst werden, resultieren in einem Zellzyklusarrest, der die DNA-Reparatur und das Überleben der Zelle ermöglicht, oder im Zelltod. Die genomische Stabilität von Tumorzellen ist im Vergleich zu Normalgewebszellen deutlich minimiert. Diese Instabilität erhöht das Risiko von Mutationen in DDR-zugehörigen Genen, was u. a. zu einem Verlust von DNA-Reparaturwegen oder zu einer Inhibierung von Zelltod-assoziierten Wegen (z. B. Apoptose) führen kann. Eine Möglichkeit der Resistenzbildung könnte hierbei über die Induktion anderer DNA-Reparaturwege erfolgen (Bartkova *et al.*, 2005; Gorgoulis *et al.*, 2005; Eich *et al.*, 2013). Inhibitoren der DDR (u. a. der DNA-Reparatur) können deshalb nicht nur eine Behandlungsmöglichkeit von Tumoren sein, sondern auch zu deren Sensitivierung gegenüber konventionellen Tumortheraeutika führen (Curtin, 2012). Die DDR kann auf direkte Weise, z. B. durch PARP-Inhibition, Checkpoint-Kinase-Inhibition oder durch Inhibition anderer an der DDR beteiligte Faktoren beeinflusst werden (Weber *et al.*, 2015; Carrassa *et al.*, 2017). Andererseits kann diese auch indirekt durch z. B. reaktive Sauerstoffspezies (ROS)-Fänger wie N-Acetylcystein (NAC) induziert werden (Dickey *et al.*, 2005).

4.1.1 Naturstoffe als Modulatoren der DNA-Schadensantwort zur Behandlung von Tumoren

Naturstoffe, die mit Faktoren der DDR interagieren, können die Effektivität von konventionellen Tumortheraeutika verbessern, indem sie entweder die Mechanismen des Zellüberlebens in Tumorzellen hemmen oder die des Zelltods verstärken. Eine Vergrößerung der therapeutischen Breite, also der Abstand zwischen einer therapeutischen und einer toxisch wirkenden Dosis, kann zu einer verbesserten Verträglichkeit beitragen und ermöglicht den Einsatz einer höheren und möglicherweise effektiveren Dosis.

In der Literatur gibt es einige Beispiele für Naturstoffe, die für die Krebstherapie untersucht werden und die DDR modulieren. Dazu gehört u. a. Resveratrol. Dabei scheint dieser Naturstoff die DNA-Reparatur über die Beeinflussung der

Hauptregulatoren der DDR, der Kinasen ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*ataxia telangiectasia and RAD3 related*), zu inhibieren (Gatz *et al.*, 2008; Rajendran *et al.*, 2011). Es ist bekannt, dass Resveratrol in Kombination mit anderen Chemotherapeutika, dazu gehört Mitomycin C, 5-FU, Oxaliplatin oder Etoposid, synergistische Toxizität bewirkt (Redondo-Blanco *et al.*, 2017). In Brustkrebszellen konnte gezeigt werden, dass Resveratrol die Expression von an der DNA-Reparatur beteiligten Genen, z. B. Mre11 oder RAD51, herunter reguliert (Leon-Galicia *et al.*, 2013; Leon-Galicia *et al.*, 2018). In der Kombination mit Temozolomid ist der Naturstoff in der Lage, die O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Expression zu minimieren und dadurch die Behandlung von Glioblastomen zu potenzieren (Huang *et al.*, 2012). Ein weiterer Naturstoff, der häufig hinsichtlich seiner antitumorigenen Wirkung untersucht wird, ist Artesunat. Die Substanz zeichnet sich durch antiproliferative Effekte aus und wirkt zytotoxisch auf Kolonkarzinomzellen. Dabei löst Artesunat durch eine reduzierte Expression von Cyclin D1 und eine erhöhte P21-Expression einen Zellzyklusarrest der Zellen in der G₁-Phase aus. In der Kombination mit Oxaliplatin wird die Menge an ROS durch Artesunat gesteigert (Liu *et al.*, 2011). Die gesteigerte Menge von ROS führt zu einer vermehrten oxidativen Schädigung der DNA, die in Konsequenz zu DBSs führen kann (Berdelle *et al.*, 2011). Darüber hinaus scheint die homologe Rekombination (HR) durch diesen Naturstoff gehemmt und somit die Behandlung mit dem Zytostatikum Cisplatin (Cis) bei resistenten Tumoren wieder möglich zu sein (Efferth *et al.*, 2003; Efferth *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008; Hamacher-Brady *et al.*, 2011; Reichert *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015; Berte *et al.*, 2016). Die Resultate der Analyse dieser Naturstoffe zeigen, dass es diverse Möglichkeiten gibt, die DDR zu beeinflussen.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Einfluss von bioaktiven Naturstoffen, isoliert aus endophytischen Pilzen, Pflanzen, Flechten oder marinen Schwämmen auf Faktoren der DDR untersucht. Es wurden sowohl Naturstoffe berücksichtigt, die die DDR in Monotherapie beeinflussen, als auch Naturstoffe, die einen Einfluss auf die Tumortheraeutika-induzierte DNA-Schadensantwort zeigen und dadurch womöglich in der Lage sind, inhärente oder erworbene Arzneimittelresistenzen zu überwinden und zu einer effizienteren Behandlung der malignen Erkrankung zu führen.

4.1.2 Ausgewählte Naturstoffe als Modulatoren der DNA-Schadensantwort

Dabei ergab sich in dieser Arbeit die Frage, ob eine Modulation der DNA-Schadensantwort (DDR) mit Hilfe der uns zur Verfügung stehenden Naturstoffe zu einer Potenzierung der antitumorigenen Wirksamkeit von ausgewählten Zytostatika führt. Dazu wurden Pankreaskarzinom-Zellen (BxPC3- und SU.86.86-Zellen) als *in vitro*-Modellsysteme hinsichtlich ihrer Stressantworten nach Behandlung mit den Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin (Cis) oder Doxorubicin (Doxo) untersucht. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde dafür zunächst eine Naturstoffdatenbank mit 296 Naturstoffen entsprechend dem Einfluss auf die Zellvitalität und auf das nukleäre Signal des am Serin 139 phosphoryliertem Histon 2AX (*H2A histone family, member X*) (γ H2AX), als Indikator für die Modulation der DDR, mit Hilfe einer fluoreszenzbasierten Methode gescreent. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden zehn biologisch aktive Naturstoffe ausgewählt, die sowohl die basale als auch die stimulierte DDR beeinflussen. Zu diesem Naturstoffset gehören *5-epi-Illicaquinone*, *5-epi-Nakijiquinone Q*, *Beauvericin* bzw. dessen Derivat *Beauvericin J*, *Coniellin A*, *Fusarielin J*, *Hexaprenylhydroquinone*, *Secalonic acid F*, *Tylophorinine* und *Viriditoxin*. Dabei war die biologische Aktivität sehr heterogen. Manche Naturstoffe beeinflussten sowohl die basale als auch die stimulierte DDR, während andere keinen Einfluss auf die basale DDR besaßen, stimulierten oder reduzierten jedoch die induzierte DDR. Da die Mechanismen der DDR das Gleichgewicht zwischen Zellüberleben und Zelltod steuern (Roos *et al.*, 2016), können eine Stimulierung sowie eine Inhibierung der DDR das gleiche Resultat liefern und in den Tumorzellen in Zelltod resultieren. Die nachfolgenden Ergebnisse scheinen nicht durch die Aufnahme von Doxo beeinflusst worden zu sein (Abbildung 3.16).

Zu den favorisierten Naturstoffen aus der Datenbank zählen *Beauvericin* bzw. dessen Derivat *Beauvericin J*. Dabei handelt es sich um ein Mycotoxin, das aus der zu den Pilzen gehörenden Gattung der Fusarien isoliert wird (Logrieco *et al.*, 1998). *Beauvericin* reduzierte die Vitalität der ausgewählten Pankreaskarzinomzellen (Tabelle 8.1). In den untersuchten Zellen wurde das Fluoreszenzsignal von γ H2AX bei Mono-Behandlung mit *Beauvericin/Beauvericin J* erhöht. In den Kombinationsbehandlungen mit den Zytostatika Cis und Doxo wurde das nukleäre γ H2AX-Signal im Vergleich zu der Monobehandlung reduziert. Dies kommt möglicherweise durch eine vermehrte DNA-Reparatur oder durch eine Reduktion der initialen Cis/Doxo-induzierten DNA-Schäden zustande (Tabelle 3.1 und Abbildung 8.6). Eine Reduktion der Cis/Doxo-induzierten DNA-Schäden konnte anhand der Resultate der Analyse der Anzahl an nukleären γ H2AX-Foci und des Comet-Assays ausgeschlossen werden (Abbildung 8.7, Abbildung 8.8 und Abbildung 8.13), was auch mit den Ergebnissen von Dornetshuber *et*

al. in Einklang steht (Dornetshuber *et al.*, 2009). In bisherigen Analysen konnte ferner festgestellt werden, dass *Beauvericin* in diversen Tumorzellen den apoptotischen Zelltod auslöst, die Phosphorylierung von MAPK (z. B. ERK, JNK) beeinflusst und NFκB inhibiert (Wätjen *et al.*, 2014). Dabei ist interessant, dass ERK zur ordnungsgemäßen Ausführung der DDR in Bezug auf die Aktivierung der Kontrollpunkte (z. B. CHK1) und Reparatur von DNA-Schäden beiträgt (Lin *et al.*, 2013). Dieser Zusammenhang könnte mit einer Bestimmung der Phosphorylierung von CHK1 und ERK nach Behandlung mit *Beauvericin* in Mono- und Kombinationsbehandlung über Western Blot-Analysen genauer untersucht werden. Darüber hinaus interagiert der Naturstoff mit ABC-Transportern und ist somit in der Lage, die Aufnahme bzw. die Abgabe von Xenobiotika, z. B. Zytostatika, zu verändern (Dornetshuber *et al.*, 2009). Die intrazelluläre Konzentration von Doxo wurde durch *Beauvericin* entsprechend den Befunden der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen jedoch nicht moduliert und kann als Ursache für die Modulation des γH2AX-Signals in der Kombinationsbehandlung ausgeschlossen werden.

Coniellin A gehört zu den Azaphilonen und wird aus dem Pilz *Coniella fragariae* gewonnen (Yu *et al.*, 2018). Bei der Analyse der Wirkung auf die DDR wurde kein Einfluss auf die initiale DNA-Schadensformation detektiert (Abbildung 8.7, Abbildung 8.8 und Abbildung 8.13). Darüber hinaus ist bekannt, dass *Coniellin A* die Inflammation-abhängige Transkription von NFκB inhibiert und die Migration von Triple-negativen Brustkrebszellen reduziert (Yu *et al.*, 2018). In diesem Zusammenhang gibt es Hinweise darauf, dass NFκB einen Einfluss auf die Krebsentstehung und -progression besitzt (Aggarwal, 2004). Dabei wurde eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors (d. h. eine nukleäre Translokation) in einer Vielzahl von soliden Tumoren beobachtet, u. a. in Prostata- oder Mammatumoren (Nakshatri *et al.*, 1997; Palayoor *et al.*, 1999). Sowohl ionisierende Strahlung als auch Zytostatika wie z. B. Cis oder Doxo induzieren die Aktivierung von NFκB in verschiedenen Tumorzellen (Melisi *et al.*, 2007; Baumann *et al.*, 2008; Bednarski *et al.*, 2008). Die durch genotoxische Substanzen hervorgerufene NFκB-Aktivierung gilt u. a. als wichtiger Mechanismus, durch den verschiedene Krebszellen therapeutische Resistenz gegenüber diesen Substanzen erlangen (Baldwin, 2001). Des Weiteren wird eine Verbindung zwischen NFκB und der Serin-Proteinkinase ATM vermutet, was durch Li *et al.* bestätigt werden konnte (Li *et al.*, 2001). Durch die bekannten Wechselwirkungen zwischen NFκB und der DDR ist zu vermuten, dass die Modulation des Fluoreszenzsignals und der Proteinmenge von γH2AX in Verbindung mit dem Transkriptionsfaktor steht und möglicherweise eine Inhibierung von NFκB über die

Modulation der DDR zu einer verbesserten Wirksamkeit der ausgewählten Zytostatika führt.

Fusarielin J, isoliert aus *Fusarium tricinctum*, wirkte zytotoxisch auf die Pankreaskarzinomzellen (Tabelle 8.1). In der Literatur wurde für die Ovarienkrebszellen A2780 eine Reduktion der Zellvitalität nach der Behandlung mit *Fusarielin J* beschrieben (Hemphill *et al.*, 2017). Dabei scheinen die Ovarienkrebszellen sensitiver gegenüber dem Naturstoff zu sein. Allein führte *Fusarielin J* in den durchgeführten Experimenten zu einer reduzierten Menge an γ H2AX, und potenzierte diese in der Kombination mit Doxo (Tabelle 3.1). Es konnte jedoch kein Einfluss auf die Ausbildung von DNA-Strangbrüchen detektiert werden, weshalb eine Beeinflussung der DNA-Reparatur, der beteiligten Kinasen oder der Schadenserkenkung für die Modulation des γ H2AX-Fluoreszenzsignals wahrscheinlich ist. Um zu prüfen, ob *Fusarielin J* zu einer Beeinflussung der DNA-Schadenserkenkung führt, wären u. a. Analysen der Aktivierung von ATM oder ATR, aber auch des MRN-Komplexes, bestehend aus den Proteinen MRE11 (*meiotic recombination 11*), RAD50 (*DNA repair protein RAD50*) und NBS1 (Nibrin), denkbar. Mit Hilfe von Expressionsanalysen beteiligter Faktoren der z. B. nicht-homologen Strangverknüpfung (NHEJ) könnten Einflüsse auf die DNA-Reparatur ermittelt werden.

Hexaprenylhydroquinone wird aus dem marinen Schwamm *Sarcotragus muscarum* isoliert (Liu *et al.*, 2001). Bei der Analyse des nukleären γ H2AX-Signals nach einer Monobehandlung mit dem Naturstoff wurde eine vermehrte Phosphorylierung festgestellt (Tabelle 3.1). Die Untersuchung der DNA-Schäden mittels γ H2AX-Foci-Analyse zeigte ebenfalls eine erhöhte Anzahl der γ H2AX-Foci (Abbildung 8.6). In der Kombinationsbehandlung nahm das γ H2AX-Signal ab, ein Einfluss auf die Anzahl der γ H2AX-Foci konnte jedoch nicht detektiert werden. Studien beschreiben eine Inhibierung der retroviralen Transkriptase und der zellulären DNA-Polymerase (Loya *et al.*, 1997). Dies lässt die Vermutung zu, dass es möglicherweise eine Interaktion mit der DNA-Reparatur gibt und es dadurch zu mehr bzw. weniger DNA-Schäden kommt. Darüber hinaus ist belegt, dass dieser Naturstoff in Hepatomzellen über eine antioxidative Aktivität verfügt und zu einer Reduktion der Zellvitalität führt. Dies geht mit der Inhibierung von NF κ B sowie der EGFR-Kinase einher (Wätjen *et al.*, 2009). Dabei ist vor allem erwähnenswert, dass eine Überexpression der EGFR-Kinase zu einer erhöhten DNA-Reparaturkapazität führt und somit zu einer Resistenzentwicklung gegenüber Strahlung, aber auch Zytostatika beitragen kann. EGFR steigert u. a. die DNA-Reparatur von strahlungsinduzierten DNA-Schäden durch eine Stimulation der Menge an der

katalytischen Untereinheit der DNA-Proteinkinase (DNA-PKcs) im Zellkern und der damit einhergehenden Steigerung der Aktivität der DNA-PK-abhängigen NHEJ (Szumiel, 2006; Liccardi *et al.*, 2011). Ob die NHEJ durch eine Behandlung mit *Hexaprenylhydroquinone* in Mono- oder in Kombinationsbehandlung vermindert wird, lässt sich mit Hilfe eines NHEJ spezifischen I-SceI-basierten Reporterassays über die Expression von GFP nachweisen.

Tylophorinine gehört zu den Phentanthroquinolizidin-Alkaloiden und wird aus *Tylophora indica* isoliert (Gopalakrishnan *et al.*, 1980). *Tylophorinine* induzierte eine S139 Phosphorylierung von H2AX und wirkte stark zytotoxisch auf die getesteten Pankreaskarzinomzellen (Tabelle 8.1 und Tabelle 3.1). Mit Hilfe der Resultate der γ H2AX-Foci-Analyse bzw. des Comet-Assays wurde kein Einfluss auf die Formation von DNA-Strangbrüchen konstatiert (Abbildung 8.7, Abbildung 8.8 und Abbildung 8.13). Ungeklärt bleibt jedoch, ob DNA-Strangbrüche zu einem früheren Zeitpunkt aufgetreten sind und in der Induktion von γ H2AX resultieren. Um dies zu überprüfen, müssten frühere Analysezeitpunkte gewählt werden. *Tylophorine*, die Leitstruktur von *Tylophorinine*, besitzt antiangiogene Aktivität, in dem der VEGFR2-Signalweg inhibiert wird, der an der endothelialen Zellmigration, Proliferation und Gefäßbildung beteiligt ist. In Studien anderer Arbeitsgruppen konnte bewiesen werden, dass u. a. ionisierende Strahlung zu einer Induktion von VEGF und anderen proangiogenen Faktoren in Tumoren führt, die die Strahlungs-induzierte Apoptose behindern (Fuks *et al.*, 2005). Dabei bewirkt eine Inhibierung von VEGF bei dem gleichzeitigen Einsatz von ionisierender Strahlung eine verbesserte antitumorogene Wirkung (Gorski *et al.*, 1999). Ob dies auch für die getesteten Pankreaskarzinomzellen gilt, könnte mit Vitalitätsanalysen nach der Kombinationsbehandlung aus *Tylophorinine* und ionisierender Strahlung untersucht und die Proteinexpression von VEGF über Western Blot-Analysen ermittelt werden.

Viriditoxin, ein sekundärer Metabolit des Pilzes *Paecilomyces variotii* (Liu *et al.*, 2013), zeigte keinen basalen Einfluss auf das nukleäre γ H2AX Signal, wirkt aber zytotoxisch auf die Pankreaskarzinomzellen (Tabelle 8.1). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass *Viriditoxin* zytotoxisch auf murine Lymphomzellen L5187Y wirkt (Liu *et al.*, 2016). Die durch die Zytostatika-induzierte DDR wurde durch eine Behandlung mit *Viriditoxin* reduziert, wodurch es möglicherweise zu einer reduzierten Reparatur sowie einer verstärkten Apoptose kommt (Tabelle 3.1). Eine Induktion von Apoptose und Autophagie wurde in Prostatakrebszellen durch die Stimulierung Autophagie-bezogener Gene (z. B. Atg5, Atg7 und Beclin) festgestellt (Kundu *et al.*, 2014). In diesem

Zusammenhang ist es wichtig, dass Autophagie, abhängig von dem Ausmaß der DNA-Schädigung, eine zytoprotektive oder aber eine zytotoxische Rolle bei der Entscheidung über das zelluläre Schicksal besitzt. Bei reparierbaren DNA-Schäden wird die zytoprotektive Autophagie aktiviert und das Zellüberleben durch eine bessere Verfügbarkeit der DNA-Reparaturproteine begünstigt. Schwere DNA-Schäden, die nicht mehr reparierbar sind, aktivieren in den Zellen die zytotoxische Autophagie, indem Zelltodmechanismen durch den Abbau von DNA-Reparaturproteinen beschleunigt werden (Czarny *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Hewitt *et al.*, 2017). Eine Depletierung von Autophagie-bezogenen Genen wie Beclin und Atg5 führte in Lungenkarzinomzellen zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung (Ko *et al.*, 2014). Darüber hinaus wurde bereits nachgewiesen, dass die Interaktion mit Autophagie-bezogenen Prozessen Urothelkarzinomzellen gegen Cis sensitiviert (Schlütermann *et al.*, 2018). Aus diesem Grund wäre im weiteren Verlauf zu klären, ob ein Zusammenhang zwischen der Reduktion der Zytostatika-induzierte DDR und einer Inhibierung der zytoprotektive Autophagie besteht. Um diese Hypothese zu überprüfen, wäre eine Untersuchung der DNA-Reparaturproteine sowie der Zelltodmechanismen, vor allem der Apoptose und der Autophagie selbst, ratsam.

Besonders die drei Naturstoffe *Secalonic acid F* (SA), *5-epi-Nakijiquinone Q* (NQ) und *5-epi-Illiciquinone* (IQ) wurden in den Analysen zur DDR auffällig und im weiteren Verlauf genauer untersucht.

4.1.2.1 Secalonic acid F

Die Bestimmung der IC_{50} (*inhibitory concentration 50 %*) von *Secalonic acid F* (SA) ließ zunächst eine Aktivität des Naturstoffes in den Pankreaskarzinomzellen vermuten (Abbildung 3.1). Demnach lässt sich beweisen, dass SA eine antitumorige Wirkung *in vitro* aufweist. SA gehört zu den Secalonsäuren, eine Gruppe der Ergochrome, und wird u. a. aus *Aspergillus aculeatus* isoliert (Andersen *et al.*, 1977). Es ist bekannt, dass diese Gruppe von Naturstoffen verschiedene biologische Aktivitäten aufweist. Dazu zählen u. a. eine antibakterielle, antiphlogistische und auch eine antitumorogene Wirkung, was in dieser Arbeit ebenfalls für Pankreaskarzinomzellen gezeigt werden konnte (Harada *et al.*, 1974; Andersen *et al.*, 1977; Guo *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Guru *et al.*, 2015). Insbesondere die Wachstumsinhibierung von diversen Tumorzellen durch die Derivate, wie z. B. *Secalonic acid A, B* oder *D*, wurde beschrieben (Iwaguchi *et al.*, 1980; Shimizu *et al.*, 1983; Kurobane *et al.*, 1987; Cai *et al.*, 2008).

Da vor allem die Modulation der DDR durch die Naturstoffe im Vordergrund der Analysen dieser Arbeit steht und als Regulator von Zellüberleben und -tod wirkt, wurde der Einfluss auf das γ H2AX-Fluoreszenzsignal untersucht. Aus diesen Fluoreszenzanalysen ging hervor, dass SA in Mono- sowie in der Kombinationsbehandlung mit Cis oder Doxo in der Lage ist, die DDR zu stimulieren (Abbildung 3.2 und Tabelle 3.1). Auch die Proteinmenge, die mittels Western Blot-Analysen untersucht wurde, konnte dies bestätigen (Abbildung 3.3). Nach Exposition mit konventionellen Tumortheraeutika sind DNA-Schäden hauptverantwortlich für den Zelltod (Roos *et al.*, 2013). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Naturstoffe auf die Bildung von DNA-Strangbrüchen sowie der nachfolgenden Aktivierung der DDR genauer betrachtet. Basal kam es durch die Behandlung mit SA zu einer verstärkten Bildung von DSBs, was sich in der vermehrten Anzahl an kolokalisierten γ H2AX/53BP1- und γ H2AX/pATM-Foci widerspiegelte (Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5 sowie Abbildung 8.9, Abbildung 8.10, Abbildung 8.11 und Abbildung 8.12 des Anhangs). Da sowohl im weiteren Verlauf bei der Untersuchung des Einflusses der Kombinationsbehandlungen auf nukleäre Foci (γ H2AX, 53BP1 und pATM) als auch bei dem Comet-Assay keine Potenzierung der Anzahl an DNA-Strangbrüchen im Vergleich zur Zytostatika-Behandlung allein zu verzeichnen war, liegt die Vermutung nahe, dass die erhöhte γ H2AX-Proteinmenge nicht in Verbindung mit einer erhöhten Menge an DNA-Strangbrüchen steht. Die gesteigerte Menge an γ H2AX scheint unabhängig von der intrazellulären Doxo-Konzentration zu sein (Abbildung 3.16). Andererseits scheint die erhöhte Menge von γ H2AX in der Kombinationsbehandlung von SA und Cis in Zusammenhang mit der vermehrten Formation von Cis-(1,2-GpG)-Addukten zu stehen (Abbildung 3.15). Dabei ist zu

berücksichtigen, dass die DNA-schädigende Wirkung von Doxo und Cis auf unterschiedlichen Mechanismen beruht. Doxo übt die DNA-schädigende Wirkung über eine irreversible Inhibition der Topoisomerase II α und Topoisomerase II β aus und führt somit zu DNA-Strangbrüchen (Kaufmann *et al.*, 1995, Gewirtz, 1999). Eine Modulation der intrazellulären Doxo-Konzentration gibt somit lediglich an, ob der Transport von Doxo in oder aus der Zelle beeinflusst wird, liefert jedoch keine Informationen über die Wirkung von SA auf die Doxo-ausgelöste Inhibition der Topoisomerase II-Isoformen. Sato *et al.* konnten in ihrer Studie zeigen, dass eine erhöhte Expression der Topoisomerase II α in Jurkat-Zellen zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Doxo geführt hat (Sato *et al.*, 2003). Für weiterführende Analysen bleibt zu klären, ob SA einen Einfluss auf die Expression oder katalytische Aktivität der Topoisomerase II besitzt und somit zu einer erhöhten Menge an γ H2AX führt. Cis besitzt DNA-bindende Eigenschaften und infolge der dadurch entstehenden Cis-DNA-Addukte kommt es zu einer Deformierung der DNA-Doppelhelix, die eine Beeinträchtigung bzw. Blockade der DNA-Replikation nach sich zieht (Mello *et al.*, 1995, Cohen *et al.*, 2001, Cepeda, Fuertes *et al.*, 2007). Durch die Blockade der Replikation können Brüche im Rückgrat der Helix auftreten, die auch zu einer Bildung von DSBs beitragen (Olive *et al.*, 2009). Olive und Banath konnten bereits nachweisen, dass eine vermehrte Bildung von Cis-DNA-Addukten auch zu einer vermehrten Bildung von γ H2AX führen kann (Olive *et al.*, 2009). Dabei kommt es durch Cis-DNA-Addukte zu einer Behinderung der DNA-Replikation und dadurch zu erhöhtem replikativen Stress, der die DDR aktiviert.

Eine erhöhte Menge an Cis-(1,2-GpG)-Addukten kann möglicherweise auf eine Inhibition der DNA-Reparatur zurückgeführt werden. Die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) ist der Hauptreparaturweg bei der Reparatur von Cis-(1,2-GpG)-Addukten (Furuta *et al.*, 2002). Dieser Mechanismus ist durch die Erkennung der Addukte über die Proteine XPA und XPC gekennzeichnet, aber auch durch ERCC1, welches die Exzision der geschädigten Nukleotide katalysiert. Da ERCC1 für die Inzision am 5'-Ende der geschädigten DNA verantwortlich ist, ist die Expression und Funktionalität dieses Proteins essenziell für eine funktionelle NER (Reed, 1998). Eine Überexpression dieses Proteins korreliert mit einer Platin-Resistenz (Arnould *et al.*, 2003). In Kolonkarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass eine induzierte Cis-(1,2-GpG)-Addukt Formation zu vermehrter Apoptose führt, die mit einer reduzierten Expression des NER Faktors ERCC1 verbunden war (Balin-Gauthier *et al.*, 2008). Ob die DNA-Reparatur durch SA beeinflusst wird, bleibt offen und muss in weiterführenden Analysen analysiert werden (Abschnitt 5). Ein Beispiel für die Modulation der NER zur Potenzierung der antitumorigenen Wirkung von Zytostatika ist der Naturstoff Triptolid. Dabei bindet der

Naturstoff an XPB, eine Komponente des TFIIH Transkriptionsfaktors, und inhibiert dessen ATPase-Aktivität (Titov *et al.*, 2011). Diese Inhibierung resultiert in einer Hemmung der RNA-Polymerase II-vermittelten Transkriptionsinitiation und der NER. Durch die Beeinträchtigung der NER und der somit verminderten Reparatur von DNA-Schäden ist Triptolid in der Lage, die Cis-induzierte Apoptose zu potenzieren (Wang *et al.*, 2015). Bei einer erhöhten Anzahl an Cis-(1,2-GpG)-Addukten wäre auch eine erhöhte Menge an γ H2AX-Foci, also DSBs, zu erwarten, da eine Blockade der Replikation durch die Cis-(1,2-GpG)-Addukte zu einer Bildung von DSBs beiträgt. Dies konnte jedoch bei entsprechenden Analysen in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Dies liegt mutmaßlich entweder an einer bereits erfolgten DSB-Reparatur oder die DSB sind zu dem getesteten Zeitpunkt nicht detektierbar.

Es wäre des Weiteren ebenfalls eine Möglichkeit, dass der Naturstoff SA die Cis-(1,2-GpG)-Addukte bindet und eine Reparatur verhindert. Dafür sprechen die erhöhte Menge an Cis-(1,2-GpG)-Addukten und der damit einhergehenden Proteinmenge an γ H2AX. Die Wirkweise von SA könnte möglicherweise mit der nukleären *high mobility group* (HMG) Proteine vergleichbar sein. Diese binden an Cis-DNA-Addukte und behindern deren Reparatur. Dabei wird der DNA-Schaden von Faktoren der DNA-Reparatur abgeschirmt und kann dann nicht repariert werden (Huang *et al.*, 1994; Reeves *et al.*, 2005). Um die Hypothese einer vergleichbaren Wirkweise von SA und der HMG-Proteine in einer jeweiligen Kombinationsbehandlung mit Cis zu prüfen, müsste untersucht werden, ob die durch Cis-induzierte Menge an γ H2AX durch eine Überexpression der HMG-Proteine im gleichen Maß wie durch SA beeinflusst wird.

Die Effekte von SA auf die einzelnen Mechanismen der DDR sind sehr komplex (Abbildung 3.7 und Tabelle 3.2). Es zeigte sich in den Western Blot-Analysen, dass es sowohl in der Mono- als auch in der Kombinationsbehandlung zu einer vermehrten Phosphorylierung von RPA32 kommt. Die Aktivierung dieses Proteins steht im Zusammenhang mit dem Auftreten von replikativem Stress (Nam *et al.*, 2011; Marechal *et al.*, 2013). Dabei kommt es durch einen DNA-Schaden zur Beeinflussung der DNA-Replikation, die DNA-Synthese verlangsamt sich, sodass der Prozess zum Erliegen kommt (Desany *et al.*, 1998). Dies wird ebenfalls durch das vermehrte Auftreten der Cis-(1,2-GpG)-Addukte bestätigt, weist jedoch auch darauf hin, dass SA allein replikativen Stress erhöht. Ob SA in diesem Zusammenhang einen Einfluss auf die DNA-Synthese besitzt, kann über die Detektion fluoreszenzmarkierter Nukleoside untersucht werden (Abschnitt 5). Des Weiteren zeigte sich im Vergleich zu Cis oder Doxo allein eine reduzierte Phosphorylierung von Proteinen, die an dem ATM-CHK2-Signalweg

(Abbildung 1.9) beteiligt sind, was darauf schließen lässt, dass die Anzahl der von der Zelle detektierten DSBs reduziert wird. Eine weitere Erklärung für eine reduzierte Phosphorylierung könnten ebenso eine verminderte Kinasenaktivität der beteiligten Kinasen oder eine Störung der Weiterleitung des Signals nach dem DNA-Schaden sein. In diesem Zusammenhang ist eine Beeinflussung der DNA-Schadenserkennung durch ATM und ATR jedoch unwahrscheinlich, da es zu einer vermehrten S139 Phosphorylierung von H2AX kommt. Um dies zu bestätigen, müssten jedoch weitere Analysen durchgeführt werden. Der Einfluss auf die Kinasenaktivität könnte mit Hilfe eines Proteinkinase-Assays analysiert werden. Dabei wird eine rekombinante Proteinkinase, z. B. CHK2, mit einer Mischung aus einem radiomarkiertem ATP, einem unmarkiertem ATP und einem Kinasesubstrat inkubiert. Nach der Reaktion wird der Transfer des markierten ATP auf das Substrat mit Hilfe von Szintigrafie detektiert (Aly *et al.*, 2008). Dieser Assay liefert Informationen über die Aktivität einzelner Kinasen und die Aktivierung folgender Substrate.

Auffällig in den Western Blot-Analysen ist ebenfalls der Einfluss von SA auf die Phosphorylierung von CHK1 und CHK2 in beiden Kombinationsbehandlungen. Es lässt sich vermuten, dass es durch die verminderte Aktivierung der Checkpoint-Kinasen zu einer verminderten Aktivierung der Zellzykluskontrollpunkte kommt (Sorensen *et al.*, 2003; Carrassa *et al.*, 2009; Carrassa *et al.*, 2011). Dazu gehören u. a. der G₁/S- und der G₂/M-Kontrollpunkt (Shen, 2011). An dem G₁/S-Kontrollpunkt wird vor allem verhindert, dass beschädigte Zellen von der G₁-Phase in die S-Phase eintreten können, da durch diese ein Risiko von DNA-Replikationsfehlern besteht. Die Zellen verbleiben so lange in der G₁-Phase, bis der DNA-Schaden repariert oder der apoptotische Zelltod eingeleitet wird. Der G₂/M-Kontrollpunkt unterbindet das vorzeitige Eintreten der Zellen in die Mitose und stellt sicher, dass keine Zellen mit DNA-Schäden in die Mitosephase eintreten. In dieser Phase können nicht reparierte DSBs und fehlerhaft replizierte DNA zu einer mitotischen Katastrophe und dem Zelltod führen (Castedo *et al.*, 2004). Um zu überprüfen, ob eine verminderte Aktivierung der Zellzykluskontrollpunkte vorliegt, könnte die Expression der *cell division cycle 25* (Cdc25)-Phosphatasen mittels Genexpressionsanalysen untersucht werden. Diese Phosphatasen aktivieren die Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks), die für den Übergang der Zellen in die nächste Zellzyklusphase verantwortlich sind. Eine Inhibierung der Aktivierung des G₂/M-Kontrollpunktes, möglicherweise durch eine Beeinflussung der Cdc25-Phosphatasen oder der Cdks, könnte ebenfalls erklären, weshalb der durch Doxo-ausgelöste Zellzyklusblock in der G₂/M-Phase in Anwesenheit von SA vermindert wird (Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10).

Des Weiteren ist davon auszugehen, dass die Schädigung der DNA vermehrt zum Zelltod führt, da die Kombinationsbehandlung mindestens additive zytotoxische Effekte in den Pankreaskarzinomzellen aufweist (Abbildung 3.8 sowie Abbildung 8.14 und Abbildung 8.15 des Anhangs). Dieser Zelltod wird durch Apoptose ausgelöst, da sowohl die SubG1-Fraktion wie auch die Spaltung und Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 nach dieser Behandlung gesteigert werden (Abbildung 3.9, Abbildung 3.10, Abbildung 3.12 und Abbildung 3.13). Dies konnte ebenfalls durch verschiedene Studien anderer Arbeitsgruppen gezeigt werden. SA inhibiert die Proliferation von HL-60-Zellen zeit- und dosisabhängig und induziert Caspase-abhängige Apoptose (Li *et al.*, 2012). Unklar bleibt jedoch, ob die in dieser Arbeit gezeigten Apoptoseantworten über den extrinsischen oder den intrinsischen Apoptoseweg ablaufen, was in weiterführenden Analysen zu untersuchen ist (Abschnitt 5).

In einer Studie von Özenver *et al.* wurde bewiesen, dass SA in U2OS-Zellen zu einer verminderten Anzahl an Tubulin-Filamenten führt, indem die Tubulinpolymerisation verhindert wird (Özenver *et al.*, 2020). Durch eine Inhibierung der Tubulinpolymerisation können keine Mikrotubuli mehr ausgebildet werden und eine Verteilung der Chromosomenpaare auf die Tochterzellen ist nicht mehr möglich, weshalb es zum Zelltod kommt. Die Resultate der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigen jedoch keinen Einfluss von SA auf die Menge an Zellen in der Mitose (Abbildung 3.11). Ein Einfluss auf den Zellzyklus, der durch einen Effekt auf die Mikrotubuli zu erwarten war, konnte in den durchflusszytometrischen Analysen ebenfalls in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. In weiteren Untersuchungen müsste geklärt werden, ob die Tubulinpolymerisation in den getesteten Pankreaskarzinomzellen ebenfalls vermindert wird (Abschnitt 5). Poruchynsky *et al.* haben darüber hinaus beschrieben, dass Mikrotubuli an der Rekrutierung bestimmter Reparaturfaktoren beteiligt sein können (Poruchynsky *et al.*, 2015). Somit ist eine weitere zu überprüfende These zum Wirkmechanismus von SA, dass dieser Naturstoff möglicherweise über die Beeinflussung der Mikrotubuli zu einer verminderten Reparatur führt. Dies würde einerseits die vermehrte Addukt-Formation in der Kombination mit Cis erklären und andererseits aufdecken, weshalb es in der Kombination mit Doxo zu einer vermehrten Menge an γ H2AX, jedoch zu keiner vermehrten Bildung von DSBs kommt.

Darüber hinaus wird eine Inhibierung des Wachstums von hepatozellulären Karzinomzellen durch eine Beeinflussung diverser Signalwege durch SA beschrieben. Dazu gehört z. B. die Aktivierung des intrinsischen Mitochondrien-vermittelten apoptotischen Zelltods als auch die Inaktivierung des PI3K/AKT/ β -Catenin Signalweges

und die Reduzierung der antiapoptotischen Faktoren Mcl-1/Bcl-2 (Gao *et al.*, 2017, Xie *et al.*, 2019). Dabei ist zu erwähnen, dass die Hauptregulatoren der DDR, dazu zählen ATM, ATR und DNA-PK, zu der Familie der PI3K gehören und somit eine Hemmung dieser durch SA nicht ausgeschlossen werden kann. Für weiterführende Studien ist von besonderer Bedeutung, dass für SA eine *in vivo* antitumorogene Wirkung in einem HCC-Mausmodell nachgewiesen werden konnte (Xie *et al.*, 2019). Die beschriebene biologische Aktivität *in vivo* ist ein Hinweis auf eine ausreichende Bioverfügbarkeit von SA.

Zur Überprüfung der These, ob der detektierte zytotoxische Effekt zelltypübergreifend ist, wurden Vitalitätsuntersuchen in Tumorzellen diverser Herkunft durchgeführt. Es konnte dabei gezeigt werden, dass SA ebenfalls eine antitumorogene Wirkung auf Kolon- und Lungenkarzinomzellen besitzt. Lediglich die Triple-negativen Brustkrebszellen scheinen weniger sensitiv zu sein (Abbildung 3.17). Die geringe Wirksamkeit von SA auf die Triple-negativen Brustkrebszellen konnte ebenfalls durch Özenver *et al.* bestätigt werden. Die Analysen zeigten, dass Leukämiezellen und multiple Myelomzellen am sensitivsten auf die Behandlung mit SA reagieren (Özenver *et al.*, 2020).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass SA in der Kombination sowohl mit Cis als auch mit Doxo in der Lage ist, die Menge an γ H2AX zu erhöhen und somit die DDR zu modulieren. Dabei kommt es jedoch zu keiner Beeinflussung der DNA-Schadensmenge. Es gibt Hinweise darauf, dass SA möglicherweise die DNA-Reparatur sowohl in der Kombination mit Cis als auch mit Doxo hemmt und dadurch Zelltodmechanismen induziert. Ebenso ist eine verminderte Aktivierung des G₂/M-Kontrollpunktes durch SA in der Kombination mit Cis bzw. Doxo nicht ausgeschlossen.

4.1.2.2 5-epi-Nakijiquinone Q

Der Naturstoff *5-epi-Nakijiquinone Q* (NQ) findet seinen Ursprung in dem Schwamm *Dactylosporgia metachromia* (Daletos *et al.*, 2014). NQ wirkt auf die getesteten Pankreaskarzinomzellen zytotoxisch (Abbildung 3.1). Sowohl in der Mono- als auch in der Kombinationsbehandlung zeigte sich in dieser Arbeit eine Potenzierung der γ H2AX-Fluoreszenzintensität und der entsprechenden Proteinmenge (Abbildung 3.2, Abbildung 3.3 und Tabelle 3.1). Ebenso ist die Menge an kolokalisierten γ H2AX/pATM-Foci, als Hinweis auf DSBs, in der Kombinationsbehandlung aus NQ und Doxo erhöht (Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5 sowie Abbildung 8.9, Abbildung 8.10, Abbildung 8.11 und Abbildung 8.12 des Anhangs). Dies lässt die Annahme zu, dass die im Vergleich zur Doxo-Monobehandlung vermehrte Menge an γ H2AX durch eine verstärkte Ausbildung von DSBs hervorgerufen wird. Bei der Untersuchung des Einflusses von NQ auf diverse, an der Regulation von Tumorwachstum und Metastasierung beteiligten Proteinkinasen wurde u. a. eine Inhibierung der fokalen Adhäsionskinase festgestellt (FAK) (Daletos *et al.*, 2014). FAK ist eine nicht-rezeptorassoziierte Tyrosinkinase, die durch das Gen PTK-2 kodiert wird. Bei Tumoren wie z. B. malignen Melanomen oder Brusttumoren, wurde festgestellt, dass eine vermehrte Expression und Aktivität von FAK mit der Metastasierung der Tumore korrelieren (Weiner *et al.*, 1993; Owens *et al.*, 1995; Okamoto *et al.*, 2003; Hess *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2010), sowie zu einer schlechteren Prognose für die Behandlung führt (Pylayeva *et al.*, 2009). Tang *et al.* haben in ihrer Studie gezeigt, dass eine Inhibierung der FAK zu einer erhöhten Menge von γ H2AX führt und dadurch Zellen gegenüber Strahlung resensitiviert (Tang *et al.*, 2016). Dieser Zusammenhang konnte durch Tavora *et al.* bestätigt werden. In *in vivo*-Experimenten wurde eine erhöhte Menge an γ H2AX-Foci nach der Behandlung einer FAK-defizienten Maus mit Doxo detektiert (Tavora *et al.*, 2014). Es lässt sich aufgrund dieser bereits publizierten Daten vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen einer Inhibierung der FAK und einer vermehrten Ausbildung der Doxo-induzierten DSBs durch NQ besteht. Bei der Bestimmung der Vitalität nach der Kombinationsbehandlung von NQ und Cis oder Doxo konnten, je nach Dosis, additive bis synergistische zytotoxische Effekte in den Pankreaskarzinomzellen detektiert werden (Abbildung 3.8 sowie Abbildung 8.14 und Abbildung 8.15 des Anhangs). Auch eine Potenzierung des antineoplastischen Effektes wurde nach Inhibierung von FAK beschrieben. Die Chemosensitivität von Gemcitabin wurde durch Inhibierung von FAK in Pankreaskarzinomzellen *in vitro* sowie in einem Xenograftmodell erhöht (Duxbury *et al.*, 2003). Darüber hinaus sensitiviert die Hemmung der Expression von FAK mittels siRNA die ovariellen Krebszellen gegenüber Docetaxel durch die Förderung der durch Docetaxel ausgelöste Wachstumsinhibition und der Apoptose (Halder *et al.*, 2005). Ebenso wurde eine Potenzierung der

antitumorigenen zytotoxischen Wirkung von Cis und Etoposid durch Wu *et al.* beschrieben (Wu *et al.*, 2006).

Diese Studien stehen in Einklang mit der durchflusszytometrischen Analyse in dieser Arbeit. Dabei zeigte sich eine erhöhte Anzahl an Zellen in der SubG1-Fraktion nach der Kombinationsbehandlung von NQ und Cis (Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10). Eine vermehrte Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 deutet ebenfalls auf einen vermehrten Zelltod durch Apoptose hin (Abbildung 3.12 und Abbildung 3.13). Darüber hinaus gibt es Studien, die eine verminderte Reparaturkapazität durch die Inhibierung von FAK zeigen (Tang *et al.*, 2016). Dies könnte der Grund für eine tendenziell erhöhte Formation von Cis-(1,2-GpG)-Addukten sein (Abbildung 3.15). Um den Einfluss von NQ auf die DNA-Reparatur sowie auf die FAK zu überprüfen, müssen weitere Experimente diesbezüglich durchgeführt werden (Abschnitt 5).

Bei den durch Daletos *et al.* durchgeführten Studien wurde neben der Inhibierung der FAK auch eine Inhibierung der Aurorakinase B als auch der *NIMA-related kinase* (NEK) detektiert (Daletos *et al.*, 2014). Diese Kinasen interagieren mit der DNA-Reparatur, vor allem der DNA-Reparatur von DSBs (Pelegri *et al.*, 2010; Amaral *et al.*, 2016). Aurorakinasen spielen eine wichtige Rolle bei der Zellteilung und der Segregation der Chromosomen (Magnaghi-Jaulin *et al.*, 2019). Darüber hinaus sind Aurorakinasen an der Aktivierung der DNA-Schadenskontrollpunkte beteiligt und können den Eintritt von der G₁- in die S-Phase bzw. von der G₂- in die M-Phase regulieren (Ma *et al.*, 2020). Es wurde nachgewiesen, dass eine Inhibition dieser Kinase zu einer Aufhebung des G₂/M-Kontrollpunktes und zu polyploiden, seneszenten Tumorzellen führt (Gürtler *et al.*, 2010). Deshalb spricht für eine mögliche Wirkung von NQ auf die Aurorakinase B, dass der durch Doxo-induzierte prozentuale Anteil der Zellen in der G₂/M-Phase durch die Behandlung mit dem Naturstoff reduziert wird und die Zellen trotz DNA-Schäden in die M-Phase eintreten (Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10). Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass der prozentuale Anteil der pH3-positiven Zellen, also der sich in der M-Phase befindliche Anteil an Zellen, nach einer Kombinationsbehandlung nicht gesteigert wird (Abbildung 3.11). In weiteren Experimenten muss demnach überprüft werden, welche regulatorischen Faktoren des Zellzyklus durch NQ in den Pankreaskarzinomzellen beeinflusst werden. Dazu könnte, neben der Wirkung von NQ auf die Aurorakinase selbst, u. a. die Aktivierung von Cdc25 bestimmt werden.

Die von Stahl *et al.* durchgeführte Studie hat darüber hinaus gezeigt, dass NQ als Inhibitor der Her-2/Neu-Rezeptortyrosinkinasen agiert (Stahl *et al.*, 2001). In diesem

Zusammenhang ist nennenswert, dass von Rezeptortyrosinkinasen-stammende Signale durch eine Wirkung auf die DNA-Reparatur, im Speziellen auf die NHEJ, zu einer Beeinflussung der Strahlenresistenz von Tumorzellen geführt haben (Toulany *et al.*, 2006). Dabei spielt vor allem der PI3K/AKT-Signalweg eine Rolle. PI3K und AKT übermitteln hauptsächlich Wachstumssignale und verhindern den apoptotischen Zelltod (Semba *et al.*, 2003; Takeda *et al.*, 2004). Die Aktivierung dieses Signalweges erfolgt, wie bereits erwähnt, durch Rezeptortyrosinkinasen wie beispielsweise dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) und den G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) sowie dem *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1) (LoPiccolo *et al.*, 2008). In vielen Tumoren ist eine Aktivierung dieses Signalweges zu finden, die in Zusammenhang mit Chemoresistenz sowie einer schlechten Behandlungsprognose steht (Ediriweera *et al.*, 2019; Lheureux *et al.*, 2019). Aus diesem Grund wurden diverse Inhibitoren des PI3K/AKT-Signalwegs zur Behandlung dieser Tumore erforscht. Für NQ wurde bereits eine Inhibierung des IGF-1 beschrieben, was Hinweise auf eine Inhibition des PI3K/AKT-Signalwegs gibt. Auch Kombinationstherapien mit DDR-modulierenden Substanzen sind von Interesse, da die Hauptregulatoren der DDR, wie bereits erwähnt, zu der Gruppe der *PI3K-like kinases* (PIKKs) gehören. Bei der Western Blot-Analyse zeigte sich eine vermehrte Phosphorylierung von RPA32 sowohl durch die NQ-Monobehandlung als auch eine im Vergleich zu dem jeweiligen Zytostatikum verstärkte Phosphorylierung in den Kombinationsbehandlungen. Dies deutet auf vermehrten replikativen Stress hin. Ein weiteres Indiz für die Inhibierung der DNA-Replikation durch geschädigte DNA zeigte sich im Comet-Assay. Eine Monobehandlung mit NQ führt zu einer vermehrten Menge an Schweif-DNA (Abbildung 3.6). Als Konsequenz des gesteigerten replikativen Stresses wird die Menge an spontan entstehenden DNA-Schäden potenziert, was in der gesteigerten Menge an γ H2AX sichtbar wird (Abbildung 3.2 und Abbildung 3.3). Dies könnte in Zusammenhang mit einer Modulierung des PI3K/AKT-Signalwegs stehen. Lamm *et al.* haben in einer präklinischen Studie bewiesen, dass eine Inhibierung des PI3K-Signalweges zu einer Induktion von Replikationsstress führt (Lamm *et al.*, 2019). Der durch die Inhibierung des PI3K/AKT-Signalwegs induzierte Replikationsstress und die vermehrten DNA-Schäden stehen in BRCA1-defizienten Triple-negativen Brustkrebszellen in Zusammenhang mit einer Depletierung der für die DNA-Synthese benötigten Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) (Juvekar *et al.*, 2016).

Zur Überprüfung, ob der detektierte zytotoxische Effekt zelltypübergreifend ist, wurden Vitalitätsuntersuchen in Tumorzellen diverser Herkunft durchgeführt. Es konnte dabei gezeigt werden, dass NQ ebenfalls eine antitumorogene Wirkung auf Kolon-, Lungenkarzinomzellen und auf Triple-negative Brustkrebszellen besitzt

(Abbildung 3.17). Darüber hinaus wurde in verschiedenen Studien ein antineoplastisches Potenzial in murinen Lymphomzellen (Daletos *et al.*, 2014) sowie in diversen humanen Leukämie- und Lymphomzellen festgestellt (Mayer *et al.*, 2019).

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen deuten darauf hin, dass es durch NQ möglicherweise zu einer Beeinflussung der FAK und des PI3K/AKT-Signalwegs kommt. Pylayeva *et al.* haben in ihren Untersuchungen bereits festgestellt, dass FAK eine wichtige Rolle in der Ras- und PI3K-abhängigen Tumorigenese spielt (Pylayeva *et al.*, 2009). Somit stehen die Resultate keineswegs im Gegensatz zueinander, sondern könnten die diversen Effekte von NQ auf die Pankreaskarzinomzellen begründen. Dabei könnte die Inhibierung des PI3K/AKT-Signalwegs in einer Mono- sowie einer Kombinationsbehandlung zu replikativem Stress führen. Gleichzeitig führt eine Inhibierung der FAK zu einer Reduktion der DNA-Reparatur und potenziert die Menge an Zytostatika-induzierten DNA-Schäden. Dies würde sowohl die induzierte Phosphorylierung von RPA32 als auch die gesteigerte Menge von γ H2AX in Mono- und in der Kombinationsbehandlung erklären.

4.1.2.3 5-epi-Ilimaquinone

5-epi-Ilimaquinone (IQ) findet seinen Ursprung in dem marinen Schwamm *Dacylosporgia metachromia* (Carte *et al.*, 1985). Die IC₅₀ in den getesteten Pankreaskarzinomzellen liegt im Bereich zwischen 1 und 10 µM (Abbildung 3.1). Es wurden Vitalitätsuntersuchungen in Tumorzellen diverser Herkunft durchgeführt um zu überprüfen, ob der detektierte zytotoxische Effekt zelltypübergreifend ist. Dabei konnte gezeigt werden, dass die antitumorigene Wirkung von IQ im Vergleich zu den Pankreaskarzinomzellen in Kolon-, Lungenkarzinomzellen und in Triple-negativen Brustkrebszellen weniger effektiv ist (Abbildung 3.17). In der Literatur wurde darüber hinaus bereits eine zytotoxische Aktivität in Melanomzellen aufgeführt (Rodríguez *et al.*, 1992). Für die Leitsubstanz von IQ, *Ilimaquinone*, wurden diverse biologische Aktivitäten u. a. eine antiinflammatorische und antivirale Wirkung, beschrieben (Loya *et al.*, 1990; Kiem *et al.*, 2017).

Die Befunde der Analyse des Einflusses von IQ auf die γ H2AX-Fluoreszenzintensität zeigen sich sowohl in der Mono- als auch in der Kombinationsbehandlung eine Potenzierung der Intensität im Vergleich zu der jeweiligen Kontrolle (Abbildung 3.2 und Tabelle 3.1). Dies spricht für eine Modulierung der DDR (Olive, 2004). Die Resultate der Proteinmengenbestimmung des phosphorylierten H2AX nach Mono- bzw. Kombinationsbehandlung mit Cis oder Doxo stimmen nicht vollständig mit der Steigerung des γ H2AX-Fluoreszenzsignals überein. Hier ist im Vergleich eine vermehrte Menge an γ H2AX in der Kombinationsbehandlung aus IQ und Doxo zu finden (Abbildung 3.3). Für *Ilimaquinone*, der Leitsubstanz von IQ, wurde eine Aktivierung von H2AX durch eine Behandlung mit *Ilimaquinone* in Plattenepithelkarzinomzellen nachgewiesen (Lin *et al.*, 2020). In diesem Kontext ist zu erwähnen, dass dabei auch die Expression von H2AX durch die *Ilimaquinone* erhöht ist. Darüber hinaus weist das Ergebnis der Analyse der nukleären γ H2AX-Foci darauf hin, dass die DDR bei der Kombinationsbehandlung aus IQ und Cis im Vergleich zur Cis-Monobehandlung vermehrt aktiviert wird und es sich bei den ursächlichen Schäden möglicherweise um DSBs handelt (Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5 sowie Abbildung 8.9, Abbildung 8.10, Abbildung 8.11 und Abbildung 8.12 des Anhangs). Ferner ist zu berücksichtigen, dass im Comet-Assay keine signifikante, jedoch tendenziell gesteigerte Menge der DNA im Schweif nach der Monobehandlung detektiert werden konnte (Abbildung 3.6). Neben DSBs können mit Hilfe des alkalischen Comet-Assays auch Einzelstrangbrüche (SSBs) und alkalilabile Stellen detektiert werden. Diese Befunde lassen die Vermutung zu, dass IQ in der Monobehandlung in der Lage ist, die DNA zu schädigen, es sich bei den DNA-Schäden aber nicht ausschließlich um DSBs handeln muss. Sowohl aus den Resultaten

der Analyse des Doxo-Transportes, in und aus der Zelle, als auch der Cis-Adduktbildung geht hervor, dass die ermittelten Ergebnisse in keinem Zusammenhang mit diesen Faktoren stehen (Abbildung 3.16).

Das Ergebnis der Untersuchung der an der DDR-beteiligten Proteine zeigte eine pleiotrope Beeinflussung der DDR. Dabei ist die Phosphorylierung von ATR in der Monobehandlung mit IQ dominant. In der Kombinationsbehandlung aus IQ und Cis wird die durch Cis-induzierte Phosphorylierung von ATR aufgehoben bzw. reduziert (Abbildung 3.7). Doxo steigert die Phosphorylierung von CHK1, die in der Kombinationsbehandlung mit IQ und Doxo verstärkt wird. Eine Aktivierung von CHK1 führt über den Abbau von Cdc25 und der damit einhergehenden fehlenden Aktivierung der Cdk's zu einem Zellzyklusarrest in der G₁- oder G₂-Phase, wodurch eine DNA-Reparatur ermöglicht wird (Zhang *et al.*, 2014). Die verlängerte Reparaturphase führt möglicherweise zu einer vermehrten Reparatur der durch Doxo hervorgerufenen DNA-Schäden, sodass es zwar zu einer DNA-Schadenserkenkung durch ATM oder ATR und infolgedessen zu einer Aktivierung von H2AX kommt, die für die Formation von DSBs-spezifischen γ H2AX-Foci jedoch nicht mehr detektierbar sind. Entgegen der Erwartung, dass eine vermehrte Phosphorylierung von CHK1, hervorgerufen durch eine Behandlung mit IQ und Doxo, zu einer vergrößerten Menge der Zellen in der G₂/M-Phase verglichen zur Doxo-Monobehandlung führt, deuten die Befunde der durchflusszytometrischen Analyse auf eine Reduzierung der Zellen in der G₂/M-Phase hin (Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10). Möglicherweise bewirkt IQ eine Verlangsamung des Zellzyklus, sodass eine Anhäufung der Zellen in der G₂/M-Phase nach Doxo-Behandlung zu dem Analysezeitpunkt nicht detektiert werden kann. Dies muss in weiteren Analysen, die die Auswirkung von IQ auf den Zellzyklus untersuchen, bestimmt werden (Abschnitt 5).

Die Aktivierung und Aktivität der an der Apoptose beteiligten Effektorcaspasen 3 und 7 wurden in dieser Arbeit mittels Western Blot-Analysen und des Apo-ONE[®]-Assays analysiert. Dabei zeigte sich durch IQ basal kein Einfluss auf die Aktivierung als auch die Aktivität der Caspasen. Boufridi *et al.* beschrieben bei der Analyse der Caspasenaktivität in Uterussarkomzellen, dass IQ allein die Aktivität der Effektorcaspasen dosisabhängig erhöht (Boufridi *et al.*, 2016). Dabei ist die Konzentration von IQ im Vergleich zu der in dieser Arbeit verwendeten Konzentration deutlich höher. Um dies auch in den Pankreaskarzinomzellen zu detektieren, müsste die Dosis möglicherweise angepasst werden. In der vorliegenden Arbeit reduziert IQ die Aktivität der Caspasen nach 72-stündiger Kombinationsbehandlung mit Doxo im

Vergleich zur Doxo-Monobehandlung, weist jedoch nur einen geringen Einfluss auf die Spaltung der Caspasen auf (Abbildung 3.12 und Abbildung 3.13). Dabei ist zu berücksichtigen, dass die mit Hilfe der Western Blot-Analysen bestimmte Spaltung der Caspasen durch die Initiatorcaspasen ausgelöst wird und die Effektorcaspasen in ihre aktivierte Form spaltet. Die aktivierten Effektorcaspasen ihrerseits führen die Apoptose über den kontrollierten Abbau der Zellbestandteile durch. Der Abbau der Zellbestandteile spiegelt sich in der über den Apo-ONE[®]-Assay ermittelte Aktivität der Caspasen wider. Aus diesem Grund wäre eine Inhibierung der Caspasenaktivität durch IQ in der Kombinationsbehandlung mit Doxo möglich, ohne dass die Spaltung der Caspasen beeinflusst wird. Dies unterstützt jedoch nicht die Resultate der durchflusszytometrischen Analysen (Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10). IQ induziert weder einen Anstieg der Zellen in der SubG1-Fraktion in der Monobehandlung, noch beeinflusst IQ die erhöhte Menge der Zellen in der SubG1-Fraktion nach einer Cis- oder Doxo-Behandlung, was nach einer verminderten Aktivität der Caspasen erwartet worden wäre. Die Resultate der Vitalitätsbestimmung nach Kombinationsbehandlungen stehen jedoch in Einklang mit den Befunden der Caspasenaktivitätsbestimmung (Abbildung 3.8 sowie Abbildung 8.14 und Abbildung 8.15 des Anhangs). Dabei treten je nach Konzentration zwar vereinzelt synergistische zytotoxische, aber auch antagonistische zytotoxische Effekte auf. Eine verminderte Caspasenaktivität durch IQ in der Kombinationsbehandlung mit Doxo führt womöglich im Vergleich zur Doxo-Monobehandlung zu einer reduzierten Apoptose und kann somit zu einer verringerten Reduktion der Vitalität durch die Kombinationsbehandlung beitragen. Zur Überprüfung dieser Vermutung müssten weiterführende Analysen durchgeführt werden, die genauere Informationen über die an der Apoptose beteiligten Faktoren, wie z. B. der Initiatorcaspasen 2, 8, 9 oder 10, liefern.

Für die Leitsubstanz *Ilimaquinone* wurden diverse Wirkmechanismen beschrieben. Die Substanz induziert die Hochregulierung und die nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors GADD153 (*Growth arrest- and DNA damage-inducible gene*) (Lu *et al.*, 2007). Des Weiteren potenziert *Ilimaquinone* die TRAIL-induzierte Apoptose in Kolonkarzinomzellen (Do *et al.*, 2014). Diese Steigerung geht mit einer erhöhten Aktivierung der Caspase 3, einer vermehrten PARP-Spaltung sowie DNA-Schäden einher. *Ilimaquinone* allein reduziert die Menge an den antiapoptotischen Proteinen BCL2 und BCL-XL. Darüber hinaus wurde in der Studie von Do *et al.* eine vermehrte Menge an intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) detektiert. Die gesteigerte ROS-Produktion konnte durch die Studien von Kwak *et al.* und Lin *et al.* bestätigt werden (Kwak *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2020). Die Arbeitsgruppen haben beschrieben, dass eine

Behandlung mit *Ilimaquinone* in Lungenkarzinomzellen und Plattenepithelkarzinomzellen ebenfalls zu einer gesteigerten ROS-Produktion führt. Zusätzlich belegen die Befunde von Kwak *et al.*, dass es zu einer Depolarisierung der Mitochondrienmembran kommt, die in apoptotischem Zelltod resultiert (Kwak *et al.*, 2020). Die durch ROS entstehenden DNA-Basenmodifikationen werden hauptsächlich über die Basenexzisionsreparatur (BER) repariert (Christmann *et al.*, 2003). In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass für *Ilimaquinone* eine Hemmung der Aktivität der an der BER-beteiligten DNA-Polymerase β (Pol β) beschrieben wurde (Cao *et al.*, 2004). Diese molekularen Wirkungen von *Ilimaquinone* könnten ebenfalls für die in der vorliegenden Studie beobachteten biologischen Effekte des Isomers IQ von Bedeutung sein. Die detektierten Effekte von IQ auf die in dieser Arbeit untersuchten Pankreaskarzinomzellen könnten möglicherweise durch ROS verursacht sein. Sowohl für Cis als auch für Doxo wurde nachgewiesen, dass diese Chemotherapeutika zu einer Induktion von ROS führen (Conklin, 2004; Marullo *et al.*, 2013). Es ist bekannt, dass die durch Cis verursachten mitochondrialen DNA-Schäden wesentlich an dessen Zytotoxizität beteiligt sind. Ebenfalls wird der Einfluss der Mitochondrien auf die Ausübung der Toxizität von Doxo diskutiert (Mordente *et al.*, 2012). Es lässt sich daher vermuten, dass die vermehrte ROS-Produktion zu mehr oxidativen DNA-Schäden führt und an der vermehrten Aktivierung von H2AX beteiligt ist. Dies steht im Einklang mit der im Comet-Assay ermittelten tendenziell erhöhten Menge der Schweif-DNA (Abbildung 3.6). Ob IQ zu einer vermehrten ROS-Produktion führt, muss in weiteren Analyseschritten untersucht werden (Abschnitt 5).

4.2 Adverse Effekte in der konventionellen Tumortherapie

Zytostatika hemmen die Tumorzellteilung durch ihre Wirkung auf die DNA-, RNA- oder Proteinsynthese oder auf bestimmte Proteine, die ebenfalls in Zusammenhang mit der Proliferation stehen. Durch diese Beeinflussung entsteht eine antiproliferative (zytostatische) Wirkung. Klassische Zytostatika wirken daher hauptsächlich auf stark proliferationsaktive Zellen (Abschnitt 1.2). Zu diesen gehören nicht nur die Tumorzellen, sondern auch nicht-maligne Zellen, die durch ihre hohe Proliferationsgeschwindigkeit gekennzeichnet sind. Die dadurch bedingten, teils schwerwiegenden Nebenwirkungen im Normalgewebe treten vor allem im Knochenmark, in den Schleimhäuten und in den Haarfollikeln auf. Magen-Darm-Beschwerden wie Übelkeit und Erbrechen zählen zu den häufigsten Nebenwirkungen. Darüber hinaus ist zu beachten, dass die hohe Mutagenität und Kanzerogenität einiger Zytostatika, z. B. durch Alkylanzien, die Entstehung von Zweitumoren nach einer gewissen Latenzperiode (Monate, Jahre) begünstigen (Luqmani, 2005). Die Zytostatikatoxizitäten treten meist substanz- bzw. klassentypisch auf. Anthrazyline, wozu Doxorubicin gehört, sind durch die irreversible kardiotoxische Wirkung charakterisiert. Darüber hinaus sind vor allem die Nephro-, Oto- bzw. Neurotoxizität typisch für Platinkomplexe, besonders für Cisplatin (Abschnitt 1.2.1.1) (Yao *et al.*, 2007; Schütte *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2011). Starke Nebenwirkungen verhindern die Verwendung einer ausreichend hohen Dosierung des Zytostatikums, weshalb die Tumorzellen nicht restlos abgetötet werden können. Dies begünstigt eine Resistenzentwicklung und kann zu einer unwirksamen Behandlung führen.

Mit Hilfe von Kombinationstherapien soll die zum Abtöten von Tumorzellen benötigte Dosis eines Zytostatikums gesenkt werden, sodass durch eine tolerierbare Dosis möglichst viele Tumorzellen sterben. Ein positiver Nebeneffekt ist dabei, dass eine verminderte Dosis möglicherweise die durch die Therapie auftretenden Nebenwirkungen reduziert. Bei Kombinationsbehandlungen ist es von Vorteil, wenn die Einzelsubstanzen Äquieffektivität und unterschiedliche zytotoxische Wirkmechanismen aufweisen, die in additiven oder synergistischen zytotoxischen Effekten für die Tumorzellen resultieren. Durch die Kombinationstherapien soll ebenfalls das Auftreten resistenter Tumorzellklone minimiert werden (Schütte *et al.*, 2010). Es gibt bereits einige Therapiekombinationen von Zytostatika, die durch ihre synergistischen bzw. additiven Effekte hinsichtlich ihrer antitumorigenen Wirksamkeit gekennzeichnet sind. Es werden u. a. Kombinationen aus Platinderivaten mit Taxanen oder mit Antimetaboliten, aber auch Kombinationen aus Taxanen und Anthrazyklinen eingesetzt (McLeod, 1998; Beijnen *et al.*, 2004; Scripture *et al.*, 2006). Zusätzlich sind Interaktionen mit anderen Wirkstoffen, wie z. B. Naturstoffen, zu berücksichtigen. Deshalb wurde in dieser Arbeit auch der Frage nach

der pharmakologischen Modulierbarkeit der Zytostatika-induzierten Stressantwort in Normalgewebszellen durch die ausgewählten Naturstoffe nachgegangen.

4.2.1 Wirkung von Naturstoffen in der Kombinationstherapie auf Nicht-Tumorzellen

Wie bereits erwähnt sind neben der fehlenden Wirksamkeit der Tumortheraeutika ebenfalls die dosislimitierenden Nebenwirkungen ein Problem bei der Behandlung von malignen Tumoren. Aus diesem Grund sind Naturstoffe nicht nur eine Möglichkeit, um Tumorzellen gegenüber den Zytostatika zu resensitivieren und/oder die erlangte Resistenz zu überwinden, sondern repräsentieren ebenfalls eine Quelle für neue Substanzen, die in der Lage sind, Normalgewebe vor lebensbedrohlichen Nebenwirkungen zu schützen und die Lebensqualität beeinträchtigenden Effekte der Chemotherapeutika zu reduzieren (Nobili *et al.*, 2009). Damit sind vor allem solche Substanzen von Interesse, die zur gleichen Zeit die antitumorigene Wirkung der Zytostatika potenzieren sowie das Normalgewebe gegenüber deren zytotoxischen Wirkungen schützen. Dadurch wird das therapeutische Fenster erweitert und das Nutzen-Risiko-Verhältnis verbessert. Ein Beispiel dafür ist die bereits in der Klinik als Lipidsenker verwendete Substanz Lovastatin. Das Statin gehört zu der Gruppe der Monocoline und wurde ursprünglich aus verschiedenen *Aspergillus*-Spezies isoliert.

Dabei konnte bereits belegt werden, dass Lovastatin sowohl zytotoxisch gegenüber Tumorzellen (Agarwal *et al.*, 1999; Feleszko *et al.*, 2000) als auch zytoprotektiv gegenüber Normalgewebe und -zellen wirkt (Bardleben *et al.*, 2002; Fritz *et al.*, 2011; Huelsenbeck *et al.*, 2011; Krüger *et al.*, 2016; Ziegler *et al.*, 2017). Es konnte zudem eine Protektion vor DNA-Schäden in *in vitro* und *in vivo* Studien gezeigt werden (Damrot *et al.*, 2006; Huelsenbeck *et al.*, 2011). Die durch Etoposid bzw. Doxo induzierte DNA-Strangbruchformation konnte durch Lovastatin in primären humanen Endothelzellen verhindert werden (Damrot *et al.*, 2006). *In vivo* konnte die Doxo-induzierte zytotoxische Wirkung auf das Herz sowie auf die Leber durch Lovastatin reduziert werden (Bopp *et al.*, 2013; Henninger *et al.*, 2015). Darüber hinaus konnte für das Alkaloid Aaptamin, isoliert aus einem Meeresschwammextrakt, eine protektive Wirkung gegenüber Cis-geschädigten Nierenzellen und zusätzlich eine Zelltod-auslösende Wirkung in AML-Zellen *in vitro* detektiert werden (Funk *et al.*, 2014; Stuhldreier *et al.*, 2015). Deshalb wurde in dieser Arbeit, zusätzlich zu der Analyse der DDR-modulierenden Wirkung der Naturstoffe auf die Zytostatika-vermittelte antitumorigene Eigenschaft, die Wirkung dieser auf Normalgewebszellen sowie auf primäre Rattenhepatozyten *in vitro*

untersucht. Dabei wurde sowohl der Einfluss von SA, NQ und IQ auf die Vitalität der Normalgewebszellen als auch deren Effekt auf die DDR in Mono- bzw. Kombinationsbehandlung analysiert.

4.2.2 Auswirkung der ausgewählten Naturstoffe auf Nicht-Tumorzellen

4.2.2.1 Secalonic acid F

Die Ergebnisse der Vitalitätsuntersuchungen in NHDF zeigen, dass primäre humane Fibroblasten im Vergleich zu den Pankreaskarzinomzellen weniger sensitiv auf den Naturstoff SA reagieren (Abbildung 3.18 und Tabelle 3.5). Frühere Studien konnten darüber hinaus keine toxische Wirkung auf humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes detektieren (Özenver *et al.*, 2020). Die Befunde der Vitalitätsbestimmung nach einer Kombinationsbehandlungen mit dem Naturstoff und Cis bzw. Doxo zeigten eine antagonistische zytotoxische, also zytoprotektive Wirkung (Abbildung 3.21 und Abbildung 8.18 des Anhangs). Dies gibt Hinweise darauf, dass SA möglicherweise in der Lage ist, die Zytotoxizität von Zytostatika in den nicht-malignen Zellen zu minimieren.

Welchen Effekt SA auf die DDR von Normalgewebszellen besitzt, wurde in bisher publizierten Studien nicht detailliert untersucht. Bei den Analysen hinsichtlich des Effektes von SA auf die Ausbildung von DNA-Schäden und die DDR im Rahmen dieser Arbeit stellte sich heraus, dass dieser zelltypspezifisch ist. Im Gegensatz zu den Pankreaskarzinomzellen zeigt sich in NHDF bei einer Kombinationsbehandlung von SA und Cis bzw. Doxo keine Potenzierung der Proteinmenge von γ H2AX im Vergleich zu der jeweiligen Monobehandlung (Abbildung 3.19). Dies deutet auf eine geringere Aktivierung der DDR in NHDF hin, was einerseits durch eine Reduktion der initialen DNA-Schäden und andererseits durch eine direkte Interaktion von SA mit Mechanismen der DDR begründet werden könnte. Die Resultate der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen zur Bildung von DSBs zeigten, dass SA die Zytostatika-induzierten DSBs-Formation nicht beeinflusst (Abbildung 3.20 sowie Abbildung 8.16 und Abbildung 8.17 des Anhangs). Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse der Western Blot-Analysen, dass die Menge an phosphoryliertem RPA32 in NHDF im Vergleich zu den Pankreaskarzinomzellen reduziert ist (Abbildung 3.19). Dies gibt Hinweise darauf, dass es in den primären Fibroblasten zu weniger replikativem Stress kommt. Es lässt sich daher vermuten, dass die durch SA ausgelöste Reduktion der Abnahme der Vitalität

nach Cis bzw. Doxo in NHDF nicht auf eine Reduktion der DNA-Schadensmenge, sondern vielmehr auf fehlende Beeinflussung der Replikation zurückzuführen ist. Dies spiegelt sich ebenfalls in Cis-(1,2-GpG)-Addukt Formation wider, die in NHDF durch SA nicht moduliert wird (Abbildung 3.24). Außerdem findet eine vermehrte Aktivierung von CHK1 nach der Kombinationsbehandlung von SA und Cis im Vergleich zur Cis-Monobehandlung statt, was möglicherweise eine verlängerte Reparaturphase für die durch Cis gebildeten DNA-Addukte ermöglicht.

Im Gegensatz zu diesen Befunden steht das Ergebnis der durchflusszytometrische Analysen als auch der Untersuchung der Spaltung und Aktivierung der Effektorcaspasen (Abbildung 3.22 und Abbildung 3.23). Diese zeigen keinen protektiven Effekt von SA auf den Cis- bzw. Doxo-induzierten Zelltod. Es lässt sich daher mutmaßen, dass die durch SA verringerte Sensitivität der Zytostatika in NHDF durch andere Mechanismen als der Beeinflussung der DNA-Reparatur hervorgerufen wird. Möglicherweise ist diese nicht effizient genug, sodass die meisten NHDF nach einer Zytostatikabehandlung den Weg der Apoptose durchlaufen und diese nicht wie erwartet reduzieren. Jedoch ist zu erwähnen, dass die Anzahl der Zellen in Apoptose in NHDF in der Kombinationsbehandlung im Vergleich zu den Pankreaskarzinomzellen nicht potenziert wird.

Das Ergebnis der Analyse des Einflusses von SA auf die Vitalität von primären Rattenhepatozyten zeigte leichte hepatotoxische Effekte. Da in den NHDF bei gleichen Dosierungen von SA keine zytotoxischen Effekte entdeckt werden konnten, lässt sich die Bildung toxischer Metabolite des Naturstoffes in den primären Rattenhepatozyten vermuten. Die Entstehung dieser müsste in weiteren Untersuchungen bestätigt werden (Abschnitt 5). Des Weiteren bleibt offen, ob die Unterschiede der zytotoxischen Wirkung sowie der Modulation der DDR zwischen den verwendeten Zelllinien womöglich durch unterschiedliche Transportmechanismen des Zytostatikums begründet sind. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass eine ähnliche Wirkung wie bei den Pankreaskarzinomzellen in NHDF erst bei einer höheren Dosis SA auftritt. Dies würde den Einsatz von SA in der Kombination mit Cis oder Doxo ebenfalls begünstigen.

4.2.2.2 5-epi-Nakijiquinone Q

Aus den Ergebnissen der Vitalitätsuntersuchungen in NHDF lässt sich ableiten, dass die humanen Fibroblasten eine zu den Pankreaskarzinomzellen vergleichbare IC_{50} für NQ besitzen (Abbildung 3.18 und Tabelle 3.5). NQ scheint außerdem ähnlich zytotoxisch auf humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes zu wirken wie auf die in der vorliegenden Studie untersuchten humanen Fibroblasten und Pankreaskarzinomzellen (Mayer *et al.*, 2019). Bei der Analyse der Kombinationsbehandlungen mit Cis zeigte sich eine synergistische zytotoxische, in der Kombination mit Doxo hingegen eine antagonistische zytotoxische Wirkung (Abbildung 3.21 und Abbildung 8.18 des Anhangs). Dies lässt den Schluss zu, dass NQ in NHDF unterschiedliche Einflüsse auf die Cis- bzw. Doxo-induzierte Zytotoxizität besitzt. Dies könnte möglicherweise durch die beobachtete verringerte Ausbildung von DSBs in der Kombination aus NQ und Doxo bedingt sein (Abbildung 3.20 sowie Abbildung 8.16 und Abbildung 8.17 des Anhangs). Die Cis-induzierte Ausbildung von DSBs wird durch NQ nicht beeinflusst, was darauf schließen lässt, dass die durch NQ verstärkte Zytotoxizität von Cis nicht auf die Ausbildung von DSBs zurückzuführen ist.

Der Effekt von NQ auf die DDR nicht-maligner Zellen wurde in bisherigen Publikationen nicht berücksichtigt. Bei den Analysen hinsichtlich des Effektes von NQ auf die Ausbildung von DNA-Schäden und der DDR im Rahmen dieser Arbeit stellte sich in den NHDF, bis auf die Reduzierung der Doxo-induzierten DSBs bei einer NQ-Kombinationsbehandlung, ein zu den Pankreaskarzinomzellen vergleichbarer Einfluss heraus. Sowohl die Menge an phosphoryliertem RPA32 als auch an H2AX stehen in Einklang mit den vorherigen Untersuchungen an malignen Zellen (Abbildung 3.19). Ebenfalls vergleichbar sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse. In der Kombination mit NQ und Cis bzw. Doxo wird der prozentuale Anteil an NHDF in der SubG1-Phase erhöht und die Menge an Zellen in der G₂/M-Phase wird durch die Kombination von NQ und Cis reduziert (Abbildung 3.22). Dies steht in Konsens mit den Befunden der Caspasenaktivitätsbestimmung der Effektorcaspasen 3 und 7 (Abbildung 3.23), die vermuten lassen, dass es in NHDF ebenfalls zu einer Potenzierung des Zytostatika-induzierten Zelltods durch NQ kommt.

Diese Annahme widerspricht jedoch den Ergebnissen des antagonistischen Einflusses der Kombinationsbehandlung aus NQ und Doxo auf die Vitalität der NHDF, die mittels Alamar Blue[®]-Assay detektiert wurde. Möglicherweise führt diese Kombinationsbehandlung lediglich zu einer erhöhten mitochondrialen Aktivität. Im Gegensatz zu den NHDF konnte in primären Rattenhepatozyten kein hepatotoxischer

Effekt von NQ in dem getesteten Dosisbereich detektiert werden, weshalb keine toxischen Wirkungen von NQ auf die Leber in *in vivo*-Experimenten erwartet werden (Abbildung 3.25). Da die detektierten zyto- und genotoxischen Effekte von NQ in NHDF vergleichbar mit den Effekten in den Pankreaskarzinomzellen sind, ist zu vermuten, dass in malignen und nicht-malignen Zellen die gleichen molekularen Mechanismen/Faktoren beeinflusst werden.

4.2.2.3 5-epi-Illimaquinone

Vitalitätsuntersuchungen in NHDF haben ergeben, dass die Reduktion der Vitalität um 50 % in primären humanen Fibroblasten im Vergleich zu den Pankreaskarzinomzellen bei einer deutlich höheren Konzentration von IQ auftritt (Abbildung 3.18 und Tabelle 3.5). Evanno *et al.* haben jedoch in ihrer Studie gezeigt, dass IQ zytotoxisch in HUVECs wirkt (Evanno *et al.*, 2018).

Die publizierten Studien zu IQ fokussierten sich bisher nicht auf die Wirkung dieses Naturstoffes auf die DDR von Normalgewebszellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, ob IQ die an der DDR-beteiligten Proteine von nicht-malignen Zellen nach Mono- oder Kombinationsbehandlung beeinflusst (Abbildung 3.19). Dabei zeigt sich eine verstärkte Phosphorylierung von ATM in der Monobehandlung. Eine Kombinationsbehandlung aus IQ und Cis verstärkt die Phosphorylierung von CHK1, reduziert jedoch die Menge an phosphoryliertem H2AX im Vergleich zu Cis allein. Diese Resultate lassen erahnen, dass die durch IQ verstärkte Phosphorylierung von CHK1 nach Cis-Behandlung möglicherweise zu einer verlängerten DNA-Reparaturphase führt und die entstandenen Schäden effizienter repariert werden können. Die Phosphorylierung von P53 und H2AX wird durch eine Kombinationsbehandlung aus IQ und Doxo im Vergleich zur Doxo-Monobehandlung verringert. Im Gegensatz dazu steht, dass die durch Doxo hervorgerufene Anzahl an pATM-Foci durch IQ weiter erhöht wird (Abbildung 3.20 sowie Abbildung 8.16 und Abbildung 8.17 des Anhangs). Dies lässt auf eine vermehrte Ausbildung von DSBs nach einer Kombinationsbehandlung aus IQ und Doxo im Vergleich zur Doxo-Monobehandlung schließen. Außerdem steht die leicht zunehmende Spaltung der Effektorcaspasen 3 und 7 nach der Kombinationsbehandlung aus IQ und Cis nicht in Einklang mit der o. g. These. Dabei wurde erwartet, dass eine Reduzierung der Cis-induzierten DNA-Schäden durch IQ zu einer Reduzierung des Cis-ausgelösten Zelltods führt (Abbildung 3.23). In diesem Zusammenhang ist zu berücksichtigen, dass die Aktivierung der Effektorcaspasen sehr komplex ist und die Spaltung noch keine Informationen über die katalytische Aktivität liefert. Mit Hilfe des ApoOne®-Assays wurde gezeigt, dass die Caspasenaktivität nach Mono- bzw. Kombinationsbehandlung nicht beeinflusst wird. Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass bei der durchflusszytometrischen Analyse kein Einfluss von IQ auf die apoptotische Zellpopulation nach Zytostatikabehandlung festgestellt werden konnte (Abbildung 3.22). In der Monobehandlung wurde eine reduzierte Menge an Zellen in der SubG1-Fraktion detektiert. Diese Resultate deuten auf eine Protektion des apoptotischen Zelltods, was durch weitere Analysen genauer untersucht werden muss (Abschnitt 5).

Bei der Untersuchung, welchen Einfluss eine Kombinationsbehandlung auf die Vitalität der NHDF besitzt, wurde festgestellt, dass IQ in der Lage ist, die Zytotoxizität der Zytostatika zu minimieren und somit eine selektive zytotoxische Wirksamkeit gegenüber den getesteten Pankreaskarzinomzellen zeigt (Abbildung 3.21 und Abbildung 8.18 des Anhangs). Ebenso konnte in den primären Rattenhepatozyten kein hepatotoxischer Effekt des Naturstoffes festgestellt werden (Abbildung 3.25). Die im Vergleich zu den malignen Zellen unterschiedliche Beeinflussung der Vitalität und der DDR in NHDF nach IQ-Mono- bzw. Kombinationsbehandlung könnte auf die eingesetzte Dosis von IQ zurückzuführen sein. Dies ermöglicht den Einsatz von IQ in einer Kombinationstherapie mit ausgewählten Zytostatika, wobei die antitumorogene Wirksamkeit verstärkt, während die Normalgewebstoxizität nicht beeinflusst wird.

4.3 Zusammenfassung der molekularen Wirkung der ausgewählten Naturstoffe

Die Ergebnisse der Analysen in den Pankreaskarzinom- und Normalgewebszellen zeigen, dass die untersuchten Naturstoffe zu einer Modulation der DDR führen. IQ wirkt zytotoxisch auf die getesteten Pankreaskarzinomzellen, wobei gleichzeitig die Wirkung auf die NHDF um ein Vielfaches geringer ist und auch *in vitro* detektierte hepatotoxische Effekte ausbleiben. In der Kombinationsbehandlung treten hauptsächlich additive zytotoxische Effekte auf, die jedoch nicht eindeutig in apoptotischem Zelltod resultieren. Der Naturstoff beeinflusst nichtsdestotrotz die DDR, da sowohl die Fluoreszenzintensität als auch die Proteinmenge von γ H2AX in der Kombinationsbehandlung von IQ und Doxo gesteigert werden. Auf Basis dieser Analysen scheint IQ seine Effekte auf die DDR möglicherweise über eine Verstärkung der ROS-Produktion auszuüben (Abbildung 4.1). Dies muss in künftigen Analysen untersucht werden (Abschnitt 5).

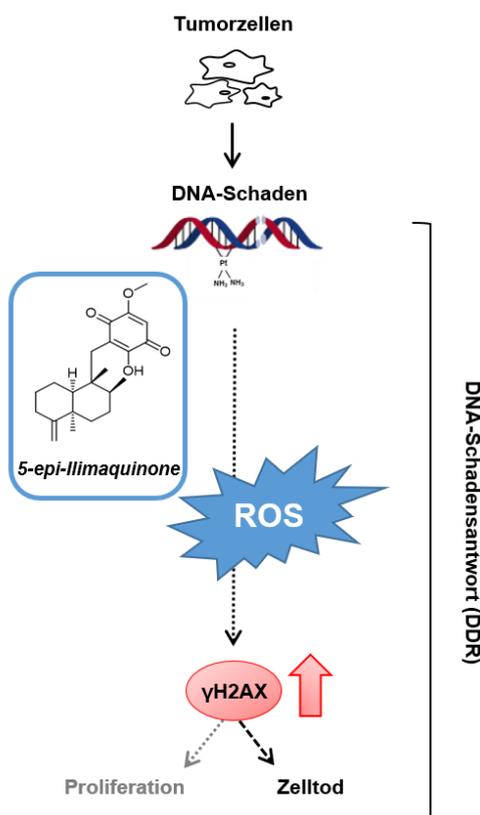


Abbildung 4.1: Modell zur Modulation der DNA-Schadensantwort in Pankreaskarzinomzellen durch 5-epi-Illimaquinone.

Aus den in dieser Arbeit gezeigten Daten ergibt sich die Hypothese, dass 5-epi-Illimaquinone (IQ) über die Steigerung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)-Produktion zu einer vermehrten Menge an S139 phosphorylierten H2AX (γ H2AX) führt. Durch die Modulation der DNA-Schadensantwort (DDR) werden möglicherweise nachfolgende Mechanismen des Zelltodes und der DNA-Reparatur beeinflusst.

Der aus dem Schwamm *Dactylosporgia metachromia* isolierte Naturstoff NQ ist gleichermaßen zytotoxisch in den getesteten Pankreaskarzinomzellen und in den NHDF. Nichtsdestotrotz konnten keine durch den Naturstoff ausgelösten zytotoxische Effekte in primären Rattenhepatozyten nachgewiesen werden. Bei der Auswertung der Ergebnisse stellte sich heraus, dass NQ sowohl die Fluoreszenzintensität als auch die Proteinmenge von phosphoryliertem H2AX in Mono- und Kombinationsbehandlung steigern kann. Dies geht mit einer vermehrten Anzahl an Zellen in der apoptotischen Zellpopulation als auch mit den detektierten additiven bzw. synergistischen zytotoxischen Effekten in der Kombinationsbehandlung einher. Aufgrund dieser Daten und der Studie von Daletos *et al.*, in der eine Inhibierung diverser Kinasen durch NQ beschrieben wurde, ist eine Modulation der DDR durch NQ über den PI3K/AKT-Signalweg und der FAK wahrscheinlich (Daletos *et al.*, 2014) (Abbildung 4.2). Es bleibt offen, welche Faktoren des PI3K/AKT-Signalwegs durch NQ beeinflusst werden und muss in weiterführenden Analysen geprüft werden.

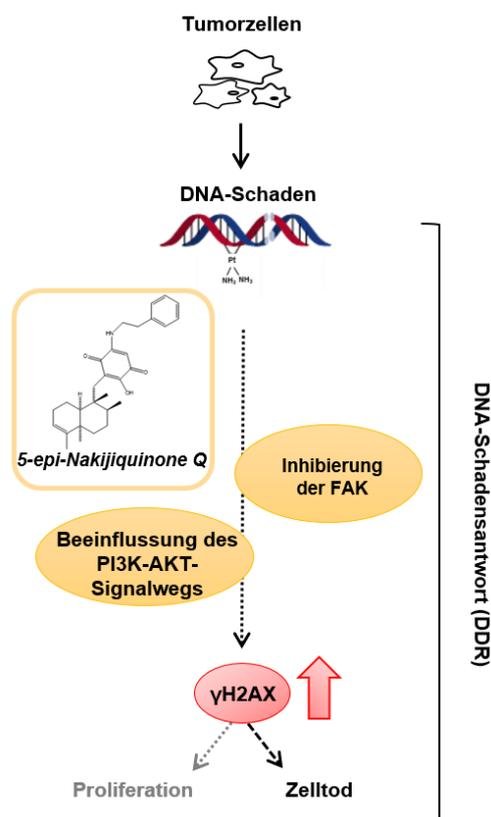


Abbildung 4.2: Modell zur Modulation der DNA-Schadensantwort in Pankreaskarzinomzellen durch 5-epi-Nakijiquinone Q.

Aus den in dieser Arbeit gezeigten Daten ergibt sich die Hypothese, dass 5-epi-Nakijiquinone Q (NQ) über die Modulation des PI3K/AKT-Signalweges und der FAK zu einer vermehrten Menge an S139 phosphorylierten H2AX (γ H2AX) führt. Durch die Modulation der DNA-Schadensantwort (DDR) werden möglicherweise nachfolgende Mechanismen des Zelltodes und der DNA-Reparatur beeinflusst. AKT; Proteinkinase B; FAK, Fokaladhäsionskinase; PI3K, Phosphoinositid-3-Kinasen.

Der Naturstoff SA weist eine antitumorogene Wirkung *in vitro* auf. Darüber hinaus ist die Wirkung auf die NHDF im Vergleich zu den Pankreaskarzinomzellen sowie zu den ausgewählten Kolon- und Lungenkarzinomzellen deutlich vermindert. Allerdings zeigen sich bei der Analyse des Einflusses von SA auf primäre Rattenhepatozyten leichte hepatotoxische Effekte. SA induziert die Phosphorylierung von H2AX, sowohl in der Mono- als auch in der Kombinationsbehandlung und führt gleichzeitig zu vermehrtem Zelltod. Aus der Analyse der einzelnen Faktoren der DDR sowie der Formation von Cis-DNA-Addukten geht hervor, dass die DNA-Reparatur möglicherweise durch diesen Naturstoff beeinflusst wird und es somit zu einer potenzierten antitumorogenen Wirkung kommt (Abbildung 4.3).

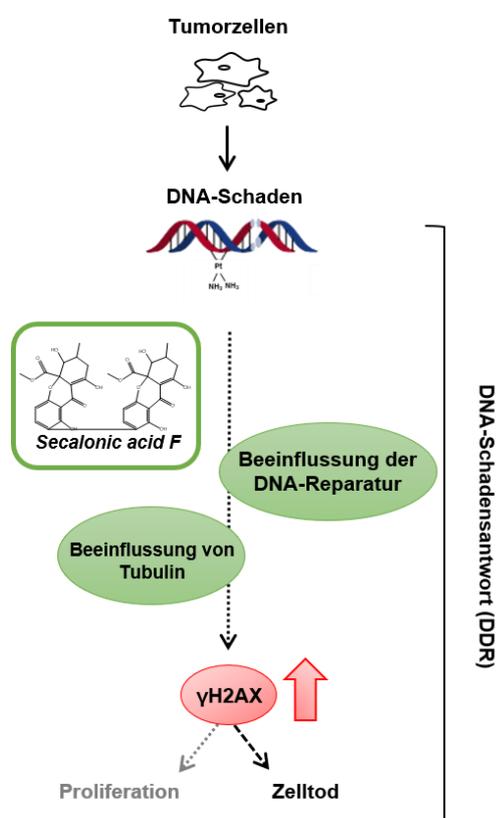


Abbildung 4.3: Modell zur Modulation der DNA-Schadensantwort in Pankreaskarzinomzellen durch Secalonic acid F.

Aus den in dieser Arbeit gezeigten Daten ergibt sich die Hypothese, dass Secalonic acid F (SA) über die Modulation der DNA-Reparatur und der Tubulinstrukturen zu einer vermehrten Menge an S139 phosphorylierten H2AX (γ H2AX) führt. Durch die Modulation der DNA-Schadensantwort (DDR) werden möglicherweise nachfolgende Mechanismen des Zelltodes beeinflusst.

Im Hinblick auf weitere *in vitro* und *in vivo* Testungen müssen sowohl Vor- als auch Nachteile des jeweiligen Naturstoffes abgewogen werden. Aufgrund der vorliegenden Resultate und der vermuteten molekularen Wirkweise sind vor allem NQ und SA für weitere Untersuchungen interessant. Dabei muss abgewogen werden, welche Gewichtung einzelne Kriterien, besonders die Zytotoxizität in Normalgewebszellen, besitzen. Eine Behandlung mit NQ führt in malignen und nicht-malignen Zellen gleichermaßen zu zytotoxischen Effekten. Bei der Untersuchung des Einflusses auf die primären Rattenhepatozyten konnte jedoch *in vitro* kein hepatotoxischer Effekt nachgewiesen werden. Bei SA zeichnet sich eine gegensätzliche Wirkung ab. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass für SA bereits eine gute Bioverfügbarkeit im Tiermodell nachgewiesen werden konnte, was für NQ nicht der Fall ist. Durch diese nachgewiesene gute Bioverfügbarkeit von SA ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass die *in vitro* ermittelten Befunde, vor allem die antitumorogene Wirksamkeit, in *in vivo* Experimenten belegt werden können. Aus diesem Grund liegt die Priorität für weitere *in vitro* und *in vivo* Testungen sowie für eine strukturelle Optimierung bei SA.

Hinsichtlich der Zielsetzung dieser Arbeit bleibt festzuhalten, dass die ausgewählten Naturstoffe in der Lage sind, die DNA-Schadensantwort in Mono- und Kombinationsbehandlung mit ausgewählten Zytostatika zu modulieren. Dabei ist die Potenzierung der antitumorogenen Wirksamkeit der verwendeten Zytostatika jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt und muss im weiteren Verlauf noch detaillierter untersucht werden.

5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die ausgewählten Naturstoffe die DNA-Schadensantwort (DDR) in Mono- oder Kombinationsbehandlung mit den Zytostatika Cisplatin (Cis) oder Doxorubicin (Doxo) beeinflussen. Durch die Modulierung der DDR werden nachfolgend Mechanismen des Zelltodes und der DNA-Reparatur beeinflusst, die jedoch im weiteren Verlauf noch detaillierter untersucht werden müssen, um die molekulare Wirkweise der Naturstoffe eindeutig zu bestätigen.

Für den Naturstoff *Secalonic acid F* (SA) konnte belegt werden, dass die Menge an S139 phosphoryliertem H2AX (γ H2AX) sowohl in Mono- als auch in Kombinationsbehandlung mit Cis und Doxo in den Pankreaskarzinomzellen potenziert wird. Ob SA über eine Inhibierung der DNA-Reparatur zu einer erhöhten Menge an γ H2AX führt, kann über die Bestimmung der DNA-Reparaturkinetik genauer untersucht werden. Dabei sollte der Einfluss von SA einerseits auf die Menge an Cis-(1,2-GpG)-Addukte, andererseits auf die Anzahl an Zytostatika-induzierter γ H2AX-Foci über einen definierten Zeitraum beobachtet werden. Bei einer Inhibierung der DNA-Reparatur durch SA würde man mit zunehmender Postinkubation nach einer Zytostatika-Pulsbehandlung mehr residuale DNA-Schäden erwarten als bei einer Postinkubation nach einer Zytostatika-Pulsbehandlung ohne diesen Naturstoff. Dabei wäre es ratsam, zusätzlich kürzere Expositionen zu inkludieren, um möglicherweise die frühe Formation von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) als auch von Cis-(1,2-GpG)-Addukten zu detektieren. Dies würde das Abbilden einer zeitlichen Wirkweise von SA erleichtern. Cis-(1,2-GpG)-Addukte treten nach Cis-Behandlung am häufigsten auf (Pinto *et al.*, 1985; Kartalou *et al.*, 2001; Rebillard *et al.*, 2008). Um jedoch zu ermitteln, ob SA die Menge der anderen durch Cis hervorgerufenen DNA-Addukte ebenfalls beeinflusst, müssen auch diese über Antikörperfärbungen detektiert werden. Um die Modulierung der Expression der einzelnen, an der DNA-Reparatur beteiligten Faktoren zu identifizieren, wäre neben Western Blot-Analysen ebenfalls eine Genexpressionsanalyse sinnvoll. Dabei wären vor allem Faktoren der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) sowie die Faktoren der Reparaturwege, die für die Reparatur von DSBs verantwortlich sind, von Interesse. Dazu zählt z. B. ERCC1 für die NER oder RAD51 als Stellvertreter der homologen Rekombination (HR). Eine weitere Möglichkeit zur Analyse der DNA-Reparatur wäre der Wirts-Zell-Reaktivierungsassay (*Host Cell Reactivation Assay*, HCRA). Dieser Assay ermöglicht die Bestimmung der Reparaturkapazität der Zellen. Dazu wird eine für ein Reporter gen wie Luciferase oder GFP kodierende Plasmid-DNA geschädigt, in die

Zellen transfiziert und in regelmäßigen Abständen die Expression des Reportergens untersucht (Johnson *et al.*, 2005).

Die Menge an Cis-(1,2-GpG)-Addukten wird im Vergleich zur Cis-Monobehandlung durch SA in den Pankreaskarzinomzellen erhöht. Neben der direkten Beeinflussung der DNA-Reparatur könnte diese, wie bereits erwähnt, auch indirekt über eine Abschirmung des DNA-Schadens, ähnlich wie bei den *high mobility group* (HMG)-Proteinen, beeinflusst werden. Führt eine Überexpression der HMG-Proteine gleichermaßen zu einer Verstärkung des Cis-induzierten γ H2AX-Signals wie eine Behandlung mit SA, so lässt sich vermuten, dass SA ähnlich wie die HMG-Proteine wirkt oder diese induziert. Ob SA z. B. HMG1 induziert, kann über Western Blot-Analysen bestimmt werden. Jedoch ist zu erwähnen, dass es dazu bisher keine publizierten Studien gibt. Zusätzlich wäre denkbar, dass der Naturstoff eine direkte Wechselwirkung mit Cis eingeht und somit die DNA-bindende Eigenschaft von Cis steigert. Dies konnte bereits für den Naturstoff Scutellarin gezeigt werden (Xie *et al.*, 2019). Diese These lässt sich über eine spektrometrische Bestimmung der Menge des an die DNA-gebundenen Platins überprüfen.

Durch replikativen Stress, der in der vorliegenden Arbeit vor allem in der Kombinationsbehandlung mit Cis auftritt, verlangsamt sich die DNA-Synthese. Diese lässt sich mit Hilfe des 5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin (EdU)-Inkorporations-Assays nachweisen. EdU ist ein Thymidinanalog und wird daher bei der DNA-Synthese als komplementäre Base zu Adenin eingebaut (Cavanagh *et al.*, 2011; Hua *et al.*, 2011). Durch die Zugabe eines an ein Azid-gebundenen fluoreszierenden Farbstoffes, der über eine Kupfer-katalysierte Reaktion an die Alkyngruppe des EdU bindet, kann die DNA mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden. Dabei gibt die Einbaurate des EdU Rückschlüsse auf die DNA-Syntheseaktivität. Ob der durch Cis induzierte replikative Stress durch SA verstärkt wird, kann mittels dieser Methode geprüft werden. Durch SA wird der durch die Doxo-Behandlung erhöhte prozentuale Anteil an Zellen in der G₂/M-Phase reduziert. Um zu überprüfen, ob SA über eine verminderte Aktivierung des G₂/M-Kontrollpunktes zu einer Reduktion der Zellen in der G₂/M-Phase im Vergleich zur Doxo-Monobehandlung führt, könnten Genexpressions- und Western Blot-Analysen durchgeführt werden. Dabei sollten vor allem regulatorische Faktoren des Zellzyklus, wie z. B. *cell division cycle 25* (Cdc25) oder Cyclin-abhängige Kinasen (Cdks), im Vordergrund stehen.

Anlehnend an die Studie von Özenver *et al.*, die einen Einfluss von SA auf die Tubulinstrukturen nachgewiesen haben, wäre eine immunzytochemische Analyse des Spindelapparates naheliegend (Özenver *et al.*, 2020). Die Interaktion von Tubulin und DNA-Reparaturproteinen, wie z. B. ERCC1 oder den Proteinen des MRN-Komplexes, könnte ebenfalls über deren Kollokalisierung in immunzytochemische Färbungen untersucht werden. In diesem Zusammenhang wäre auch eine Immunopräzipitation zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen denkbar (Bonifacino *et al.*, 1999). Dabei wird ein bestimmtes Protein, in diesem Fall Tubulin, inklusive der Bindungspartner mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers präzipitiert. Die o. g. DNA-Reparaturproteine können mittels Western Blot-Analysen nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Analysen zu dem Naturstoff *5-epi-Nakijiquinone* Q (NQ) deuten darauf hin, dass die Potenzierung des γ H2AX-Signals durch NQ in Mono- bzw. Kombinationsbehandlung in den Pankreaskarzinomzellen in Zusammenhang mit einer Inhibierung der FAK und des PI3K/AKT-Signalwegs steht. Zunächst muss überprüft werden, ob NQ tatsächlich einen Einfluss auf einzelne Faktoren des PI3K/AKT-Signalwegs bzw. der FAK besitzt. Dazu wären Western Blot-Analysen sowie Genexpressionsanalysen der beteiligten Faktoren sinnvoll, wozu u. a. AKT, CREB, p27 oder mTOR zählen (Fresno Vara *et al.*, 2004). Da die Expression keine Informationen zur Aktivität einzelner Kinasen liefert, sollte die Kinaseaktivität über einen Proteinkinase-Assay analysiert werden. Dabei wird eine rekombinante Proteinkinase, z. B. AKT oder FAK, mit einer Mischung aus radio- und unmarkiertem ATP und einem Kinasesubstrat inkubiert. Der Transfer des markierten ATP auf das Substrat wird mittels Szintigrafie detektiert und spiegelt die Aktivität einzelner Kinasen und die Aktivierung folgender Substrate wider (Aly *et al.*, 2008). Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass eine Inhibierung der FAK mit einer Inhibierung der DNA-Reparatur einhergeht. Der Einfluss von NQ auf die DNA-Reparatur kann ebenfalls über die o. g. Methoden analysiert werden. Um die Relevanz des PI3K/AKT-Signalwegs und der FAK im Zusammenhang mit NQ detaillierter zu analysieren, könnte die Expression von AKT oder FAK z. B. mittels *small interfering RNAs* (siRNAs) reduziert werden, um danach Modifikationen in der Zellantwort nach der Mono- bzw. Kombinationsbehandlung zu untersuchen. Dies erscheint sinnvoll, da für NQ bereits Interaktionen mit Faktoren beschrieben wurden, die in Zusammenhang mit dem PI3K/AKT-Signalweg stehen (z. B. *Insulin-like growth factor 1*) (Daletos *et al.*, 2014).

Des Weiteren deuteten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass NQ auch zu einer Induktion von replikativem Stress führt. Folglich wäre es sinnvoll, dies genauer zu

untersuchen. Eine Möglichkeit wäre die immunzytochemische Detektion von *Replication protein A* (RPA)-Foci als Marker für Replikationsstress (Murphy *et al.*, 2014). Mit Hilfe des DNA fiber-Assays ist es darüber hinaus möglich, den einzelnen Fortschritt der Replikationsgabeln nachzuweisen. Diese Methode beruht auf der Detektion des Einbaus von Thymidinanaloga während der DNA-Synthese in der S-Phase des Zellzyklus mit Hilfe von indirekter Immunfluoreszenz (Nikolova *et al.*, 2017). Folglich wäre eine Analyse mittels des DNA fiber-Assays hilfreich, um die Wirkung von NQ auf die DNA-Replikation zu untersuchen. Auch der o. g. EdU-Inkorporations-Assay bietet in diesem Zusammenhang die Möglichkeit den Fortschritt der DNA-Replikation zu untersuchen. Durch eine Inhibierung der Aurorakinase B konnte bereits eine Aufhebung des G₂/M-Kontrollpunktes nachgewiesen werden (Gürtler *et al.*, 2010). Um zu überprüfen, ob eine Behandlung mit NQ eine Aufhebung dieses Kontrollpunktes nach sich zieht, könnten, wie bereits erwähnt, regulatorische Faktoren des Zellzyklus, wie z. B. *cell division cycle 25 C* (Cdc25C) oder Cyclin-abhängige Kinase1 (Cdk1) mit Hilfe von Genexpressions- und Western Blot-Analysen geprüft werden.

5-epi-Illimaquinone (IQ) übt die Modulierung der DDR in den Pankreaskarzinomzellen möglicherweise über die Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) aus. Aus diesem Grund ist es zunächst ratsam, die Bildung von ROS genauer zu untersuchen. Eine Möglichkeit wäre die Analyse der ROS-Produktion mit Hilfe des Fluorochroms Dichlorofluorescein (DCF). Dabei kommt es nach Aufnahme des 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat (H₂-DCF-DA) in die Zelle durch intrazelluläre Esterasen zu einer Abspaltung der Acetat-Gruppen. Durch ROS wird dann das nicht fluoreszierende Dichlorodihydrofluorescein (H₂-DCF) zu dem fluoreszierenden DCF oxidiert (Hempel *et al.*, 1999). Je stärker das Fluoreszenzsignal ist, desto höher ist die ROS-Produktion. Um mögliche, durch ROS verursachte Veränderungen der DNA zu detektieren, könnte die Basenmodifikation 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin (8-OxodG) untersucht werden. Dabei handelt es sich um eine Oxidation der Purinbase Guanin zu 8-OxodG (Barregard *et al.*, 2013). Diese Basenmodifikation gilt als Marker für oxidativen Stress und kann mittels Antikörperfärbungen untersucht werden (Altieri *et al.*, 2008). Um die Wirkung von IQ auf die DDR unabhängig von der möglichen Induktion der ROS-Produktion zu bewerten, könnten die Zellen zusätzlich mit der antioxidativ wirkenden Substanz N-Acetylcystein behandelt werden.

Des Weiteren scheint auch IQ eine Wirkung auf den Zellzyklus zu besitzen. Um dies genauer zu analysieren, kann zusätzlich zu den durchflusszytometrischen Analysen die Anzahl der Zellen, die das Zentromerprotein F (*centromere protein F*; CENP-F)

exprimieren, bestimmt werden. CENP-F gilt als Marker für die G₂/M-Phase und kann mittels immunzytochemischer Färbungen detektiert werden (Liao *et al.*, 1995). Die Untersuchungen bezüglich des Einflusses von IQ auf apoptotische Zelltodmechanismen lieferten uneindeutige Resultate. Um die Wirkung von IQ auf die Zytostatika-induzierte Apoptose genauer zu betrachten, wäre die Detektion der Initiatorcaspasen 2, 8, 9 oder 10 mittels Western Blot-Analysen hilfreich. Daran anschließend könnte die Expression von Proteinen der Bcl-2-Familie untersucht werden, was Informationen über die Induktion von anti- oder pro-apoptotischen Faktoren durch IQ liefern würde.

Für die ausgewählten Naturstoffe SA, NQ und IQ wurde bisher nicht genauer begutachtet, welche molekularen Mechanismen für die Zelltodinduktion verantwortlich sind. Um dies zu überprüfen und zu unterscheiden, ob es sich um den extrinsischen oder intrinsischen Apoptoseweg handelt, würden sich z. B. weitere Western Blot-Analysen anbieten. Die Aktivierung der an dem extrinsischen bzw. intrinsischen Apoptosesignalweg beteiligten Caspase 8 bzw. 9 könnte mittels dieser Methode analysiert werden (Li *et al.*, 1997; Kruidering *et al.*, 2000). Um den Anteil der Zellen zu bestimmen, die einen nekrotischen Zelltod durchlaufen, wäre ein Laktatdehydrogenase (LDH)-Assay sinnvoll. Das Prinzip dieser Analyse beruht auf dem Verlust der Membranintegrität und der Freisetzung von Zellinhalt im Laufe der Nekrose. Die Menge an freigesetztem LDH im Medium dient als Indikator für Nekrose.

Darüber hinaus müsste gezeigt werden, dass der Einfluss der Naturstoffe auf die Cis-(1,2-GpG)-Addukten unabhängig Import bzw. Export von Cis ist. Dazu müsste die Expression der verschiedenen Im- und Exporter, die in diesem Fall an der Cis-Aufnahme in die Zelle bzw. Abgabe aus der Zelle beteiligt sind, bestimmt werden. Zu den Importern zählt u. a. der Kupfertransporter CTR1 (*solute carrier family 31, member 1; copper transporter 1*) oder der Kationentransporter OCT2 (*solute carrier family 22, member 2; organic cation transporter 2*) (Ishida *et al.*, 2002, Pabla *et al.*, 2009, Ciarimboli *et al.*, 2010, Yonezawa *et al.*, 2011). Zu den Exportern gehört MRP2 (*multidrug resistance-associated protein 2*) (Rabik *et al.*, 2007). Um zu prüfen, ob die durch die Naturstoffe modulierte Menge an γ H2AX nach Doxo-Behandlung auf eine Inhibierung der Topoisomerase II zurückzuführen ist, muss z. B. mittels Western Blot-Analyse die Proteinmenge bzw. die katalytische Aktivität über den ICE-Assay bestimmt werden.

Der Einsatz der primären Rattenhepatozyten ermöglicht nicht nur den Nachweis der zytotoxischen Wirkung der Naturstoffe selbst in Mono- bzw. Kombinationstherapie, sondern auch deren Metabolite, die aufgrund der metabolischen Aktivität der primären

Rattenhepatozyten entstehen. Folglich wäre es interessant zu prüfen, ob und wenn ja, welche Metabolite dabei gebildet werden. Um diese zu bestimmen, würde sich eine Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC/MS) anbieten. Diese Methode erlaubt die Identifikation bzw. Quantifizierung von Substanzen. Der sich im Zellkulturmedium befindliche Naturstoff wird dabei zu den primären Rattenhepatozyten gegeben. Nach definierten Analysezeitpunkten wird die Inkubation gestoppt und die Ausgangssubstanz und deren mögliche Metabolite in der Zelle und in dem Zellkulturmedium können mittels GC/MS untersucht werden. Dies erlaubt eine Bestimmung der Umsetzung des Naturstoffes über die Zeit. Somit lassen sich nicht nur die Metabolite bestimmen, sondern auch der Zeitpunkt und das Ausmaß. Um den Einsatz der Naturstoffe in *in vivo*-Experimenten möglichst effektiv zu gestalten, sollte untersucht werden, ob die Naturstoffe bioverfügbar sind. Hierfür wären, vor den *in vivo* Experimenten, ebenfalls weitere *in vitro* Versuche mit den primären Rattenhepatozyten sinnvoll, da diese möglicherweise die Metabolisierung der Naturstoffe allein und in der Kombination mit den ausgewählten Zytostatika bei der ersten Leberpassage (First-Pass-Effekt) abbilden können.

6 Zusammenfassung

Bei der konventionellen (i. e. genotoxischen) Tumorthherapie wird die genomische DNA der malignen Zellen geschädigt. Infolge von induzierten DNA-Schäden wird ein komplexes Netz aus Signalwegen, die sogenannte DNA-Schadensantwort (DDR), aktiviert. Diese stellt die koordinierte Regulation der Aktivierung von Zellzyklus-Kontrollpunkten, der DNA-Reparatur und des Zelltodes sicher. Mechanismen der DDR sind daher attraktive Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Therapieansätze. Gleichzeitig stellen Naturstoffe wichtige Leitsubstanzen für das Design neuer und wirksamer Krebsmedikamente dar. In dieser Arbeit sollten Naturstoffe identifiziert werden, die regulatorische Faktoren der DDR und der DNA-Reparatur beeinflussen. Der Fokus lag dabei nicht nur auf Naturstoffen, die per se einen Einfluss auf die DDR zeigen, sondern vor allem auf solchen, die die Tumorthérapeutika-induzierte DDR modulieren und so die therapeutische Wirksamkeit konventioneller Therapien verbessern. Dazu wurden Pankreaskarzinom-Zelllinien als *in vitro*-Modellsysteme hinsichtlich ihrer Stressantworten nach Behandlung mit den Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin (Cis) oder Doxorubicin (Doxo) untersucht.

Zunächst wurde die Veränderung der Stärke der Phosphorylierung des Histons 2AX an seinem Serin 139 (γ H2AX) als Surrogatmarker für DNA-Schäden in einer selbst neu etablierten Screening-Methode sowie mittels Western Blot-Analysen untersucht. Aus den Ergebnissen dieser Analysen geht hervor, dass *Secalonic acid F* (SA), *5-epi-Nakijiquinone Q* (NQ) und *5-epi-Illimaquinone* (IQ) von insgesamt 296 untersuchten Naturstoffen zu den potentesten Naturstoffen in beiden Zelllinien zählen und in der Lage sind, das γ H2AX-Signal nach Monotherapie sowie nach der Behandlung mit Cis oder Doxo zu verstärken. Anschließend erfolgte eine detaillierte molekulare Analyse des Einflusses der ausgewählten Naturstoffe auf die Induktion von DNA-Schäden, DNA-Schadensantwort und die damit einhergehenden Prozesse.

Die Analysen für den Naturstoff SA ergaben, dass SA basal zu einer vermehrten Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) führt. Die Zytostatika-induzierte Menge an DSBs kann durch SA jedoch nicht weiter erhöht werden. Die zunehmende Menge von γ H2AX in der Kombinationsbehandlung von SA und Cis scheint mit einer vermehrten Ausbildung von Cis-(1,2-GpG)-Addukten zu korrelieren. Die Resultate der Western Blot-Analysen ergaben, dass vor allem RPA32, als Marker für Replikationsstress, sowie CHK1 und CHK2 verstärkt phosphoryliert und somit aktiviert werden. Es gibt Hinweise darauf, dass

SA in der Lage ist, die DNA-Reparatur in der Kombination sowohl mit Cis als auch mit Doxo zu hemmen und dadurch Zelltodmechanismen zu induzieren. Ebenso ist eine verminderte Aktivierung des G₂/M-Kontrollpunktes durch SA in der Kombination mit Cis bzw. Doxo nicht ausgeschlossen. Im Gegensatz zu dem synergistisch zytotoxischen Effekt der Kombinationsbehandlungen in den Pankreaskarzinomzellen wird die Zytotoxizität der Zytostatika in nicht-malignen Fibroblasten durch SA minimiert. In primären Rattenhepatozyten wurde jedoch ein leicht hepatotoxischer Effekt detektiert.

Die Resultate für NQ deuten bei einer Kombinationsbehandlung mit Doxo auf eine im Vergleich zur Doxo-Monobehandlung verstärkte Ausbildung an DSBs hin, was Grund für die vermehrte Menge an γ H2AX sein könnte. Die Western Blot-Analysen ergaben eine vermehrte Phosphorylierung von RPA32 sowohl durch die NQ-Monobehandlung als auch eine im Vergleich zu dem jeweiligen Zytostatikum verstärkte Phosphorylierung in den Kombinationsbehandlungen. Die Befunde lassen den Schluss zu, dass NQ in einer Mono- sowie einer Kombinationsbehandlung zu replikativem Stress und gleichzeitig zu einer Reduktion der DNA-Reparatur führt, wodurch die Menge an Zytostatika-induzierten DNA-Schäden potenziert wird. Die Vitalität von primären Rattenhepatozyten wurde durch NQ nicht beeinflusst, jedoch reagieren nicht-malignen Fibroblasten sensitiv auf den Naturstoff.

Die Befunde für IQ lassen die Vermutung zu, dass IQ in der Monobehandlung in der Lage ist, die DNA zu schädigen. Das Ergebnis der Untersuchung von an der DDR-beteiligten Proteine zeigte eine pleiotrope Beeinflussung der DDR. Es lässt sich aufgrund der Ergebnisse dieser Analysen vermuten, dass IQ seine Effekte auf die DDR möglicherweise über eine Verstärkung der ROS-Produktion ausübt und somit die Menge an oxidativen DNA-Schäden erhöht. In der Kombinationsbehandlung treten hauptsächlich additive zytotoxische Effekte auf, die nicht eindeutig in apoptotischem Zelltod resultieren. Im Gegensatz dazu reduziert IQ die Zytotoxizität der Zytostatika in nicht-malignen Fibroblasten und zeigt somit eine selektive zytotoxische Wirksamkeit in den getesteten Pankreaskarzinomzellen. In den primären Rattenhepatozyten konnte kein hepatotoxischer Effekt des Naturstoffes festgestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass die ausgewählten Naturstoffe die DDR in Mono- oder Kombinationsbehandlung mit den Zytostatika Cis oder Doxo beeinflussen und nachfolgend Mechanismen der DNA-Reparatur und des Zelltodes so modulieren, dass die Effektivität der Behandlung *in vitro* gesteigert wird.

Summary

In conventional (i.e. genotoxic) tumor therapy the genomic DNA of the malignant cells is damaged. As a result of induced DNA damage a complex stress response program named DNA damage response (DDR) is activated. This ensures a coordinated regulation of the activation of cell cycle checkpoints, DNA repair and cell death. Mechanisms of the DDR are therefore attractive target structures for the development of new therapeutic approaches. At the same time, natural compounds are important lead structures for the design of new and effective anticancer agents. In this work, natural compounds should be identified that influence regulatory factors of the DDR and DNA repair. The focus was not only on natural compounds that per se show an influence on the DDR, but also on those natural compounds above all that influence the anticancer agent induced DNA damage response and thus improve the therapeutic effectiveness of conventional anticancer agents. For this purpose, pancreatic carcinoma cell lines were examined as *in vitro* model systems regarding to their stress responses after the treatment with the natural compounds alone or in combination with cisplatin (Cis) or doxorubicin (Doxo).

First, the alterations in the phosphorylation level of histone H2AX on its serine 139 (γ H2AX) as a surrogate marker for DNA damage were investigated in a screening method that was recently established by ourselves, as well as through Western blot analyses. The results of these analyses demonstrate that out of a total of 296 natural compounds tested Secalonic acid F (SA), 5-epi-Nakijiquinone Q (NQ) and 5-epi-Illimaquinone (IQ) are among the most potent natural compounds in both cell lines. They are able to induce the γ H2AX signal after monotherapy and, moreover, intensify the signal intensity after treatment with Cis or Doxo. This was followed by a detailed molecular analysis of the influence of the selected natural compounds on the induction of DNA damage, DDR and associated processes.

Analyses of the natural compound SA pointed out that SA leads to an enhanced formation of DNA double-strand breaks (DSBs). However, the amount of DSBs induced by the anticancer agents was not scaled up. The increased amount of γ H2AX is independent of the intracellular Doxo concentration, but there seems to be a correlation between the increased amount of γ H2AX in the combination treatment of SA and Cis and an enhanced formation of cis-(1,2-GpG)-adducts. The Western blot analyses showed that in particular RPA32, as a marker for replication stress, as well as CHK1 and CHK2 are phosphorylated more intensely than the respective control and thus activated.

There is evidence that SA is able to inhibit DNA repair both in combination with Cis and Doxo and thereby induces cell death mechanisms. Likewise, reduced activation of the G₂/M checkpoint by SA in combination with Cis or Doxo cannot be ruled out. In contrast to the synergistically cytotoxic effect of combination treatment in pancreatic cancer cells, the cytotoxicity of the anticancer agents in non-malignant fibroblasts is minimized by SA. In primary rat hepatocytes, however, a slightly hepatotoxic effect was detected.

The results obtained for NQ indicate an elevated formation of DSBs in combination treatment with Doxo compared to Doxo monotreatment, which could be the reason for the increased amount of γ H2AX. The western blot analyses illustrated an increased phosphorylation of RPA32 following the NQ monotreatment and an enhanced phosphorylation in the combination treatments compared to the respective anticancer agent alone. Presumably, NQ leads to replicative stress in mono- and combination treatment and at the same time to a reduction of DNA repair. Consequently, the amount of cytostatic-induced DNA damage is potentiated. The viability of primary rat hepatocytes was not influenced by NQ, but the non-malignant fibroblasts react sensitively to the natural compound.

The findings for IQ suggest that IQ in monotreatment is able to damage the DNA. The result of the investigation of proteins involved in the DDR displayed pleiotropic effects. On the basis of the results of these analyses, we hypothesize that IQ seems to exert its effects on the DDR possibly by increasing ROS formation and thus increasing the amount of oxidative DNA damage. In combination treatment mainly additive cytotoxic effects occur, which, however, do not clearly result in apoptotic cell death. In addition, IQ reduces the cytotoxicity of the anticancer agents and thereby shows a selective cytotoxic activity in the tested pancreatic carcinoma cells. No hepatotoxic effect of the natural compound was found in the primary rat hepatocytes.

In the present work it could be shown that the selected natural compounds influence the DDR in mono- or combination treatment with the anticancer agents Cis or Doxo and subsequently modulate the mechanisms of DNA repair and cell death, resulting *in vitro* in an increased efficacy of the therapy.

7 Literaturverzeichnis

- Abbotts, R., Madhusudan, S. (2010). Human AP endonuclease 1 (APE1): from mechanistic insights to druggable target in cancer. *Cancer Treat Rev*, **36**(5): 425-435.
- Agarwal, B., Bhendwal, S., Halmos, B., Moss, S. F., Ramey, W. G., Holt, P. R. (1999). Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. *Clin Cancer Res*, **5**(8): 2223-2229.
- Aggarwal, B. B. (2004). Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell*, **6**(3): 203-208.
- Aktories, K., Förstermann, U., Hofman, F., Starke, K. (2017). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 12. Auflage
- Alekseev, S., Ayadi, M., Brino, L., Egly, J. M., Larsen, A. K., Coin, F. (2014). A small molecule screen identifies an inhibitor of DNA repair inducing the degradation of TFIIH and the chemosensitization of tumor cells to platinum. *Chem Biol*, **21**(3): 398-407.
- Ali, I., Wani, W. A., Saleem, K., Haque, A. (2013). Platinum compounds: a hope for future cancer chemotherapy. *Anticancer Agents Med Chem*, **13**(2): 296-306.
- Altieri, F., Grillo, C., Maceroni, M., Chichiarelli, S. (2008). DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*, **10**(5): 891-937.
- Altmann, K. H., Memmert, K. (2008). Epothilones as lead structures for new anticancer drugs--pharmacology, fermentation, and structure-activity-relationships. *Prog Drug Res*, **66**: 273, 275-334.
- Aly, A. H., Edrada-Ebel, R., Indriani, I. D., Wray, V., Muller, W. E., Totzke, F., Zirrgiebel, U., Schachtele, C., Kubbutat, M. H., Lin, W. H., Proksch, P., Ebel, R. (2008). Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense*. *J Nat Prod*, **71**(6): 972-980.
- Amaral, N., Vendrell, A., Funaya, C., Idrissi, F. Z., Maier, M., Kumar, A., Neurohr, G., Colomina, N., Torres-Rosell, J., Geli, M. I., Mendoza, M. (2016). The Aurora-B-dependent NoCut checkpoint prevents damage of anaphase bridges after DNA replication stress. *Nat Cell Biol*, **18**(5): 516-526.
- Ammon, H. P. T., Schubert-Zsilavec, M. (2014). Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch. Gruyter, Walter de GmbH, S. 1532 f.
- Andersen, R., Buchi, G., Kobbe, B., Demain, A. L. (1977). Secalonic acids D and F are toxic metabolites of *Aspergillus aculeatus*. *J Org Chem*, **42**(2): 352-353.

- Antoni, L., Sodha, N., Collins, I., Garrett, M. D. (2007). CHK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy - two sides of the same coin? *Nat Rev Cancer*, **7**(12): 925-936.
- Aoki, S., Kong, D., Suna, H., Sowa, Y., Sakai, T., Setiawan, A., Kobayashi, M. (2006). Aaptamine, a spongy alkaloid, activates p21 promoter in a p53-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun*, **342**(1): 101-106.
- Apps, M. G., Choi, E. H., Wheate, N. J. (2015). The state-of-play and future of platinum drugs. *Endocr Relat Cancer*, **22**(4): R219-233.
- Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C., Spalla, C. (2000). Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. Reprinted from *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XI, Issue 6, Pages 1101-1110 (1969). *Biotechnol Bioeng*, **67**(6): 704-713.
- Arnould, S., Hennebelle, I., Canal, P., Bugat, R., Guichard, S. (2003). Cellular determinants of oxaliplatin sensitivity in colon cancer cell lines. *Eur J Cancer*, **39**(1): 112-119.
- Bachur, N. R., Gordon, S. L., Gee, M. V. (1977). Anthracycline antibiotic augmentation of microsomal electron transport and free radical formation. *Mol Pharmacol*, **13**(5): 901-910.
- Bachur, N. R., Yu, F., Johnson, R., Hickey, R., Wu, Y., Malkas, L. (1992). Helicase inhibition by anthracycline anticancer agents. *Mol Pharmacol*, **41**(6): 993-998.
- Bagnardi, V., Blangiardo, M., La Vecchia, C., Corrao, G. (2001). Alcohol consumption and the risk of cancer: a meta-analysis. *Alcohol Res Health*, **25**(4): 263-270.
- Baik, M. H., Friesner, R. A., Lippard, S. J. (2003). Theoretical study of cisplatin binding to purine bases: why does cisplatin prefer guanine over adenine? *J Am Chem Soc*, **125**(46): 14082-14092.
- Bailly, C. (2009). Ready for a comeback of natural products in oncology. *Biochem Pharmacol*, **77**(9): 1447-1457.
- Bakkenist, C. J., Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, **421**(6922): 499-506.
- Baldwin, A. S. (2001). Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest*, **107**(3): 241-246.
- Baldwin, E. L., Osheroff, N. (2005). Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, **5**(4): 363-372.
- Balin-Gauthier, D., Delord, J. P., Pillaire, M. J., Rochaix, P., Hoffman, J. S., Bugat, R., Cazaux, C., Canal, P., Allal, B. C. (2008). Cetuximab potentiates oxaliplatin cytotoxic effect through a defect in NER and DNA replication initiation. *Br J Cancer*, **98**(1): 120-128.

- Ball, H. L., Myers, J. S., Cortez, D. (2005). ATRIP binding to replication protein A-single-stranded DNA promotes ATR-ATRIP localization but is dispensable for Chk1 phosphorylation. *Mol Biol Cell*, **16**(5): 2372-2381.
- Bardeleben, R. V., Dunkern, T., Kaina, B., Fritz, G. (2002). The HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin protects cells from the antineoplastic drugs doxorubicin and etoposide. *Int J Mol Med*, **10**(4): 473-479.
- Barlogie, B., Drewinko, B., Johnston, D. A., Freireich, E. J. (1976). The effect of adriamycin on the cell cycle traverse of a human lymphoid cell line. *Cancer Res*, **36**(6): 1975-1979.
- Barregard, L., Moller, P., Henriksen, T., Mistry, V., Koppen, G., Rossner, P., Jr., Sram, R. J., Weimann, A., Poulsen, H. E., Nataf, R., Andreoli, R., Manini, P., Marczylo, T., Lam, P., Evans, M. D., Kasai, H., Kawai, K., Li, Y. S., Sakai, K., Singh, R., Teichert, F., Farmer, P. B., Rozalski, R., Gackowski, D., Siomek, A., Saez, G. T., Cerda, C., Broberg, K., Lindh, C., Hossain, M. B., Haghdoust, S., Hu, C. W., Chao, M. R., Wu, K. Y., Orhan, H., Senduran, N., Smith, R. J., Santella, R. M., Su, Y., Cortez, C., Yeh, S., Olinski, R., Loft, S., Cooke, M. S. (2013). Human and methodological sources of variability in the measurement of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Antioxid Redox Signal*, **18**(18): 2377-2391.
- Bartek, J., Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*, **3**(5): 421-429.
- Bartkova, J., Horejsi, Z., Koed, K., Kramer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldberg, P., Sehested, M., Nesland, J. M., Lukas, C., Orntoft, T., Lukas, J., Bartek, J. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, **434**(7035): 864-870.
- Bates, D. A., Winterbourn, C. C. (1982). Deoxyribose breakdown by the adriamycin semiquinone and H₂O₂: evidence for hydroxyl radical participation. *FEBS Lett*, **145**(1): 137-142.
- Baumann, P., Mandl-Weber, S., Oduncu, F., Schmidmaier, R. (2008). Alkylating agents induce activation of NFkappaB in multiple myeloma cells. *Leuk Res*, **32**(7): 1144-1147.
- Baumann, P., West, S. C. (1998). Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends Biochem Sci*, **23**(7): 247-251.
- Bednarski, B. K., Ding, X., Coombe, K., Baldwin, A. S., Kim, H. J. (2008). Active roles for inhibitory kappaB kinases alpha and beta in nuclear factor-kappaB-mediated chemoresistance to doxorubicin. *Mol Cancer Ther*, **7**(7): 1827-1835.
- Beijnen, J. H., Schellens, J. H. (2004). Drug interactions in oncology. *Lancet Oncol*, **5**(8): 489-496.
- Bellon, S. F., Coleman, J. H., Lippard, S. J. (1991). DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry*, **30**(32): 8026-8035.

- Berdelle, N., Nikolova, T., Quiros, S., Efferth, T., Kaina, B. (2011). Artesunate induces oxidative DNA damage, sustained DNA double-strand breaks, and the ATM/ATR damage response in cancer cells. *Mol Cancer Ther*, **10**(12): 2224-2233.
- Berenblum, I. (1941). The Mechanism of Carcinogenesis: A Study of the Significance of Cocarcinogenic Action and Related Phenomena. *Cancer Research*, **1**(10): 807-814.
- Bergeron, C., Thiesse, P., Rey, A., Orbach, D., Boutard, P., Thomas, C., Schmitt, C., Scopinaro, M. J., Bernard, F., Stevens, M., Oberlin, O. (2008). Revisiting the role of doxorubicin in the treatment of rhabdomyosarcoma: an up-front window study in newly diagnosed children with high-risk metastatic disease. *Eur J Cancer*, **44**(3): 427-431.
- Berte, N., Lokan, S., Eich, M., Kim, E., Kaina, B. (2016). Artesunate enhances the therapeutic response of glioma cells to temozolomide by inhibition of homologous recombination and senescence. *Oncotarget*, **7**(41): 67235-67250.
- Bin, Z., Xiubin, G., Uppalapati, U., Ashwell, M. A., Leggett, D. S., Li, C. J. (2008). High-content fluorescent-based assay for screening activators of DNA damage checkpoint pathways. *J Biomol Screen*, **13**(6): 538-543.
- Block, G., Patterson, B., Subar, A. (1992). Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer*, **18**(1): 1-29.
- Blum, R. H., Carter, S. K. (1974). Adriamycin. A new anticancer drug with significant clinical activity. *Ann Intern Med*, **80**(2): 249-259.
- Bohr, V. A., Smith, C. A., Okumoto, D. S., Hanawalt, P. C. (1985). DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell*, **40**(2): 359-369.
- Bollag, D. M., McQueney, P. A., Zhu, J., Hensens, O., Koupal, L., Liesch, J., Goetz, M., Lazarides, E., Woods, C. M. (1995). Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Res*, **55**(11): 2325-2333.
- Bonifacino, J. S., Dell'Angelica, E. C., Springer, T. A. (1999). Immunoprecipitation. **48**(1): 10.16.11-10.16.29.
- Bopp, A., Wartlick, F., Henninger, C., Kaina, B., Fritz, G. (2013). Rac1 modulates acute and subacute genotoxin-induced hepatic stress responses, fibrosis and liver aging. *Cell Death Dis*, **4**: e558.
- Bos, J. L. (1989). Ras Oncogenes in Human Cancer - a Review. *Cancer Research*, **49**(17): 4682-4689.
- Boufridi, A., Lachkar, D., Erpenbeck, D., Beniddir, M., Evanno, L., Petek, S., Debitus, C., Poupon, E. (2016). Ilimaquinone and 5-epi-Ilimaquinone: Beyond a Simple Diastereomeric Ratio, Biosynthetic Considerations from NMR-Based Analysis. *Australian Journal of Chemistry*, **70**: 743.

- Bowling, J. J., Pennaka, H. K., Ivey, K., Wahyuono, S., Kelly, M., Schinazi, R. F., Valeriote, F. A., Graves, D. E., Hamann, M. T. (2008). Antiviral and anticancer optimization studies of the DNA-binding marine natural product aaptamine. *Chem Biol Drug Des*, **71**(3): 205-215.
- Branzei, D., Foiani, M. (2008). Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**(4): 297-308.
- Cai, X. L., Gao, J. P., Li, Q., Wen, L., She, Z. G., Lin, Y. C. (2008). [Cytotoxicity of the secondary metabolites of Marine Mangrove Fungus *Paecilomyces* sp. tree 1-7 on human hepatoma cell line HepG2]. *Zhong Yao Cai*, **31**(6): 864-865.
- Callen, E., Jankovic, M., Wong, N., Zha, S., Chen, H. T., Difilippantonio, S., Di Virgilio, M., Heidkamp, G., Alt, F. W., Nussenzweig, A., Nussenzweig, M. (2009). Essential role for DNA-PKcs in DNA double-strand break repair and apoptosis in ATM-deficient lymphocytes. *Mol Cell*, **34**(3): 285-297.
- Camaggi, C. M., Comparsi, R., Strocchi, E., Testoni, F., Angelelli, B., Pannuti, F. (1988). Epirubicin and doxorubicin comparative metabolism and pharmacokinetics. A cross-over study. *Cancer Chemother Pharmacol*, **21**(3): 221-228.
- Cann, K. L., Dellaire, G. (2011). Heterochromatin and the DNA damage response: the need to relax. *Biochem Cell Biol*, **89**(1): 45-60.
- Cao, S., Gao, Z., Thomas, S. J., Hecht, S. M., Lazo, J. S., Kingston, D. G. I. (2004). Marine Sesquiterpenoids that Inhibit the Lyase Activity of DNA Polymerase β . *Journal of Natural Products*, **67**(10): 1716-1718.
- Capranico, G., Binaschi, M., Borgnetto, M. E., Zunino, F., Palumbo, M. (1997). A protein-mediated mechanism for the DNA sequence-specific action of topoisomerase II poisons. *Trends Pharmacol Sci*, **18**(9): 323-329.
- Capranico, G., Tinelli, S., Austin, C. A., Fisher, M. L., Zunino, F. (1992). Different patterns of gene expression of topoisomerase II isoforms in differentiated tissues during murine development. *Biochim Biophys Acta*, **1132**(1): 43-48.
- Carrassa, L., Damia, G. (2011). Unleashing Chk1 in cancer therapy. *Cell Cycle*, **10**(13): 2121-2128.
- Carrassa, L., Damia, G. (2017). DNA damage response inhibitors: Mechanisms and potential applications in cancer therapy. *Cancer Treat Rev*, **60**: 139-151.
- Carrassa, L., Sanchez, Y., Erba, E., Damia, G. (2009). U2OS cells lacking Chk1 undergo aberrant mitosis and fail to activate the spindle checkpoint. *J Cell Mol Med*, **13**(8A): 1565-1576.
- Carreras Puigvert, J., von Stechow, L., Siddappa, R., Pines, A., Bahjat, M., Haazen, L. C., Olsen, J. V., Vrieling, H., Meerman, J. H., Mullenders, L. H., van de Water, B., Danen, E. H. (2013). Systems biology approach identifies the kinase Csnk1a1 as a regulator of the DNA damage response in embryonic stem cells. *Sci Signal*, **6**(259): ra5.

- Carte, B., Rose, C. B., Faulkner, D. J. (1985). 5-Epi-Illimaquinone, a metabolite of the sponge *Fenestraspongia* sp. *The Journal of Organic Chemistry*, **50**(15): 2785-2787.
- Carter, N. J., Keam, S. J. (2010). Trabectedin: a review of its use in soft tissue sarcoma and ovarian cancer. *Drugs*, **70**(3): 355-376.
- Castedo, M., Perfettini, J.-L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R., Kroemer, G. (2004). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, **23**(16): 2825-2837.
- Cavanagh, B. L., Walker, T., Norazit, A., Meedeniya, A. C. (2011). Thymidine analogues for tracking DNA synthesis. *Molecules*, **16**(9): 7980-7993.
- Cepeda, V., Fuertes, M. A., Castilla, J., Alonso, C., Quevedo, C., Perez, J. M. (2007). Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem*, **7**(1): 3-18.
- Chen, H. H., Kuo, M. T. (2010). Role of glutathione in the regulation of Cisplatin resistance in cancer chemotherapy. *Met Based Drugs*, **2010**.
- Chirnomas, D., Taniguchi, T., de la Vega, M., Vaidya, A. P., Vasserman, M., Hartman, A. R., Kennedy, R., Foster, R., Mahoney, J., Seiden, M. V., D'Andrea, A. D. (2006). Chemosensitization to cisplatin by inhibitors of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol Cancer Ther*, **5**(4): 952-961.
- Chlebowski, R. T. (1979). Adriamycin (doxorubicin) cardiotoxicity: a review. *West J Med*, **131**(5): 364-368.
- Chou, T. C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res*, **70**(2): 440-446.
- Christmann, M., Tomicic, M. T., Roos, W. P., Kaina, B. (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, **193**(1-2): 3-34.
- Ciarimboli, G. (2012). Membrane transporters as mediators of Cisplatin effects and side effects. *Scientifica (Cairo)*, **2012**: 473829.
- Ciarimboli, G., Deuster, D., Knief, A., Sperling, M., Holtkamp, M., Edemir, B., Pavenstadt, H., Lanvers-Kaminsky, C., am Zehnhoff-Dinnesen, A., Schinkel, A. H., Koepsell, H., Jurgens, H., Schlatter, E. (2010). Organic cation transporter 2 mediates cisplatin-induced oto- and nephrotoxicity and is a target for protective interventions. *Am J Pathol*, **176**(3): 1169-1180.
- Ciccia, A., Elledge, S. J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*, **40**(2): 179-204.
- Cimprich, K. A., Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**(8): 616-627.
- Cohen, S. M., Lippard, S. J. (2001). Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **67**: 93-130.

- Columbano, A. (1995). Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. *J Cell Biochem*, **58**(2): 181-190.
- Conklin, K. A. (2004). Chemotherapy-Associated Oxidative Stress: Impact on Chemotherapeutic Effectiveness. *Integrative Cancer Therapies*, **3**(4): 294-300.
- Cory, S., Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, **2**(9): 647-656.
- Cragg, G. M., Newman, D. J., Snader, K. M. (1997). Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod*, **60**(1): 52-60.
- Curtin, N. J. (2012). DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer*, **12**(12): 801-817.
- Czarny, P., Pawlowska, E., Bialkowska-Warzecha, J., Kaarniranta, K., Blasiak, J. (2015). Autophagy in DNA damage response. *Int J Mol Sci*, **16**(2): 2641-2662.
- Daletos, G., de Voogd, N. J., Muller, W. E., Wray, V., Lin, W., Feger, D., Kubbutat, M., Aly, A. H., Proksch, P. (2014). Cytotoxic and protein kinase inhibiting nakijiquinones and nakijiquinols from the sponge *Dactylospongia metachromia*. *J Nat Prod*, **77**(2): 218-226.
- Damrot, J., Nubel, T., Epe, B., Roos, W. P., Kaina, B., Fritz, G. (2006). Lovastatin protects human endothelial cells from the genotoxic and cytotoxic effects of the anticancer drugs doxorubicin and etoposide. *Br J Pharmacol*, **149**(8): 988-997.
- Danesi, R., Fogli, S., Gennari, A., Conte, P., Del Tacca, M. (2002). Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet*, **41**(6): 431-444.
- Davies, K. D., Cable, P. L., Garrus, J. E., Sullivan, F. X., von Carlowitz, I., Huerou, Y. L., Wallace, E., Woessner, R. D., Gross, S. (2011). Chk1 inhibition and Wee1 inhibition combine synergistically to impede cellular proliferation. *Cancer Biol Ther*, **12**(9): 788-796.
- Davis, A. J., Chen, B. P., Chen, D. J. (2014). DNA-PK: a dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway. *DNA Repair (Amst)*, **17**: 21-29.
- de Laat, W. L., Jaspers, N. G., Hoeijmakers, J. H. (1999). Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev*, **13**(7): 768-785.
- DeFazio, L. G., Stansel, R. M., Griffith, J. D., Chu, G. (2002). Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J*, **21**(12): 3192-3200.
- Demain, A. L., Vaishnav, P. (2011). Natural products for cancer chemotherapy. *Microb Biotechnol*, **4**(6): 687-699.
- Desany, B. A., Alcasabas, A. A., Bachant, J. B., Elledge, S. J. (1998). Recovery from DNA replicational stress is the essential function of the S-phase checkpoint pathway. *Genes Dev*, **12**(18): 2956-2970.

- Dickey, D. T., Wu, Y. J., Muldoon, L. L., Neuwelt, E. A. (2005). Protection against cisplatin-induced toxicities by N-acetylcysteine and sodium thiosulfate as assessed at the molecular, cellular, and in vivo levels. *J Pharmacol Exp Ther*, **314**(3): 1052-1058.
- Dimarco, A., Gaetani, M., Orezzi, P., Scarpinato, B. M., Silvestrini, R., Soldati, M., Dasdia, T., Valentini, L. (1964). 'Daunomycin', a New Antibiotic of the Rhodomycin Group. *Nature*, **201**: 706-707.
- Do, M. T., Na, M., Kim, H. G., Khanal, T., Choi, J. H., Jin, S. W., Oh, S. H., Hwang, I. H., Chung, Y. C., Kim, H. S., Jeong, T. C., Jeong, H. G. (2014). Ilimaquinone induces death receptor expression and sensitizes human colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis through activation of ROS-ERK/p38 MAPK-CHOP signaling pathways. *Food Chem Toxicol*, **71**: 51-59.
- Dornetshuber, R., Heffeter, P., Lemmens-Gruber, R., Elbling, L., Marko, D., Micksche, M., Berger, W. (2009). Oxidative stress and DNA interactions are not involved in Enniatin- and Beauvericin-mediated apoptosis induction. *Molecular nutrition & food research*, **53**(9): 1112-1122.
- Dornetshuber, R., Heffeter, P., Sulyok, M., Schumacher, R., Chiba, P., Kopp, S., Koellensperger, G., Micksche, M., Lemmens-Gruber, R., Berger, W. (2009). Interactions between ABC-transport proteins and the secondary Fusarium metabolites enniatin and beauvericin. *Molecular nutrition & food research*, **53**(7): 904-920.
- Drummond, D. C., Meyer, O., Hong, K., Kirpotin, D. B., Papahadjopoulos, D. (1999). Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol Rev*, **51**(4): 691-743.
- Dubost, M., Ganter, P., Maral, R., Ninet, L., Pinnert, S., Preudhomme, J., Werner, G. H. (1963). [a New Antibiotic with Cytostatic Properties: Rubidomycin]. *C R Hebd Seances Acad Sci*, **257**: 1813-1815.
- Duxbury, M. S., Ito, H., Benoit, E., Zinner, M. J., Ashley, S. W., Whang, E. E. (2003). RNA interference targeting focal adhesion kinase enhances pancreatic adenocarcinoma gemcitabine chemosensitivity. *Biochem Biophys Res Commun*, **311**(3): 786-792.
- Dyshlovoy, S. A., Naeth, I., Venz, S., Preukschas, M., Sievert, H., Jacobsen, C., Shubina, L. K., Gesell Salazar, M., Scharf, C., Walther, R., Krepstakies, M., Priyadarshini, P., Hauber, J., Fedorov, S. N., Bokemeyer, C., Stonik, V. A., Balabanov, S., Honecker, F. (2012). Proteomic profiling of germ cell cancer cells treated with aaptamine, a marine alkaloid with antiproliferative activity. *J Proteome Res*, **11**(4): 2316-2330.
- Dyshlovoy, S. A., Venz, S., Shubina, L. K., Fedorov, S. N., Walther, R., Jacobsen, C., Stonik, V. A., Bokemeyer, C., Balabanov, S., Honecker, F. (2014). Activity of aaptamine and two derivatives, demethyloxyaaptamine and iso-aaptamine, in cisplatin-resistant germ cell cancer. *J Proteomics*, **96**: 223-239.
- Ediriweera, M. K., Tennekoon, K. H., Samarakoon, S. R. (2019). Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: Biological and therapeutic significance. *Semin Cancer Biol*, **59**: 147-160.

- Efferth, T. (2017). Cancer combination therapies with artemisinin-type drugs. *Biochem Pharmacol*, **139**: 56-70.
- Efferth, T., Kahl, S., Paulus, K., Adams, M., Rauh, R., Boechzelt, H., Hao, X., Kaina, B., Bauer, R. (2008). Phytochemistry and pharmacogenomics of natural products derived from traditional Chinese medicine and Chinese materia medica with activity against tumor cells. *Mol Cancer Ther*, **7**(1): 152-161.
- Efferth, T., Ramirez, T., Gebhart, E., Halatsch, M. E. (2004). Combination treatment of glioblastoma multiforme cell lines with the anti-malarial artesunate and the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor OSI-774. *Biochem Pharmacol*, **67**(9): 1689-1700.
- Efferth, T., Sauerbrey, A., Olbrich, A., Gebhart, E., Rauch, P., Weber, H. O., Hengstler, J. G., Halatsch, M. E., Volm, M., Tew, K. D., Ross, D. D., Funk, J. O. (2003). Molecular modes of action of artesunate in tumor cell lines. *Mol Pharmacol*, **64**(2): 382-394.
- Eich, M., Roos, W. P., Nikolova, T., Kaina, B. (2013). Contribution of ATM and ATR to the resistance of glioblastoma and malignant melanoma cells to the methylating anticancer drug temozolomide. *Mol Cancer Ther*.
- Engel, C., Fischer, C. (2015). Breast cancer risks and risk prediction models. *Breast Care (Basel)*, **10**(1): 7-12.
- Evanno, L., Lachkar, D., Lamali, A., Boufridi, A., Séon-Méniel, B., Tintillier, F., Saulnier, D., Denis, S., Genta-Jouve, G., Jullian, J.-C., Leblanc, K., Beniddir, M. A., Petek, S., Debitus, C., Poupon, E. (2018). A Ring-Distortion Strategy from Marine Natural Product Ilimaquinone Leads to Quorum Sensing Modulators. **2018**(20-21): 2486-2497.
- Evers, B., Helleday, T., Jonkers, J. (2010). Targeting homologous recombination repair defects in cancer. *Trends Pharmacol Sci*, **31**(8): 372-380.
- Farmer, H., McCabe, N., Lord, C. J., Tutt, A. N., Johnson, D. A., Richardson, T. B., Santarosa, M., Dillon, K. J., Hickson, I., Knights, C., Martin, N. M., Jackson, S. P., Smith, G. C., Ashworth, A. (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, **434**(7035): 917-921.
- Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D. D., Guo, Z. (1985). Medicinal plants in therapy. *Bull World Health Organ*, **63**(6): 965-981.
- Feleszko, W., Jakobisiak, M. (2000). Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. *Clin Cancer Res*, **6**(3): 1198-1199.
- Fichtinger-Schepman, A. M., van der Veer, J. L., den Hartog, J. H., Lohman, P. H., Reedijk, J. (1985). Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry*, **24**(3): 707-713.
- Figlin, R. A. (2008). Mechanisms of Disease: survival benefit of temsirolimus validates a role for mTOR in the management of advanced RCC. *Nat Clin Pract Oncol*, **5**(10): 601-609.

- FitzGerald, J., Murillo, L. S., O'Brien, G., O'Connell, E., O'Connor, A., Wu, K., Wang, G. N., Rainey, M. D., Natoni, A., Healy, S., O'Dwyer, M., Santocanale, C. (2014). A high through-put screen for small molecules modulating MCM2 phosphorylation identifies Ryuvidine as an inducer of the DNA damage response. *PLoS One*, **9**(6): e98891.
- Foote, K. M., Lau, A., Nissink, J. W. (2015). Drugging ATR: progress in the development of specific inhibitors for the treatment of cancer. *Future Med Chem*, **7**(7): 873-891.
- Fornier, M. N. (2007). Ixabepilone, first in a new class of antineoplastic agents: the natural epothilones and their analogues. *Clin Breast Cancer*, **7**(10): 757-763.
- Fresno Vara, J. A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., Gonzalez-Baron, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev*, **30**(2): 193-204.
- Fritz, G., Henninger, C., Huelsenbeck, J. (2011). Potential use of HMG-CoA reductase inhibitors (statins) as radioprotective agents. *Br Med Bull*, **97**: 17-26.
- Fu, D., Calvo, J. A., Samson, L. D. (2012). Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat Rev Cancer*, **12**(2): 104-120.
- Fuks, Z., Kolesnick, R. (2005). Engaging the vascular component of the tumor response. *Cancer Cell*, **8**(2): 89-91.
- Funk, F., Krüger, K., Henninger, C., Wätjen, W., Proksch, P., Thomale, J., Fritz, G. (2014). Spongian alkaloids protect rat kidney cells against cisplatin-induced cytotoxicity. *Anticancer Drugs*, **25**(8): 917-929.
- Furuta, T., Ueda, T., Aune, G., Sarasin, A., Kraemer, K. H., Pommier, Y. (2002). Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. *Cancer Res*, **62**(17): 4899-4902.
- Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., Castedo, M., Kroemer, G. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, **31**(15): 1869-1883.
- Gatz, S. A., Keimling, M., Baumann, C., Dork, T., Debatin, K. M., Fulda, S., Wiesmuller, L. (2008). Resveratrol modulates DNA double-strand break repair pathways in an ATM/ATR-p53- and -Nbs1-dependent manner. *Carcinogenesis*, **29**(3): 519-527.
- Gelasco, A., Lippard, S. J. (1998). NMR solution structure of a DNA dodecamer duplex containing a cis-diammineplatinum(II) d(GpG) intrastrand cross-link, the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Biochemistry*, **37**(26): 9230-9239.
- Gewirtz, D. A. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*, **57**(7): 727-741.
- Goglia, A. G., Delsite, R., Luz, A. N., Shahbazian, D., Salem, A. F., Sundaram, R. K., Chiaravalli, J., Hendrikx, P. J., Wilshire, J. A., Jasin, M., Kluger, H. M., Glickman, J. F., Powell, S. N., Bindra, R. S. (2015). Identification of novel

- radiosensitizers in a high-throughput, cell-based screen for DSB repair inhibitors. *Mol Cancer Ther*, **14**(2): 326-342.
- Gopalakrishnan, C., Shankaranarayanan, D., Nazimudeen, S. K., Kameswaran, L. (1980). Effect of tylophorine, a major alkaloid of *Tylophora indica*, on immunopathological and inflammatory reactions. *Indian J Med Res*, **71**: 940-948.
- Gorgoulis, V. G., Vassiliou, L. V., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., Ditullio, R. A., Jr., Kastriakis, N. G., Levy, B., Kletsas, D., Yoneta, A., Herlyn, M., Kittas, C., Halazonetis, T. D. (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature*, **434**(7035): 907-913.
- Gorski, D. H., Beckett, M. A., Jaskowiak, N. T., Calvin, D. P., Mauceri, H. J., Salloum, R. M., Seetharam, S., Koons, A., Hari, D. M., Kufe, D. W., Weichselbaum, R. R. (1999). Blockade of the Vascular Endothelial Growth Factor Stress Response Increases the Antitumor Effects of Ionizing Radiation. *Cancer Research*, **59**(14): 3374.
- Goswami, P. C., Roti Roti, J. L., Hunt, C. R. (1996). The cell cycle-coupled expression of topoisomerase II α during S phase is regulated by mRNA stability and is disrupted by heat shock or ionizing radiation. *Mol Cell Biol*, **16**(4): 1500-1508.
- Guo, Z., Kumagai, A., Wang, S. X., Dunphy, W. G. (2000). Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev*, **14**(21): 2745-2756.
- Guo, Z., She, Z., Shao, C., Wen, L., Liu, F., Zheng, Z., Lin, Y. (2007). (1)H and (13)C NMR signal assignments of paecilin A and B, two new chromone derivatives from mangrove endophytic fungus *Paecilomyces* sp. (tree 1-7). *Magn Reson Chem*, **45**(9): 777-780.
- Gupta, R. C., Golub, E. I., Wold, M. S., Radding, C. M. (1998). Polarity of DNA strand exchange promoted by recombination proteins of the RecA family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(17): 9843-9848.
- Gürtler, U., Tontsch-Grunt, U., Jarvis, M., Zahn, S. K., Boehmelt, G., Quant, J., Adolf, G. R., Solca, F. (2010). Effect of BI 811283, a novel inhibitor of Aurora B kinase, on tumor senescence and apoptosis. **28**(15_suppl): e13632-e13632.
- Guru, S. K., Pathania, A. S., Kumar, S., Ramesh, D., Kumar, M., Rana, S., Kumar, A., Malik, F., Sharma, P. R., Chandan, B. K., Jaglan, S., Sharma, J. P., Shah, B. A., Tasduq, S. A., Lattoo, S. K., Faruk, A., Saxena, A. K., Vishwakarma, R. A., Bhushan, S. (2015). Secalonic Acid-D Represses HIF1 α /VEGF-Mediated Angiogenesis by Regulating the Akt/mTOR/p70S6K Signaling Cascade. *Cancer Res*, **75**(14): 2886-2896.
- Halder, J., Landen, C. N., Jr., Lutgendorf, S. K., Li, Y., Jennings, N. B., Fan, D., Nelkin, G. M., Schmandt, R., Schaller, M. D., Sood, A. K. (2005). Focal adhesion kinase silencing augments docetaxel-mediated apoptosis in ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res*, **11**(24 Pt 1): 8829-8836.

- Hamacher-Brady, A., Stein, H. A., Turschner, S., Toegel, I., Mora, R., Jennewein, N., Efferth, T., Eils, R., Brady, N. R. (2011). Artesunate activates mitochondrial apoptosis in breast cancer cells via iron-catalyzed lysosomal reactive oxygen species production. *J Biol Chem*, **286**(8): 6587-6601.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**(5): 646-674.
- Harada, M., Yano, S., Watanabe, H., Yamazaki, M., Miyaki, K. (1974). Phlogistic activity of secalonic acid A. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **22**(7): 1600-1606.
- Harfe, B. D., Jinks-Robertson, S. (2000). DNA mismatch repair and genetic instability. *Annu Rev Genet*, **34**: 359-399.
- Harper, J. W., Elledge, S. J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell*, **28**(5): 739-745.
- Havens, C. G., Ho, A., Yoshioka, N., Dowdy, S. F. (2006). Regulation of late G1/S phase transition and APC Cdh1 by reactive oxygen species. *Mol Cell Biol*, **26**(12): 4701-4711.
- Hegi, M. E., Diserens, A. C., Gorlia, T., Hamou, M. F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J. E., Hau, P., Mirimanoff, R. O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C., Stupp, R. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*, **352**(10): 997-1003.
- Heikkinen, K., Karppinen, S. M., Soini, Y., Mäkinen, M., Winqvist, R. (2003). Mutation screening of Mre11 complex genes: indication of RAD50 involvement in breast and ovarian cancer susceptibility. *J Med Genet*, **40**(12): e131.
- Hempel, S. L., Buettner, G. R., O'Malley, Y. Q., Wessels, D. A., Flaherty, D. M. (1999). Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med*, **27**(1-2): 146-159.
- Hemphill, C. F. P., Sureechatchaiyan, P., Kassack, M. U., Orfali, R. S., Lin, W., Daletos, G., Proksch, P. (2017). OSMAC approach leads to new fusarielin metabolites from *Fusarium tricinctum*. *J Antibiot (Tokyo)*, **70**(6): 726-732.
- Henzel, M. J., Wei, Y., Mancini, M. A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B. R., Bazett-Jones, D. P., Allis, C. D. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, **106**(6): 348-360.
- Henninger, C., Huelsenbeck, S., Wenzel, P., Brand, M., Huelsenbeck, J., Schad, A., Fritz, G. (2015). Chronic heart damage following doxorubicin treatment is alleviated by lovastatin. *Pharmacol Res*, **91**: 47-56.
- Hess, A. R., Postovit, L. M., Margaryan, N. V., Seftor, E. A., Schneider, G. B., Seftor, R. E., Nickoloff, B. J., Hendrix, M. J. (2005). Focal adhesion kinase promotes the aggressive melanoma phenotype. *Cancer Res*, **65**(21): 9851-9860.

- Hewitt, G., Korolchuk, V. I. (2017). Repair, Reuse, Recycle: The Expanding Role of Autophagy in Genome Maintenance. *Trends Cell Biol*, **27**(5): 340-351.
- Hinterding, K., Knebel, A., Herrlich, P., Waldmann, H. (1998). Synthesis and biological evaluation of aeropylsinin analogues: a new class of receptor tyrosine kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem*, **6**(8): 1153-1162.
- Hirst, A. M., Simms, M. S., Mann, V. M., Maitland, N. J., O'Connell, D., Frame, F. M. (2015). Low-temperature plasma treatment induces DNA damage leading to necrotic cell death in primary prostate epithelial cells. *Br J Cancer*, **112**(9): 1536-1545.
- Hoeflerlin, L. A., Oleinik, N. V., Krupenko, N. I., Krupenko, S. A. (2011). Activation of p21-Dependent G1/G2 Arrest in the Absence of DNA Damage as an Antiapoptotic Response to Metabolic Stress. *Genes Cancer*, **2**(9): 889-899.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, **411**(6835): 366-374.
- Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., Sarkar, S. (2014). Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel)*, **6**(3): 1769-1792.
- Hua, H., Kearsley, S. E. (2011). Monitoring DNA replication in fission yeast by incorporation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine. *Nucleic Acids Res*, **39**(9): e60.
- Huang, H., Lin, H., Zhang, X., Li, J. (2012). Resveratrol reverses temozolomide resistance by downregulation of MGMT in T98G glioblastoma cells by the NF-kappaB-dependent pathway. *Oncol Rep*, **27**(6): 2050-2056.
- Huang, J. C., Zamble, D. B., Reardon, J. T., Lippard, S. J., Sancar, A. (1994). HMG-domain proteins specifically inhibit the repair of the major DNA adduct of the anticancer drug cisplatin by human excision nuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**(22): 10394-10398.
- Huelsenbeck, J., Henninger, C., Schad, A., Lackner, K. J., Kaina, B., Fritz, G. (2011). Inhibition of Rac1 signaling by lovastatin protects against anthracycline-induced cardiac toxicity. *Cell Death Dis*, **2**: e190.
- Ishida, S., Lee, J., Thiele, D. J., Herskowitz, I. (2002). Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(22): 14298-14302.
- Iwaguchi, T., Kitagawa, H., Hirose, K., Ishida, T., Yamamoto, T. (1980). 5-Di-(2'-tetrahydropyranyl)secalonic acid D as a new antibiotic derivative with anticancer activity. *Gan*, **71**(6): 900-906.
- Jackson, S. P., Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, **461**(7267): 1071-1078.
- Jain, M., Barthwal, S. K., Barthwal, R., Govil, G. (2005). Restrained molecular dynamics studies on complex of adriamycin with DNA hexamer sequence d-CGATCG. *Arch Biochem Biophys*, **439**(1): 12-24.

- Jalal, S., Earley, J. N., Turchi, J. J. (2011). DNA repair: from genome maintenance to biomarker and therapeutic target. *Clin Cancer Res*, **17**(22): 6973-6984.
- Jamieson, E. R., Lippard, S. J. (1999). Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev*, **99**(9): 2467-2498.
- Jemal, A., Center, M. M., DeSantis, C., Ward, E. M. (2010). Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **19**(8): 1893-1907.
- Jin, M., Zhao, W., Zhang, Y., Kobayashi, M., Duan, H., Kong, D. (2011). Antiproliferative effect of aaptamine on human chronic myeloid leukemia k562 cells. *Int J Mol Sci*, **12**(11): 7352-7359.
- Johnson, J. M., Latimer, J. J. (2005), Totowa, NJ, Analysis of DNA Repair Using Transfection-Based Host Cell Reactivation.
- Johnson, R. D., Jasin, M. (2000). Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *EMBO J*, **19**(13): 3398-3407.
- Judson, I., Kelland, L. R. (2000). New developments and approaches in the platinum arena. *Drugs*, **59 Suppl 4**: 29-36; discussion 37-28.
- Jung, Y., Lippard, S. J. (2007). Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chem Rev*, **107**(5): 1387-1407.
- Juvekar, A., Hu, H., Yadegarynia, S., Lyssiotis, C. A., Ullas, S., Lien, E. C., Bellinger, G., Son, J., Hok, R. C., Seth, P., Daly, M. B., Kim, B., Scully, R., Asara, J. M., Cantley, L. C., Wulf, G. M. (2016). Phosphoinositide 3-kinase inhibitors induce DNA damage through nucleoside depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **113**(30): E4338-4347.
- Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S., Roos, W. P. (2007). MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)*, **6**(8): 1079-1099.
- Karran, P., Bignami, M. (1994). DNA damage tolerance, mismatch repair and genome instability. *Bioessays*, **16**(11): 833-839.
- Kartalou, M., Essigmann, J. M. (2001). Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutat Res*, **478**(1-2): 1-21.
- Kaufmann, S. H., Hancock, R. (1995). Topoisomerase II as a target for anticancer chemotherapy. *Acta Biochim Pol*, **42**(4): 381-393.
- Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, **7**(8): 573-584.
- Kiem, P. V., Huyen, L. T., Hang, D. T., Nhiem, N. X., Tai, B. H., Anh, H. L., Cuong, P. V., Quang, T. H., Minh, C. V., Dau, N. V., Kim, Y. A., Subedi, L., Kim, S. Y., Kim, S. H. (2017). Sesquiterpene derivatives from marine sponge *Smenospongia cerebriformis* and their anti-inflammatory activity. *Bioorg Med Chem Lett*, **27**(7): 1525-1529.

- Kinghorn, A. D., EJ, D. E. B., Lucas, D. M., Rakotondraibe, H. L., Orjala, J., Soejarto, D. D., Oberlies, N. H., Pearce, C. J., Wani, M. C., Stockwell, B. R., Burdette, J. E., Swanson, S. M., Fuchs, J. R., Phelps, M. A., Xu, L., Zhang, X., Shen, Y. Y. (2016). Discovery of Anticancer Agents of Diverse Natural Origin. *Anticancer Res*, **36**(11): 5623-5637.
- Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., Iliakis, G. (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res*, **36**(17): 5678-5694.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*, **14**(22): 5579-5588.
- Klungland, A., Lindahl, T. (1997). Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *EMBO J*, **16**(11): 3341-3348.
- Ko, A., Kanehisa, A., Martins, I., Senovilla, L., Chargari, C., Dugue, D., Mariño, G., Kepp, O., Michaud, M., Perfettini, J. L., Kroemer, G., Deutsch, E. (2014). Autophagy inhibition radiosensitizes in vitro, yet reduces radioresponses in vivo due to deficient immunogenic signalling. *Cell Death & Differentiation*, **21**(1): 92-99.
- Koberle, B., Tomicic, M. T., Usanova, S., Kaina, B. (2010). Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys Acta*, **1806**(2): 172-182.
- Kolas, N. K., Chapman, J. R., Nakada, S., Ylanko, J., Chahwan, R., Sweeney, F. D., Panier, S., Mendez, M., Wildenhain, J., Thomson, T. M., Pelletier, L., Jackson, S. P., Durocher, D. (2007). Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science*, **318**(5856): 1637-1640.
- Koulman, A., Proksch, P., Ebel, R., Beekman, A. C., van Uden, W., Konings, A. W., Pedersen, J. A., Pras, N., Woerdenbag, H. J. (1996). Cytotoxicity and mode of action of aeropylsinin-1 and a related dienone from the sponge *Aplysina aerophoba*. *J Nat Prod*, **59**(6): 591-594.
- Kreuter, M. H., Bernd, A., Holzmann, H., Muller-Klieser, W., Maidhof, A., Weissmann, N., Kljajic, Z., Batel, R., Schroder, H. C., Muller, W. E. (1989). Cytostatic activity of aeropylsinin-1 against lymphoma and epithelioma cells. *Z Naturforsch C J Biosci*, **44**(7-8): 680-688.
- Kreuter, M. H., Leake, R. E., Rinaldi, F., Muller-Klieser, W., Maidhof, A., Muller, W. E., Schroder, H. C. (1990). Inhibition of intrinsic protein tyrosine kinase activity of EGF-receptor kinase complex from human breast cancer cells by the marine sponge metabolite (+)-aeropylsinin-1. *Comp Biochem Physiol B*, **97**(1): 151-158.
- Krishan, A., Frei, E., 3rd (1976). Effect of adriamycin on the cell cycle traverse and kinetics of cultured human lymphoblasts. *Cancer Res*, **36**(1): 143-150.
- Krüger, K., Ziegler, V., Hartmann, C., Henninger, C., Thomale, J., Schupp, N., Fritz, G. (2016). Lovastatin prevents cisplatin-induced activation of pro-apoptotic DNA

- damage response (DDR) of renal tubular epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, **292**: 103-114.
- Kruidering, M., Evan, G. I. (2000). Caspase-8 in Apoptosis: The Beginning of "The End"? **50**(2): 85-90.
- Kubota, Y., Nash, R. A., Klungland, A., Schar, P., Barnes, D. E., Lindahl, T. (1996). Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *EMBO J*, **15**(23): 6662-6670.
- Kundu, S., Kim, T. H., Yoon, J. H., Shin, H. S., Lee, J., Jung, J. H., Kim, H. S. (2014). Viriditoxin regulates apoptosis and autophagy via mitotic catastrophe and microtubule formation in human prostate cancer cells. *Int J Oncol*, **45**(6): 2331-2340.
- Kurobane, I., Iwahashi, S., Fukuda, A. (1987). Cytostatic activity of naturally isolated isomers of secalonic acids and their chemically rearranged dimers. *Drugs Exp Clin Res*, **13**(6): 339-344.
- Kwak, C. H., Jin, L., Han, J. H., Han, C. W., Kim, E., Cho, M., Chung, T. W., Bae, S. J., Jang, S. B., Ha, K. T. (2020). Ilimaquinone Induces the Apoptotic Cell Death of Cancer Cells by Reducing Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1 Activity. *Int J Mol Sci*, **21**(17).
- Lamm, N., Rogers, S., Cesare, A. J. (2019). The mTOR pathway: Implications for DNA replication. *Prog Biophys Mol Biol*, **147**: 17-25.
- Lee, F. Y., Borzilleri, R., Fairchild, C. R., Kamath, A., Smykla, R., Kramer, R., Vite, G. (2008). Preclinical discovery of ixabepilone, a highly active antineoplastic agent. *Cancer Chemother Pharmacol*, **63**(1): 157-166.
- Lee, F. Y., Smykla, R., Johnston, K., Menard, K., McGlinchey, K., Peterson, R. W., Wiebesiek, A., Vite, G., Fairchild, C. R., Kramer, R. (2009). Preclinical efficacy spectrum and pharmacokinetics of ixabepilone. *Cancer Chemother Pharmacol*, **63**(2): 201-212.
- Lee, J. H., Paull, T. T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*, **308**(5721): 551-554.
- Leon-Galicia, I., Diaz-Chavez, J., Albino-Sanchez, M. E., Garcia-Villa, E., Bermudez-Cruz, R., Garcia-Mena, J., Herrera, L. A., Garcia-Carranca, A., Gariglio, P. (2018). Resveratrol decreases Rad51 expression and sensitizes cisplatinresistant MCF7 breast cancer cells. *Oncol Rep*, **39**(6): 3025-3033.
- Leon-Galicia, I., Diaz-Chavez, J., Garcia-Villa, E., Uribe-Figueroa, L., Hidalgo-Miranda, A., Herrera, L. A., Alvarez-Rios, E., Garcia-Mena, J., Gariglio, P. (2013). Resveratrol induces downregulation of DNA repair genes in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur J Cancer Prev*, **22**(1): 11-20.
- Lheureux, S., Gourley, C., Vergote, I., Oza, A. M. (2019). Epithelial ovarian cancer. *Lancet*, **393**(10177): 1240-1253.

- Li, G. M. (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res*, **18**(1): 85-98.
- Li, N., Banin, S., Ouyang, H., Li, G. C., Courtois, G., Shiloh, Y., Karin, M., Rotman, G. (2001). ATM Is Required for I κ B Kinase (IKK) Activation in Response to DNA Double Strand Breaks*. *Journal of Biological Chemistry*, **276**(12): 8898-8903.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell*, **91**(4): 479-489.
- Li, P. C., Lam, E., Roos, W. P., Zdzienicka, M. Z., Kaina, B., Efferth, T. (2008). Artesunate derived from traditional Chinese medicine induces DNA damage and repair. *Cancer Res*, **68**(11): 4347-4351.
- Li, T. K., Chen, A. Y., Yu, C., Mao, Y., Wang, H., Liu, L. F. (1999). Activation of topoisomerase II-mediated excision of chromosomal DNA loops during oxidative stress. *Genes Dev*, **13**(12): 1553-1560.
- Li, Z., Li, Q., Wu, J., Wang, M., Yu, J. (2016). Artemisinin and Its Derivatives as a Repurposing Anticancer Agent: What Else Do We Need to Do? *Molecules*, **21**(10).
- Liao, H., Winkfein, R. J., Mack, G., Rattner, J. B., Yen, T. J. (1995). CENP-F is a protein of the nuclear matrix that assembles onto kinetochores at late G2 and is rapidly degraded after mitosis. *The Journal of cell biology*, **130**(3): 507-518.
- Liccardi, G., Hartley, J. A., Hochhauser, D. (2011). EGFR nuclear translocation modulates DNA repair following cisplatin and ionizing radiation treatment. *Cancer Res*, **71**(3): 1103-1114.
- Lichota, A., Gwozdziński, K. (2018). Anticancer Activity of Natural Compounds from Plant and Marine Environment. *Int J Mol Sci*, **19**(11).
- Liedert, B., Pluim, D., Schellens, J., Thomale, J. (2006). Adduct-specific monoclonal antibodies for the measurement of cisplatin-induced DNA lesions in individual cell nuclei. *Nucleic Acids Res*, **34**(6): e47.
- Lin, C. W., Bai, L. Y., Su, J. H., Chiu, C. F., Lin, W. Y., Huang, W. T., Shih, M. C., Huang, Y. T., Hu, J. L., Weng, J. R. (2020). Ilimaquinone Induces Apoptosis and Autophagy in Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. *Biomedicines*, **8**(9).
- Lin, X., Yan, J., Tang, D. (2013). ERK kinases modulate the activation of PI3 kinase related kinases (PIKKs) in DNA damage response. *Histology and histopathology*, **28**.
- Liu, J., Wan, Y., Zhao, Z., Chen, H. (2013). Determination of the content of rosmarinic acid by HPLC and analytical comparison of volatile constituents by GC-MS in different parts of *Perilla frutescens* (L.) Britt. *Chemistry Central Journal*, **7**(1): 61.

- Liu, W. M., Gravett, A. M., Dalgleish, A. G. (2011). The antimalarial agent artesunate possesses anticancer properties that can be enhanced by combination strategies. *Int J Cancer*, **128**(6): 1471-1480.
- Liu, Y., Bae, B. H., Alam, N., Hong, J., Sim, C. J., Lee, C.-O., Im, K. S., Jung, J. H. (2001). New Cytotoxic Sesterterpenes from the Sponge *Sarcotragus* Species. *Journal of Natural Products*, **64**(10): 1301-1304.
- Liu, Y., Kurtan, T., Yun Wang, C., Han Lin, W., Orfali, R., Muller, W. E., Daletos, G., Proksch, P. (2016). Cladosporinone, a new viriditoxin derivative from the hypersaline lake derived fungus *Cladosporium cladosporioides*. *J Antibiot (Tokyo)*, **69**(9): 702-706.
- Liu, Y., Zhou, K., Zhang, H., Shugart, Y. Y., Chen, L., Xu, Z., Zhong, Y., Liu, H., Jin, L., Wei, Q., Huang, F., Lu, D., Zhou, L. (2008). Polymorphisms of LIG4 and XRCC4 involved in the NHEJ pathway interact to modify risk of glioma. *Hum Mutat*, **29**(3): 381-389.
- Lobrich, M., Shibata, A., Beucher, A., Fisher, A., Ensminger, M., Goodarzi, A. A., Barton, O., Jeggo, P. A. (2010). gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle*, **9**(4): 662-669.
- Logrieco, A., Moretti, A., Castella, G., KostECKI, M., Golinski, P., Ritieni, A., Chelkowski, J. (1998). Beauvericin production by *Fusarium* species. *Applied and environmental microbiology*, **64**(8): 3084-3088.
- Longley, M. J., Pierce, A. J., Modrich, P. (1997). DNA polymerase delta is required for human mismatch repair in vitro. *J Biol Chem*, **272**(16): 10917-10921.
- LoPiccolo, J., Blumenthal, G. M., Bernstein, W. B., Dennis, P. A. (2008). Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat*, **11**(1-2): 32-50.
- Lown, J. W. (1993). Anthracycline and anthraquinone anticancer agents: current status and recent developments. *Pharmacol Ther*, **60**(2): 185-214.
- Lown, J. W., Sim, S. K., Majumdar, K. C., Chang, R. Y. (1977). Strand scission of DNA by bound adriamycin and daunorubicin in the presence of reducing agents. *Biochem Biophys Res Commun*, **76**(3): 705-710.
- Loya, S., Rudi, A., Kashman, Y., Hizi, A. (1997). Mode of inhibition of HIV reverse transcriptase by 2-hexaprenylhydroquinone, a novel general inhibitor of RNA- and DNA-directed DNA polymerases. *Biochem J*, **324** (Pt 3): 721-727.
- Loya, S., Tal, R., Kashman, Y., Hizi, A. (1990). Illimaquinone, a selective inhibitor of the RNase H activity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. **34**(10): 2009-2012.
- Lu, P. H., Chueh, S. C., Kung, F. L., Pan, S. L., Shen, Y. C., Guh, J. H. (2007). Illimaquinone, a marine sponge metabolite, displays anticancer activity via GADD153-mediated pathway. *Eur J Pharmacol*, **556**(1-3): 45-54.

- Luo, M., He, H., Kelley, M. R., Georgiadis, M. M. (2010). Redox regulation of DNA repair: implications for human health and cancer therapeutic development. *Antioxid Redox Signal*, **12**(11): 1247-1269.
- Lupetti, A., Danesi, R., Campa, M., Del Tacca, M., Kelly, S. (2002). Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med*, **8**(2): 76-81.
- Luqmani, Y. A. (2005). Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med Princ Pract*, **14 Suppl 1**: 35-48.
- Lyu, Y. L., Kerrigan, J. E., Lin, C. P., Azarova, A. M., Tsai, Y. C., Ban, Y., Liu, L. F. (2007). Topoisomerase IIbeta mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer Res*, **67**(18): 8839-8846.
- Ma, H. T., Poon, R. Y. C. (2020). Aurora kinases and DNA damage response. *Mutat Res*, **821**: 111716.
- Ma, W. W., Jimeno, A. (2007). Temsirolimus. *Drugs Today (Barc)*, **43**(10): 659-669.
- Macaron, C., Leach, B. H., Burke, C. A. (2015). Hereditary colorectal cancer syndromes and genetic testing. *J Surg Oncol*, **111**(1): 103-111.
- Magnaghi-Jaulin, L., Eot-Houllier, G., Gallaud, E., Giet, R. (2019). Aurora A Protein Kinase: To the Centrosome and Beyond. **9**(1): 28.
- Mah, L. J., El-Osta, A., Karagiannis, T. C. (2010). gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia*, **24**(4): 679-686.
- Mann, J. (2002). Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nat Rev Cancer*, **2**(2): 143-148.
- Marechal, A., Zou, L. (2013). DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **5**(9).
- Martin, S. A., Lord, C. J., Ashworth, A. (2010). Therapeutic targeting of the DNA mismatch repair pathway. *Clin Cancer Res*, **16**(21): 5107-5113.
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M., Green, D. R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*, **182**(5): 1545-1556.
- Martinez-Poveda, B., Garcia-Vilas, J. A., Cardenas, C., Melgarejo, E., Quesada, A. R., Medina, M. A. (2013). The brominated compound aeropylsinin-1 inhibits proliferation and the expression of key pro-inflammatory molecules in human endothelial and monocyte cells. *PLoS One*, **8**(1): e55203.
- Martinez-Poveda, B., Rodriguez-Nieto, S., Garcia-Caballero, M., Medina, M. A., Quesada, A. R. (2012). The antiangiogenic compound aeropylsinin-1 induces apoptosis in endothelial cells by activating the mitochondrial pathway. *Mar Drugs*, **10**(9): 2033-2046.

- Marullo, R., Werner, E., Degtyareva, N., Moore, B., Altavilla, G., Ramalingam, S. S., Doetsch, P. W. (2013). Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. *PLoS One*, **8**(11): e81162.
- Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K., Elledge, S. J. (2000). Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(19): 10389-10394.
- Mayer, S., Prechtel, M., Liebfried, P., Cadeddu, R. P., Stuhldreier, F., Kohl, M., Wenzel, F., Stork, B., Wesselborg, S., Proksch, P., Germing, U., Haas, R., Jager, P. (2019). First Results from a Screening of 300 Naturally Occurring Compounds: 4,6-dibromo-2-(2',4'-dibromophenoxy)phenol, 4,5,6-tribromo-2-(2',4'-dibromophenoxy)phenol, and 5-epi-nakijinone Q as Substances with the Potential for Anticancer Therapy. *Mar Drugs*, **17**(9).
- Mazouzi, A., Velimezi, G., Loizou, J. I. (2014). DNA replication stress: causes, resolution and disease. *Exp Cell Res*, **329**(1): 85-93.
- McLeod, H. L. (1998). Clinically relevant drug-drug interactions in oncology. *Br J Clin Pharmacol*, **45**(6): 539-544.
- Melisi, D., Chiao, P. J. (2007). NF-kappa B as a target for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*, **11**(2): 133-144.
- Mello, J. A., Lippard, S. J., Essigmann, J. M. (1995). DNA adducts of cis-diamminedichloroplatinum(II) and its trans isomer inhibit RNA polymerase II differentially in vivo. *Biochemistry*, **34**(45): 14783-14791.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)*, **84**(4): 407-412.
- Mordente, A., Meucci, E., Silvestrini, A., Martorana, G. E., Giardina, B. (2012). Anthracyclines and mitochondria. *Adv Exp Med Biol*, **942**: 385-419.
- Mu, D., Park, C. H., Matsunaga, T., Hsu, D. S., Reardon, J. T., Sancar, A. (1995). Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system. *J Biol Chem*, **270**(6): 2415-2418.
- Murphy, A. K., Fitzgerald, M., Ro, T., Kim, J. H., Rabinowitsch, A. I., Chowdhury, D., Schildkraut, C. L., Borowiec, J. A. (2014). Phosphorylated RPA recruits PALB2 to stalled DNA replication forks to facilitate fork recovery. *J Cell Biol*, **206**(4): 493-507.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Menzel, S., Gudermann, T., Hinz, B., Ruth, P. (2019). Chemotherapie maligner Tumoren. Mutschler - Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 11. Auflage; S. 873 ff.
- Myers, C. (1988). Anthracyclines. *Cancer Chemother Biol Response Modif*, **10**: 33-39.
- Nakatsu, Y., Asahina, H., Citterio, E., Rademakers, S., Vermeulen, W., Kamiuchi, S., Yeo, J. P., Khaw, M. C., Saijo, M., Kodo, N., Matsuda, T., Hoeijmakers, J. H.,

- Tanaka, K. (2000). XAB2, a novel tetratricopeptide repeat protein involved in transcription-coupled DNA repair and transcription. *J Biol Chem*, **275**(45): 34931-34937.
- Nakshatri, H., Bhat-Nakshatri, P., Martin, D. A., Goulet, R. J., Jr., Sledge, G. W., Jr. (1997). Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Mol Cell Biol*, **17**(7): 3629-3639.
- Nam, Edward A., Cortez, D. (2011). ATR signalling: more than meeting at the fork. *Biochemical Journal*, **436**(3): 527-536.
- Nielsen, D., Skovsgaard, T. (1992). P-glycoprotein as multidrug transporter: a critical review of current multidrug resistant cell lines. *Biochim Biophys Acta*, **1139**(3): 169-183.
- Nikolova, T., Göder, A., Parplys, A., Borgmann, K. (2017), New York, NY, DNA Fiber Spreading Assay to Test HDACi Effects on DNA and Its Replication.
- Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E., Capaccioli, S. (2009). Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol Res*, **59**(6): 365-378.
- Norbury, C. J., Hickson, I. D. (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **41**: 367-401.
- Norbury, C. J., Zhivotovsky, B. (2004). DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*, **23**(16): 2797-2808.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*, **267**(17): 5421-5426.
- O'Connor, M. J. (2015). Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Mol Cell*, **60**(4): 547-560.
- Okamoto, H., Yasui, K., Zhao, C., Arai, S., Inazawa, J. (2003). PTK2 and EIF3S3 genes may be amplification targets at 8q23-q24 and are associated with large hepatocellular carcinomas. *Hepatology*, **38**(5): 1242-1249.
- Oki, T. (1977). New anthracycline antibiotics. *Jpn J Antibiot*, **30 Suppl**: 70-84.
- Olive, P. L. (2004). Detection of DNA damage in individual cells by analysis of histone H2AX phosphorylation. *Methods Cell Biol*, **75**: 355-373.
- Olive, P. L., Banath, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc*, **1**(1): 23-29.
- Olive, P. L., Banath, J. P. (2009). Kinetics of H2AX phosphorylation after exposure to cisplatin. *Cytometry B Clin Cytom*, **76**(2): 79-90.
- Oliveira, M. S., Carvalho, J. L., Campos, A. C., Gomes, D. A., de Goes, A. M., Melo, M. M. (2014). Doxorubicin has in vivo toxicological effects on ex vivo cultured mesenchymal stem cells. *Toxicol Lett*, **224**(3): 380-386.

- Owens, L. V., Xu, L., Craven, R. J., Dent, G. A., Weiner, T. M., Kornberg, L., Liu, E. T., Cance, W. G. (1995). Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res*, **55**(13): 2752-2755.
- Özenver, N., Dawood, M., Fleischer, E., Klinger, A., Efferth, T. (2020). Chemometric and Transcriptomic Profiling, Microtubule Disruption and Cell Death Induction by Secalonic Acid in Tumor Cells. *Molecules*, **25**(14).
- Pabla, N., Murphy, R. F., Liu, K., Dong, Z. (2009). The copper transporter Ctr1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol*, **296**(3): F505-511.
- Palayoor, S. T., Youmell, M. Y., Calderwood, S. K., Coleman, C. N., Price, B. D. (1999). Constitutive activation of I κ B kinase alpha and NF-kappaB in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen. *Oncogene*, **18**(51): 7389-7394.
- Pan, M. H., Lai, C. S., Wu, J. C., Ho, C. T. (2011). Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds. *Molecular nutrition & food research*, **55**(1): 32-45.
- Panier, S., Boulton, S. J. (2014). Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **15**(1): 7-18.
- Park, J. H., Lee, B. L., Yoon, J., Kim, J., Kim, M. A., Yang, H. K., Kim, W. H. (2010). Focal adhesion kinase (FAK) gene amplification and its clinical implications in gastric cancer. *Hum Pathol*, **41**(12): 1664-1673.
- Patel, D. J., Canuel, L. L. (1978). Anthracycline antitumor antibiotic nucleic-acid interactions. Structural aspects of the daunomycin poly(dA-dT) complex in solution. *Eur J Biochem*, **90**(2): 247-254.
- Paull, T. T., Gellert, M. (1999). Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev*, **13**(10): 1276-1288.
- Paulsen, R. D., Soni, D. V., Wollman, R., Hahn, A. T., Yee, M. C., Guan, A., Hesley, J. A., Miller, S. C., Cromwell, E. F., Solow-Cordero, D. E., Meyer, T., Cimprich, K. A. (2009). A genome-wide siRNA screen reveals diverse cellular processes and pathways that mediate genome stability. *Mol Cell*, **35**(2): 228-239.
- Pelegri, A. L., Moura, D. J., Brenner, B. L., Ledur, P. F., Maques, G. P., Henriques, J. A., Saffi, J., Lenz, G. (2010). Nek1 silencing slows down DNA repair and blocks DNA damage-induced cell cycle arrest. *Mutagenesis*, **25**(5): 447-454.
- Peyrone, M. (1844). Über die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür. *Ann Chem Pharm*,(51): 1-29.
- Pfister, L., Moser, C., Gegenfurtner, F., Arner, A., Foerster, F., Atzberger, C., Zisis, T., Kubisch-Dohmen, R., Busse, J., Smith, R., Timinszky, G., Kalina, O. V., Müller, R., Wagner, E., Vollmar, A. M., Zahler, S. (2019). Targeting actin inhibits repair of doxorubicin-induced DNA damage: a novel therapeutic approach for combination therapy. *Cell Death Dis*, **10**(4): 302.

- Pigram, W. J., Fuller, W., Hamilton, L. D. (1972). Stereochemistry of intercalation: interaction of daunomycin with DNA. *Nat New Biol*, **235**(53): 17-19.
- Pinto, A. L., Lippard, S. J. (1985). Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) to DNA. *Biochim Biophys Acta*, **780**(3): 167-180.
- Poruchynsky, M. S., Komlodi-Pasztor, E., Trostel, S., Wilkerson, J., Regairaz, M., Pommier, Y., Zhang, X., Kumar Maity, T., Robey, R., Burotto, M., Sackett, D., Guha, U., Fojo, A. T. (2015). Microtubule-targeting agents augment the toxicity of DNA-damaging agents by disrupting intracellular trafficking of DNA repair proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **112**(5): 1571-1576.
- Potter, A. J., Gollahon, K. A., Palanca, B. J., Harbert, M. J., Choi, Y. M., Moskovitz, A. H., Potter, J. D., Rabinovitch, P. S. (2002). Flow cytometric analysis of the cell cycle phase specificity of DNA damage induced by radiation, hydrogen peroxide and doxorubicin. *Carcinogenesis*, **23**(3): 389-401.
- Prestayko, A. W., D'Aoust, J. C., Issell, B. F., Crooke, S. T. (1979). Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II). *Cancer Treat Rev*, **6**(1): 17-39.
- Puigvert, J. C., Sanjiv, K., Helleday, T. (2016). Targeting DNA repair, DNA metabolism and replication stress as anti-cancer strategies. *FEBS J*, **283**(2): 232-245.
- Pylayeva, Y., Gillen, K. M., Gerald, W., Beggs, H. E., Reichardt, L. F., Giancotti, F. G. (2009). Ras- and PI3K-dependent breast tumorigenesis in mice and humans requires focal adhesion kinase signaling. *J Clin Invest*, **119**(2): 252-266.
- Rabbani, A., Finn, R. M., Ausio, J. (2005). The anthracycline antibiotics: antitumor drugs that alter chromatin structure. *Bioessays*, **27**(1): 50-56.
- Rajendran, P., Ho, E., Williams, D. E., Dashwood, R. H. (2011). Dietary phytochemicals, HDAC inhibition, and DNA damage/repair defects in cancer cells. *Clin Epigenetics*, **3**(1): 4.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, **26**(9-10): 1231-1237.
- Rebillard, A., Lagadic-Gossmann, D., Dimanche-Boitrel, M. T. (2008). Cisplatin cytotoxicity: DNA and plasma membrane targets. *Curr Med Chem*, **15**(26): 2656-2663.
- Redondo-Blanco, S., Fernandez, J., Gutierrez-Del-Rio, I., Villar, C. J., Lombo, F. (2017). New Insights toward Colorectal Cancer Chemotherapy Using Natural Bioactive Compounds. *Front Pharmacol*, **8**: 109.
- Reed, E. (1998). Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev*, **24**(5): 331-344.
- Reeves, R., Adair, J. E. (2005). Role of high mobility group (HMG) chromatin proteins in DNA repair. *DNA Repair (Amst)*, **4**(8): 926-938.

- Reichert, S., Reinboldt, V., Hehlhans, S., Efferth, T., Rodel, C., Rodel, F. (2012). A radiosensitizing effect of artesunate in glioblastoma cells is associated with a diminished expression of the inhibitor of apoptosis protein survivin. *Radiother Oncol*, **103**(3): 394-401.
- Ren, Y., de Blanco, E. J. C., Fuchs, J. R., Soejarto, D. D., Burdette, J. E., Swanson, S. M., Kinghorn, A. D. (2019). Potential Anticancer Agents Characterized from Selected Tropical Plants. *J Nat Prod*, **82**(3): 657-679.
- Retz, M. G., Jürgen E. (2009). *Medikamentöse Tumorthherapie in der Uroonkologie*, Springer.17-23
- Rice, J. A., Crothers, D. M., Pinto, A. L., Lippard, S. J. (1988). The major adduct of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA bends the duplex by approximately equal to 40 degrees toward the major groove. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**(12): 4158-4161.
- Rich, T., Allen, R. L., Wyllie, A. H. (2000). Defying death after DNA damage. *Nature*, **407**(6805): 777-783.
- Rivankar, S. (2014). An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J Cancer Res Ther*, **10**(4): 853-858.
- Robert-Koch-Institut (2019). e.V., und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland. *Krebs in Deutschland für 2015/2016*
- Robertson, A. B., Klungland, A., Rognes, T., Leiros, I. (2009). DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci*, **66**(6): 981-993.
- Rodríguez, J., Quiñoá, E., Riguera, R., Peters, B. M., Abrell, L. M., Crews, P. (1992). The structures and stereochemistry of cytotoxic sesquiterpene quinones from *dactylosporgia elegans*. *Tetrahedron*, **48**(32): 6667-6680.
- Roos, W. P., Kaina, B. (2013). DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett*, **332**(2): 237-248.
- Roos, W. P., Thomas, A. D., Kaina, B. (2016). DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat Rev Cancer*, **16**(1): 20-33.
- Rose, K. M. (1988). DNA topoisomerases as targets for chemotherapy. *FASEB J*, **2**(9): 2474-2478.
- Rosenberg, B., Renshaw, E., Vancamp, L., Hartwick, J., Drobnik, J. (1967). Platinum-induced filamentous growth in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **93**(2): 716-721.
- Rosenberg, B., Van Camp, L., Grimley, E. B., Thomson, A. J. (1967). The inhibition of growth or cell division in *Escherichia coli* by different ionic species of platinum(IV) complexes. *J Biol Chem*, **242**(6): 1347-1352.
- Rosenberg, B., Vancamp, L., Krigas, T. (1965). Inhibition of Cell Division in *Escherichia Coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature*, **205**: 698-699.

- Safra, T., Muggia, F., Jeffers, S., Tsao-Wei, D. D., Groshen, S., Lyass, O., Henderson, R., Berry, G., Gabizon, A. (2000). Pegylated liposomal doxorubicin (doxil): reduced clinical cardiotoxicity in patients reaching or exceeding cumulative doses of 500 mg/m². *Ann Oncol*, **11**(8): 1029-1033.
- Sakahira, H., Enari, M., Nagata, S. (2015). Corrigendum: Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, **526**(7575): 728.
- Sarker, A. H., Tsutakawa, S. E., Kostek, S., Ng, C., Shin, D. S., Peris, M., Campeau, E., Tainer, J. A., Nogales, E., Cooper, P. K. (2005). Recognition of RNA polymerase II and transcription bubbles by XPG, CSB, and TFIIH: insights for transcription-coupled repair and Cockayne Syndrome. *Mol Cell*, **20**(2): 187-198.
- Sasco, A. J., Secretan, M. B., Straif, K. (2004). Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer*, **45 Suppl 2**: S3-9.
- Sato, K., Aytac, U., Yamochi, T., Yamochi, T., Ohnuma, K., McKee, K. S., Morimoto, C., Dang, N. H. (2003). CD26/dipeptidyl peptidase IV enhances expression of topoisomerase II alpha and sensitivity to apoptosis induced by topoisomerase II inhibitors. *Br J Cancer*, **89**(7): 1366-1374.
- Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D. A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S., Ashkenazi, M., Pecker, I., Frydman, M., Harnik, R., Patanjali, S. R., Simmons, A., Clines, G. A., Sartiel, A., Gatti, R. A., Chessa, L., Sanal, O., Lavin, M. F., Jaspers, N. G., Taylor, A. M., Arlett, C. F., Miki, T., Weissman, S. M., Lovett, M., Collins, F. S., Shiloh, Y. (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*, **268**(5218): 1749-1753.
- Scheeff, E. D., Briggs, J. M., Howell, S. B. (1999). Molecular modeling of the intrastrand guanine-guanine DNA adducts produced by cisplatin and oxaliplatin. *Mol Pharmacol*, **56**(3): 633-643.
- Schlütermann, D., Skowron, M. A., Berleth, N., Bohler, P., Deitersen, J., Stuhldreier, F., Wallot-Hieke, N., Wu, W., Peter, C., Hoffmann, M. J., Niegisch, G., Stork, B. (2018). Targeting urothelial carcinoma cells by combining cisplatin with a specific inhibitor of the autophagy-inducing class III PtdIns3K complex. *Urol Oncol*, **36**(4): 160 e161-160 e113.
- Schmid, T. E., Zlobinskaya, O., Multhoff, G. (2012). Differences in Phosphorylated Histone H2AX Foci Formation and Removal of Cells Exposed to Low and High Linear Energy Transfer Radiation. *Curr Genomics*, **13**(6): 418-425.
- Schütte, J., Barth, J. (2010). Zytostatische Chemotherapie. In: Hiddemann W., Bartram C. (eds) Die Onkologie. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Scripture, C. D., Figg, W. D. (2006). Drug interactions in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **6**(7): 546-558.
- Seca, A. M. L., Pinto, D. (2018). Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application. *Int J Mol Sci*, **19**(1).

- Sedgwick, B. (2004). Repairing DNA-methylation damage. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**(2): 148-157.
- Seglen, P. O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*, **13**: 29-83.
- Semba, S., Moriya, T., Kimura, W., Yamakawa, M. (2003). Phosphorylated Akt/PKB controls cell growth and apoptosis in intraductal papillary-mucinous tumor and invasive ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Pancreas*, **26**(3): 250-257.
- Shen, Y. C., Lin, T. T., Sheu, J. H., Duh, C. Y. (1999). Structures and cytotoxicity relationship of isoaptamine and aptamine derivatives. *J Nat Prod*, **62**(9): 1264-1267.
- Shen, Z. (2011). Genomic instability and cancer: an introduction. *Journal of Molecular Cell Biology*, **3**(1): 1-3.
- Shi, J., Abdelwahid, E., Wei, L. (2011). Apoptosis in Anthracycline Cardiomyopathy. *Curr Pediatr Rev*, **7**(4): 329-336.
- Shiloh, Y. (2001). ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev*, **11**(1): 71-77.
- Shimizu, M., Nakamura, M., Kataoka, T., Iwaguchi, T. (1983). Mechanism of the antitumor activity of 5,5'-bis(2'-tetrahydropyranyl) secalonic acid D against Meth-A. *Cancer Chemother Pharmacol*, **11**(3): 144-146.
- Shrivastav, M., De Haro, L. P., Nickoloff, J. A. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res*, **18**(1): 134-147.
- Shrivastav, N., Li, D., Essigmann, J. M. (2010). Chemical biology of mutagenesis and DNA repair: cellular responses to DNA alkylation. *Carcinogenesis*, **31**(1): 59-70.
- Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, **22**(47): 7265-7279.
- Singal, P. K., Li, T., Kumar, D., Danelisen, I., Iliskovic, N. (2000). Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. *Mol Cell Biochem*, **207**(1-2): 77-86.
- Singh, C. K., George, J., Ahmad, N. (2013). Resveratrol-based combinatorial strategies for cancer management. *Ann N Y Acad Sci*, **1290**: 113-121.
- Smith, G. C., Jackson, S. P. (1999). The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev*, **13**(8): 916-934.
- Smith, J., Tho, L. M., Xu, N., Gillespie, D. A. (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res*, **108**: 73-112.
- Soares, D. G., Escargueil, A. E., Poindessous, V., Sarasin, A., de Gramont, A., Bonatto, D., Henriques, J. A., Larsen, A. K. (2007). Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(32): 13062-13067.

- Song, B., Sung, P. (2000). Functional interactions among yeast Rad51 recombinase, Rad52 mediator, and replication protein A in DNA strand exchange. *J Biol Chem*, **275**(21): 15895-15904.
- Sonoda, E., Takata, M., Yamashita, Y. M., Morrison, C., Takeda, S. (2001). Homologous DNA recombination in vertebrate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(15): 8388-8394.
- Sorensen, C. S., Syljuasen, R. G., Falck, J., Schroeder, T., Ronnstrand, L., Khanna, K. K., Zhou, B. B., Bartek, J., Lukas, J. (2003). Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell*, **3**(3): 247-258.
- Soto Parra, H., Cavina, R., Latteri, F., Sala, A., Dambrosio, M., Antonelli, G., Morengi, E., Alloisio, M., Ravasi, G., Santoro, A. (2002). Three-week versus four-week schedule of cisplatin and gemcitabine: results of a randomized phase II study. *Ann Oncol*, **13**(7): 1080-1086.
- Speth, P. A., van Hoesel, Q. G., Haanen, C. (1988). Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. *Clin Pharmacokinet*, **15**(1): 15-31.
- Stahl, P., Kissau, L., Mazitschek, R., Huwe, A., Furet, P., Giannis, A., Waldmann, H. (2001). Total synthesis and biological evaluation of the nakijiquinones. *J Am Chem Soc*, **123**(47): 11586-11593.
- Stasiak, A. Z., Larquet, E., Stasiak, A., Muller, S., Engel, A., Van Dyck, E., West, S. C., Egelman, E. H. (2000). The human Rad52 protein exists as a heptameric ring. *Curr Biol*, **10**(6): 337-340.
- Statistisches Bundesamt Wiesbaden, Todesursachen in Deutschland (www.destatis.de).
- Strube, M., Haenen, G. R., Van Den Berg, H., Bast, A. (1997). Pitfalls in a method for assessment of total antioxidant capacity. *Free Radic Res*, **26**(6): 515-521.
- Stucki, M., Pascucci, B., Parlanti, E., Fortini, P., Wilson, S. H., Hubscher, U., Dogliotti, E. (1998). Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. *Oncogene*, **17**(7): 835-843.
- Student (1908). The Probable Error of a Mean. *Biometrika*, **6**(1): 1-25.
- Stuhldreier, F., Kassel, S., Schumacher, L., Wesselborg, S., Proksch, P., Fritz, G. (2015). Pleiotropic effects of spongean alkaloids on mechanisms of cell death, cell cycle progression and DNA damage response (DDR) of acute myeloid leukemia (AML) cells. *Cancer Lett*, **361**(1): 39-48.
- Szumiel, I. (2006). Epidermal growth factor receptor and DNA double strand break repair: the cell's self-defence. *Cell Signal*, **18**(10): 1537-1548.
- Takahara, P. M., Rosenzweig, A. C., Frederick, C. A., Lippard, S. J. (1995). Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Nature*, **377**(6550): 649-652.

- Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A., Takeda, S. (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J*, **17**(18): 5497-5508.
- Takeda, A., Osaki, M., Adachi, K., Honjo, S., Ito, H. (2004). Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase-Akt signal pathway in the proliferation of human pancreatic ductal carcinoma cell lines. *Pancreas*, **28**(3): 353-358.
- Tang, K. J., Constanzo, J. D., Venkateswaran, N., Melegari, M., Ilcheva, M., Morales, J. C., Skoulidis, F., Heymach, J. V., Boothman, D. A., Scaglioni, P. P. (2016). Focal Adhesion Kinase Regulates the DNA Damage Response and Its Inhibition Radiosensitizes Mutant KRAS Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, **22**(23): 5851-5863.
- Tavora, B., Reynolds, L. E., Batista, S., Demircioglu, F., Fernandez, I., Lechertier, T., Lees, D. M., Wong, P. P., Alexopoulou, A., Elia, G., Clear, A., Ledoux, A., Hunter, J., Perkins, N., Gribben, J. G., HodiVala-Dilke, K. M. (2014). Endothelial-cell FAK targeting sensitizes tumours to DNA-damaging therapy. *Nature*, **514**(7520): 112-116.
- Teo, S. H., Jackson, S. P. (2000). Lif1p targets the DNA ligase Lig4p to sites of DNA double-strand breaks. *Curr Biol*, **10**(3): 165-168.
- Thune, I., Furberg, A. S. (2001). Physical activity and cancer risk: dose-response and cancer, all sites and site-specific. *Med Sci Sports Exerc*, **33**(6 Suppl): S530-550; discussion S609-510.
- Ting, N. S., Lee, W. H. (2004). The DNA double-strand break response pathway: becoming more BRCAish than ever. *DNA Repair (Amst)*, **3**(8-9): 935-944.
- Titov, D. V., Gilman, B., He, Q. L., Bhat, S., Low, W. K., Dang, Y., Smeaton, M., Demain, A. L., Miller, P. S., Kugel, J. F., Goodrich, J. A., Liu, J. O. (2011). XPB, a subunit of TFIIH, is a target of the natural product triptolide. *Nat Chem Biol*, **7**(3): 182-188.
- Toonen, T. R., Hande, K. R. (2001). Topoisomerase II inhibitors. *Cancer Chemother Biol Response Modif*, **19**: 129-147.
- Toulany, M., Kasten-Pisula, U., Brammer, I., Wang, S., Chen, J., Dittmann, K., Baumann, M., Dikomey, E., Rodemann, H. P. (2006). Blockage of epidermal growth factor receptor-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling increases radiosensitivity of K-RAS mutated human tumor cells in vitro by affecting DNA repair. *Clin Cancer Res*, **12**(13): 4119-4126.
- Trujillo, K. M., Yuan, S. S., Lee, E. Y., Sung, P. (1998). Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. *J Biol Chem*, **273**(34): 21447-21450.
- Tsukamoto, S., Yamanokuchi, R., Yoshitomi, M., Sato, K., Ikeda, T., Rotinsulu, H., Mangindaan, R. E., de Voogd, N. J., van Soest, R. W., Yokosawa, H. (2010). Aaptamine, an alkaloid from the sponge *Aaptos suberitoides*, functions as a proteasome inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett*, **20**(11): 3341-3343.

- Valdiglesias, V., Giunta, S., Fenech, M., Neri, M., Bonassi, S. (2013). gammaH2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutat Res*, **753**(1): 24-40.
- van Attikum, H., Gasser, S. M. (2005). The histone code at DNA breaks: a guide to repair? *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**(10): 757-765.
- Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, **408**(6810): 307-310.
- Wang, B., Hou, D., Liu, Q., Wu, T., Guo, H., Zhang, X., Zou, Y., Liu, Z., Liu, J., Wei, J., Gong, Y., Shao, C. (2015). Artesunate sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin by downregulating RAD51. *Cancer Biol Ther*, **16**(10): 1548-1556.
- Wang, D., Hara, R., Singh, G., Sancar, A., Lippard, S. J. (2003). Nucleotide excision repair from site-specifically platinum-modified nucleosomes. *Biochemistry*, **42**(22): 6747-6753.
- Wang, D., Lippard, S. J. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*, **4**(4): 307-320.
- Wang, G., Wang, X., Xu, X. (2015). Triptolide potentiates lung cancer cells to cisplatin-induced apoptosis by selectively inhibiting the NER activity. *Biomark Res*, **3**: 17.
- Wang, Y., Wang, F., Wen, S., Guo, Y., Liu, X., Zhang, X., Pan, L. (2015). Artesunate-enhanced apoptosis of human high-risk myelodysplastic cells induced by the DNA methyltransferase inhibitor decitabine. *Oncol Lett*, **9**(6): 2449-2454.
- Wassermann, K., Markovits, J., Jaxel, C., Capranico, G., Kohn, K. W., Pommier, Y. (1990). Effects of morpholinyl doxorubicins, doxorubicin, and actinomycin D on mammalian DNA topoisomerases I and II. *Mol Pharmacol*, **38**(1): 38-45.
- Wätjen, W., Debbab, A., Hohlfeld, A., Chovolou, Y., Kampkotter, A., Edrada, R. A., Ebel, R., Hakiki, A., Mosaddak, M., Totzke, F., Kubbutat, M. H., Proksch, P. (2009). Enniatins A1, B and B1 from an endophytic strain of *Fusarium tricinctum* induce apoptotic cell death in H4IIE hepatoma cells accompanied by inhibition of ERK phosphorylation. *Molecular nutrition & food research*, **53**(4): 431-440.
- Wätjen, W., Debbab, A., Hohlfeld, A., Chovolou, Y., Proksch, P. (2014). The mycotoxin beauvericin induces apoptotic cell death in H4IIE hepatoma cells accompanied by an inhibition of NF-kappaB-activity and modulation of MAP-kinases. *Toxicol Lett*, **231**(1): 9-16.
- Weber, A. M., Ryan, A. J. (2015). ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Ther*, **149**: 124-138.
- Weiner, T. M., Liu, E. T., Craven, R. J., Cance, W. G. (1993). Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer. *Lancet*, **342**(8878): 1024-1025.
- Weterings, E., Verkaik, N. S., Bruggenwirth, H. T., Hoeijmakers, J. H., van Gent, D. C. (2003). The role of DNA dependent protein kinase in synapsis of DNA ends. *Nucleic Acids Res*, **31**(24): 7238-7246.

- Wheate, N. J., Walker, S., Craig, G. E., Oun, R. (2010). The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans*, **39**(35): 8113-8127.
- Willems, P., Claes, K., Baeyens, A., Vandersickel, V., Werbrouck, J., De Ruyck, K., Poppe, B., Van den Broecke, R., Makar, A., Marras, E., Perletti, G., Thierens, H., Vral, A. (2008). Polymorphisms in nonhomologous end-joining genes associated with breast cancer risk and chromosomal radiosensitivity. *Genes Chromosomes Cancer*, **47**(2): 137-148.
- Wilson, D. M., 3rd, Barsky, D. (2001). The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutat Res*, **485**(4): 283-307.
- Woerdenbag, H. J., Moskal, T. A., Pras, N., Malingre, T. M., el-Feraly, F. S., Kampinga, H. H., Konings, A. W. (1993). Cytotoxicity of artemisinin-related endoperoxides to Ehrlich ascites tumor cells. *J Nat Prod*, **56**(6): 849-856.
- Wong, E., Giandomenico, C. M. (1999). Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chem Rev*, **99**(9): 2451-2466.
- Woods, D., Turchi, J. J. (2013). Chemotherapy induced DNA damage response: convergence of drugs and pathways. *Cancer Biol Ther*, **14**(5): 379-389.
- Wu, Z. M., Yuan, X. H., Jiang, P. C., Li, Z. Q., Wu, T. (2006). Antisense oligonucleotides targeting the focal adhesion kinase inhibit proliferation, induce apoptosis and cooperate with cytotoxic drugs in human glioma cells. *J Neurooncol*, **77**(2): 117-123.
- Xie, L., Li, M., Liu, D., Wang, X., Wang, P., Dai, H., Yang, W., Liu, W., Hu, X., Zhao, M. (2019). Secalonic Acid-F, a Novel Mycotoxin, Represses the Progression of Hepatocellular Carcinoma via MARCH1 Regulation of the PI3K/AKT/beta-catenin Signaling Pathway. *Molecules*, **24**(3).
- Xie, Z., Guo, Z., Lei, J., Yu, J. (2019). Scutellarin synergistically enhances cisplatin effect against ovarian cancer cells through enhancing the ability of cisplatin binding to DNA. *European Journal of Pharmacology*, **844**: 9-16.
- Yang, H., Jeffrey, P. D., Miller, J., Kinnucan, E., Sun, Y., Thoma, N. H., Zheng, N., Chen, P. L., Lee, W. H., Pavletich, N. P. (2002). BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science*, **297**(5588): 1837-1848.
- Yang, J., Yu, Y., Hamrick, H. E., Duerksen-Hughes, P. J. (2003). ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis*, **24**(10): 1571-1580.
- Yao, X., Panichpisal, K., Kurtzman, N., Nugent, K. (2007). Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci*, **334**(2): 115-124.
- Yonezawa, A., Inui, K. (2011). Organic cation transporter OCT/SLC22A and H(+)/organic cation antiporter MATE/SLC47A are key molecules for nephrotoxicity of platinum agents. *Biochem Pharmacol*, **81**(5): 563-568.

- Yu, H., Sperlich, J., Mandi, A., Kurtan, T., Dai, H., Teusch, N., Guo, Z. Y., Zou, K., Liu, Z., Proksch, P. (2018). Azaphilone Derivatives from the Fungus *Coniella fragariae* Inhibit NF-kappaB Activation and Reduce Tumor Cell Migration. *J Nat Prod*, **81**(11): 2493-2500.
- Zhang, D., Tang, B., Xie, X., Xiao, Y. F., Yang, S. M., Zhang, J. W. (2015). The interplay between DNA repair and autophagy in cancer therapy. *Cancer Biol Ther*, **16**(7): 1005-1013.
- Zhang, W., Krohn, K., Zia, U., Florke, U., Pescitelli, G., Di Bari, L., Antus, S., Kurtan, T., Rheinheimer, J., Draeger, S., Schulz, B. (2008). New mono- and dimeric members of the secalonic acid family: blennolides A-G isolated from the fungus *Blennoria* sp. *Chemistry*, **14**(16): 4913-4923.
- Zhang, Y., Hunter, T. (2014). Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy. *Int J Cancer*, **134**(5): 1013-1023.
- Ziegler, V., Henninger, C., Simiantonakis, I., Buchholzer, M., Ahmadian, M. R., Budach, W., Fritz, G. (2017). Rho inhibition by lovastatin affects apoptosis and DSB repair of primary human lung cells in vitro and lung tissue in vivo following fractionated irradiation. *Cell Death Dis*, **8**(8): e2978.
- Zimmermann, M., de Lange, T. (2014). 53BP1: pro choice in DNA repair. *Trends Cell Biol*, **24**(2): 108-117.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X., Wang, X. (1999). An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*, **274**(17): 11549-11556.
- Zou, L., Elledge, S. J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*, **300**(5625): 1542-1548.
- Zucchi, R., Danesi, R. (2003). Cardiac toxicity of antineoplastic anthracyclines. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, **3**(2): 151-171.

8 Anhang

8.1 Ergänzende Abbildungen und Tabellen

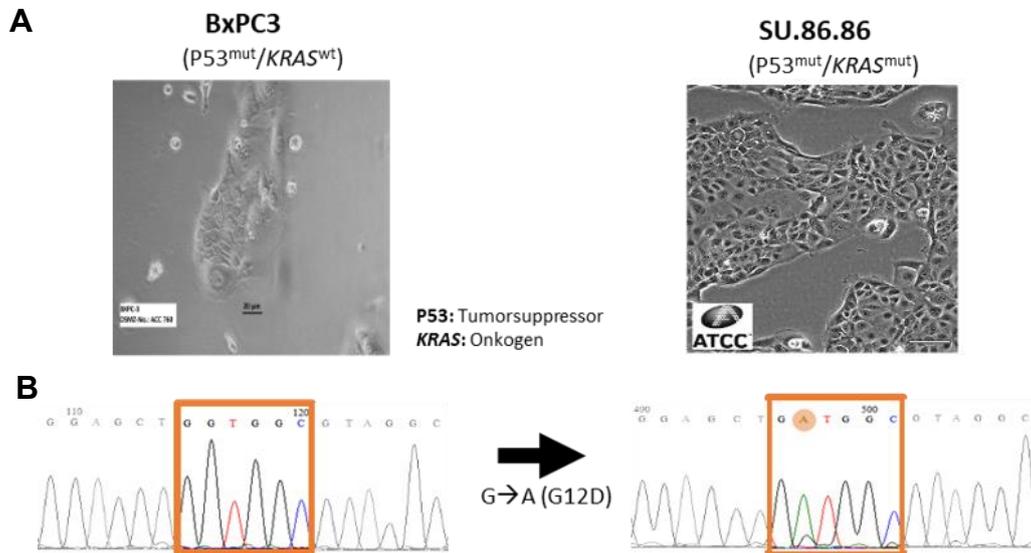


Abbildung 8.1: Sequenzierung des KRAS-Gens.

Zur Überprüfung des Onkogen-Status der beiden Pankreaskarzinomzelllinien (BxPC3 und SU.86.86) wurde die genomische DNA beider Zelllinien isoliert, der spezifische Bereich amplifiziert und zur Sanger-Sequenzierung an das BMFZ übergeben. A: Morphologische Darstellung der beiden Pankreaskarzinomzelllinien und Zusammenfassung der unterschiedlichen genetischen Eigenschaften. B: Ergebnis der Sanger-Sequenzierung.

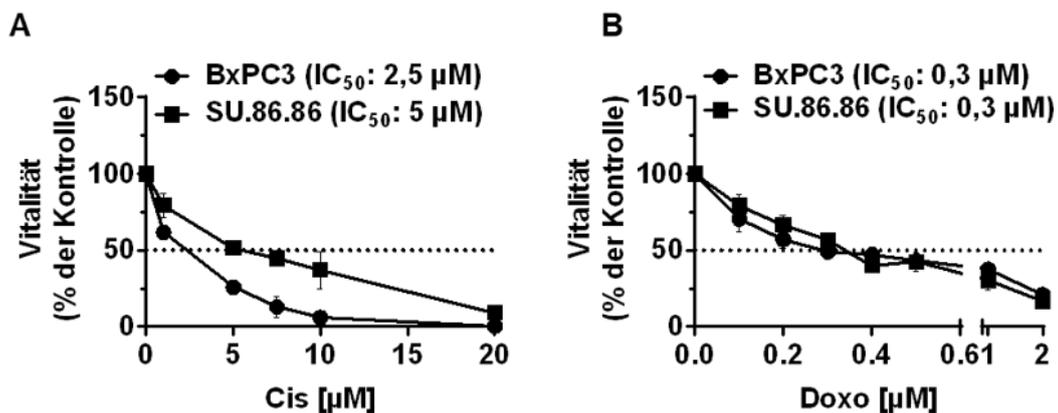


Abbildung 8.2: Effekte der ausgewählten Zytostatika auf die Zellvitalität von Pankreaskarzinomzellen.

Pankreaskarzinomzellen (BxPC3 und SU.86.86) wurden für die Bestimmung des jeweiligen IC₅₀-Wertes für 72 h mit Konzentrationen zwischen 1 µM und 20 µM Cisplatin (Cis) oder 0,1 und 2 µM Doxorubicin (Doxo) behandelt. Die Zugabe erfolgte 24 h nach Aussaat. Die metabolische Aktivität der Zellen, welche als Maß für die Vitalität dient, wurde mit dem Alamar Blue®-Assay bestimmt. In den Dosiswirkungskurven der beiden Zytostatika (Cis (A); Doxo (B)) sind Mittelwerte ± SEM in Prozent der unbehandelten Kontrolle (n = 3; N = 4) dargestellt.

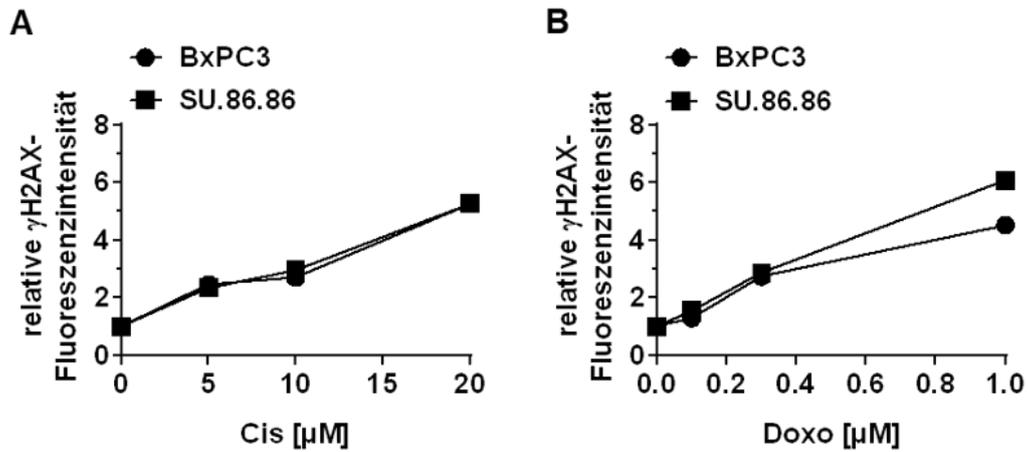


Abbildung 8.3: Gesamtfluoreszenzbasierte Analyse der Phosphorylierung von H2AX nach Zytostatika-Behandlung.

Um den Aktivitätsstatus der DNA-Schadensantwort (DDR) nach Zytostatikabehandlung zu ermitteln, wurden BxPC3- und SU.86.86-Zellen für 24 h mit Konzentrationen zwischen 5 und 20 μM Cisplatin (Cis) bzw. 0,1 bis 1 μM Doxorubicin (Doxo) behandelt. Anschließend wurde die Modulation der Phosphorylierung von γH2AX (*H2A histone family, member X* an Serin 139 phosphoryliert) über das Gesamtfluoreszenzsignal als Marker für DNA-Schäden detektiert. Eine halb-maximale Schadensantwort wurde durch 5 μM Cis bzw. 0,3 μM Doxo erreicht. Diese Konzentrationen ermöglichen eine Detektion der Modulation der DDR. Dargestellt ist der Mittelwert als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle (n = 1, N = 4).

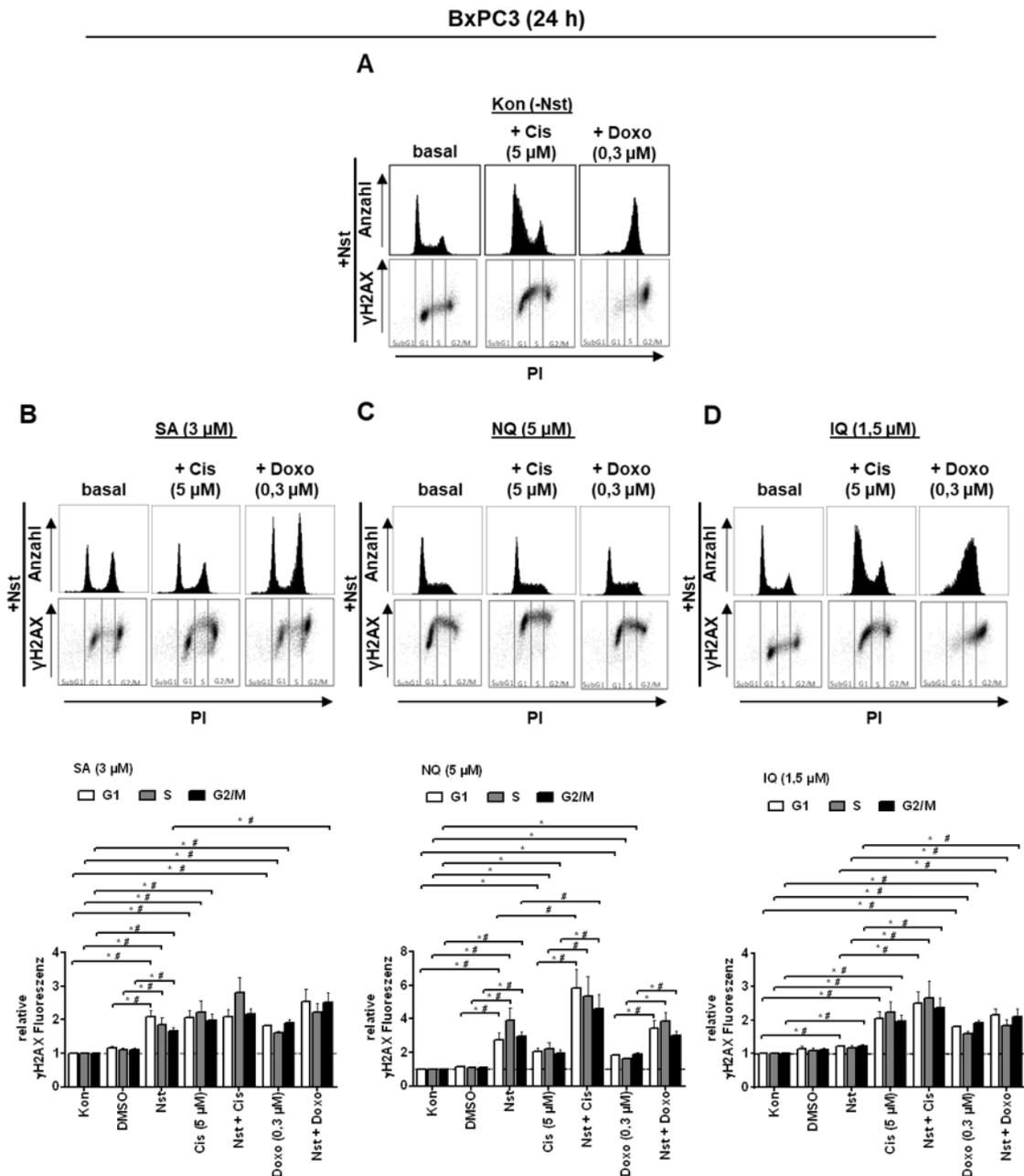


Abbildung 8.4: Analyse der Phosphorylierung von H2AX in den verschiedenen Zellzyklusphasen mittels Durchflusszytometrie in BxPC3-Zellen.

BxPC3-Zellen wurden für 24 h mit dem Naturstoff (Nst) allein (basal) oder in Kombination mit Cisplatin (Cis) oder Doxorubicin (Doxo) behandelt und anschließend die Phosphorylierung von H2AX als Folge eines DNA-Schadens in Abhängigkeit der Zellzyklusphasen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Gezeigt sind exemplarische Zellzyklusverteilungen, die Verteilung des γ H2AX (*H2A histone family, member X* an Serin 139 phosphoryliert) -Signals und die quantitative Auswertung dessen in Abhängigkeit der Zellzyklusphasen. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle der jeweiligen Phase (n = 3, N = 1). Student's *t*-Test *p ≤ 0,05; One-way ANOVA #p ≤ 0,05. DMSO: Dimethylsulfoxid; Q: 5-*epi*-Iliquinone, Kon: Kontrolle; NQ: 5-*epi*-Nakijiquinone Q; PI: Propidiumjodid; SA: Secalonic acid F

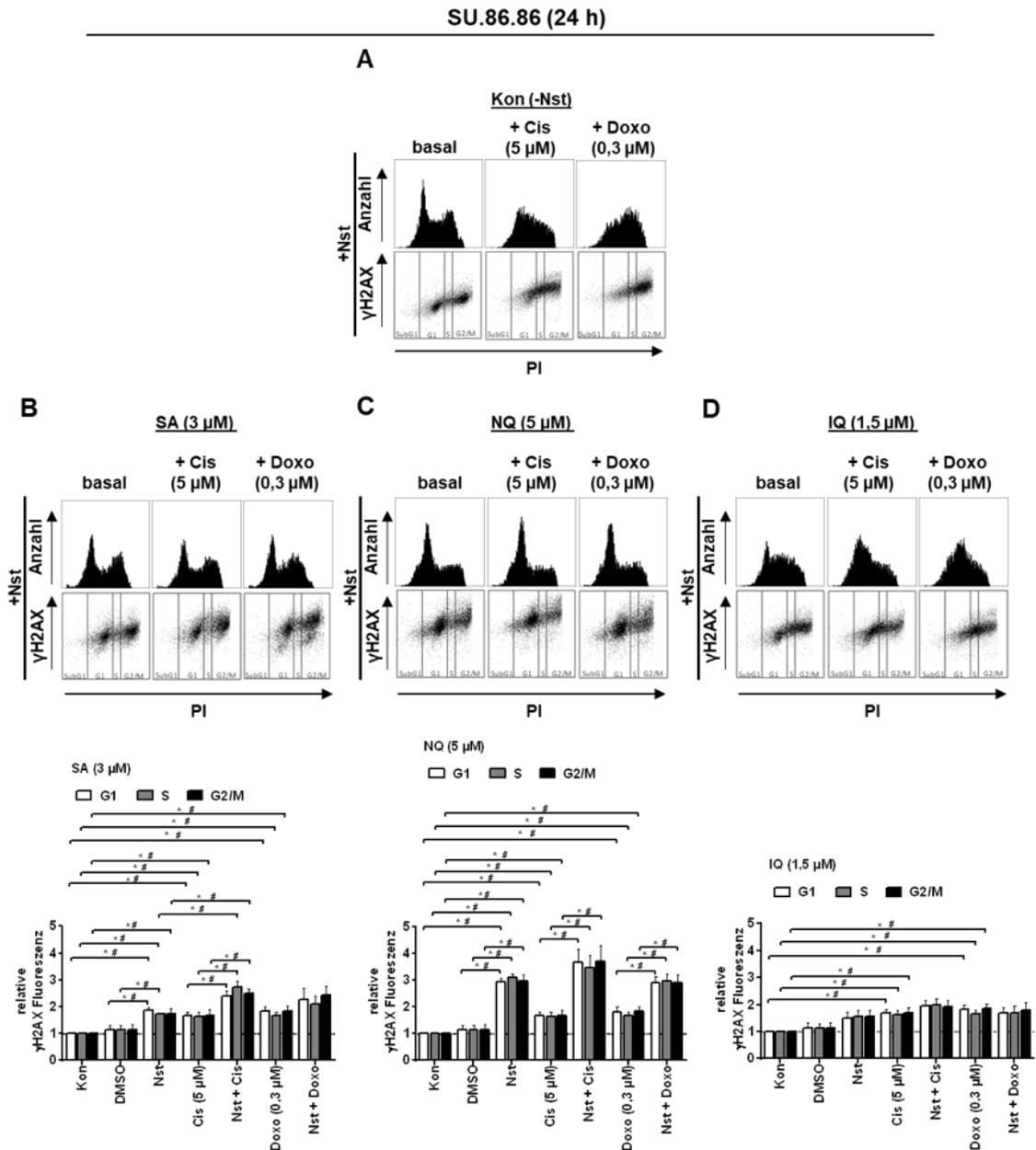


Abbildung 8.5: Analyse der Phosphorylierung von H2AX in den verschiedenen Zellzyklusphasen mittels Durchflusszytometrie in SU.86.86-Zellen.

SU.86.86-Zellen wurden für 24 h mit dem Naturstoff (Nst) allein (basal) oder in Kombination mit Cisplatin (Cis) oder Doxorubicin (Doxo) behandelt und anschließend die Phosphorylierung von H2AX als Folge eines DNA-Schadens in Abhängigkeit der Zellzyklusphasen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Gezeigt sind exemplarische Zellzyklusverteilungen, die Verteilung des γ H2AX (*H2A histone family, member X* an Serin 139 phosphoryliert) -Signals und die quantitative Auswertung dessen in Abhängigkeit der Zellzyklusphasen. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle der jeweiligen Phase ($n = 3$, $N = 1$). Student's *t*-Test * $p \leq 0,05$; One-way ANOVA # $p \leq 0,05$. DMSO: Dimethylsulfoxid; Q: *5-epi-Illimaquinone*, Kon: Kontrolle; NQ: *5-epi-Nakijiquinone* Q; PI: Propidiumjodid; SA: *Secalonic acid F*

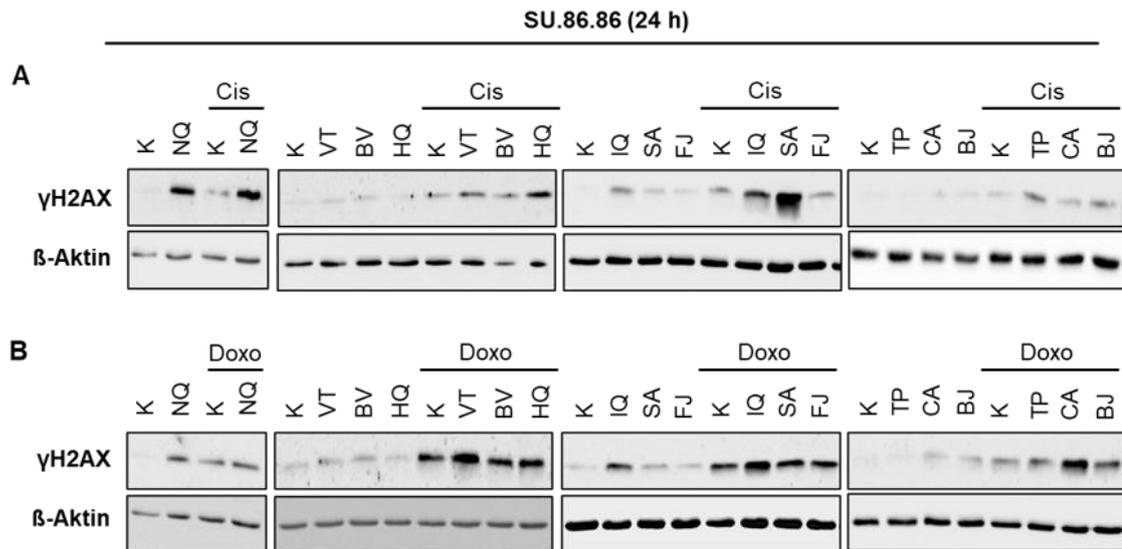


Abbildung 8.6: Einfluss des Naturstoffsets auf die Proteinmenge von γ H2AX.

Um den Aktivitätsstatus der DNA-Schadensantwort (DDR) zu ermitteln, wurden SU.86.86-Zellen für 24 h mit einer Konzentration im Bereich der IC_{50} der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 μ M Cisplatin (Cis) (A) oder 0,3 μ M Doxorubicin (Doxo) (B) behandelt. Anschließend wurde die Modulation der Phosphorylierung von γ H2AX (γ H2AX: *H2A histone family, member X* an Serin 139 phosphoryliert) über dessen Proteinmenge mittels Western Blot-Analysen als Marker für DNA-Schäden detektiert. Die Expression des Zytoskelettproteins β -Aktin dient als Ladekontrolle. BJ: *Beauvericin J*; BV: *Beauvericin*; CA: *Coniellin A*; FJ: *Fusarielin J*; HQ: *Hexaprenylhydroquinone*; IQ: *5-epi-Illimaquinone*; K: Kontrolle; NQ: *5-epi-Nakijiquinone*; Nst: Naturstoff; SA: *Secalonic acid F*; TP: *Tylophorinine*; VT: *Viriditoxin*.

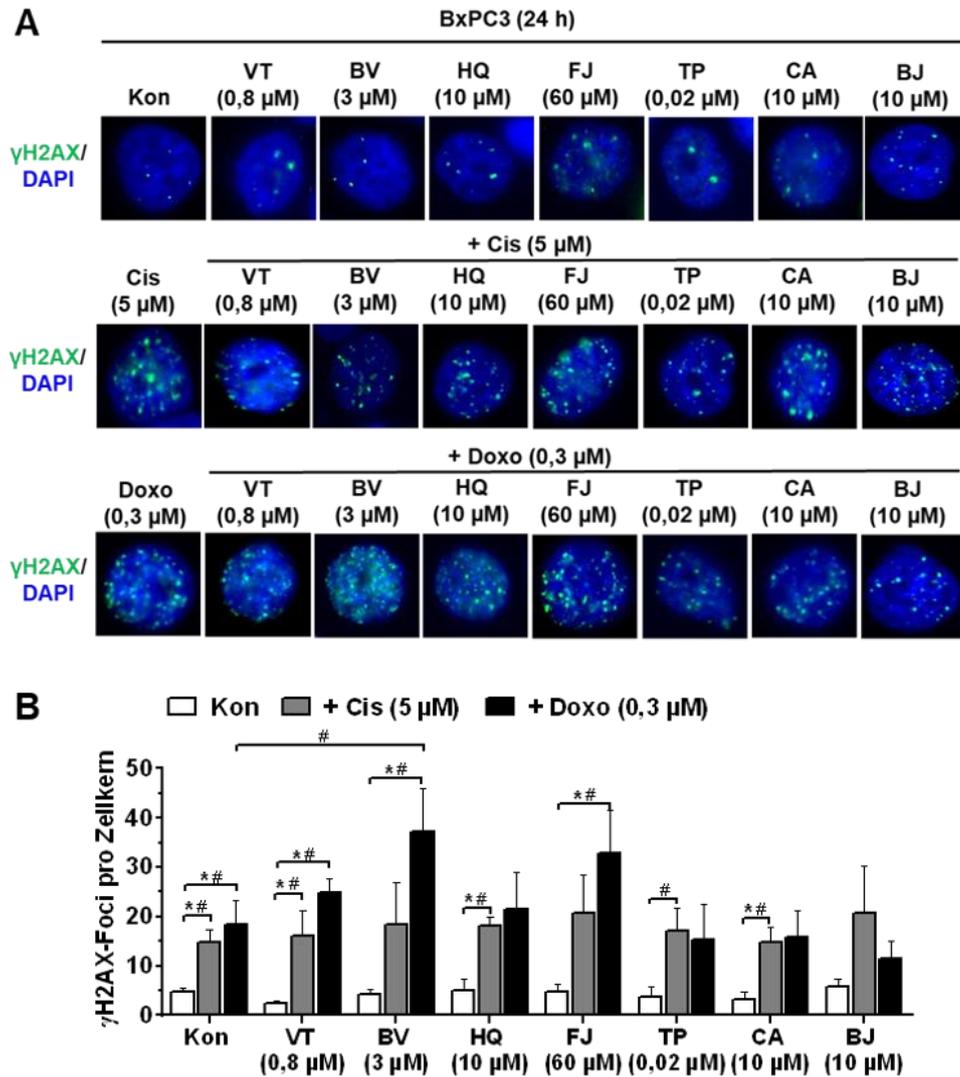


Abbildung 8.7: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf nukleäre γ H2AX-Foci in BxPC3-Zellen.

Um die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen zu bestimmen, wurde die Anzahl an S139 phosphorylierten H2AX nukleären Foci (γ H2AX-Foci) bestimmt. Dazu wurden BxPC3-Zellen für 24 h mit einer Konzentration im Bereich der IC₅₀ der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 μ M Cisplatin (Cis) oder 0,3 μ M Doxorubicin (Doxo) behandelt. A: Repräsentative Mikroskopbilder zeigen die Formation der γ H2AX-Foci nach der Mono- oder Kombinationsbehandlung. B: Quantitative Auswertung der Menge an γ H2AX-Foci pro Zelle. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM (n = 2-3, N = 50 Zellen). Student's *t*-Test **p* \leq 0,05; One-way ANOVA #*p* \leq 0,05. BJ: *Beauvericin J*; BV: *Beauvericin*; CA: *Coniellin A*; DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol; DMSO: Dimethylsulfoxid; FJ: *Fusarielin J*; HQ: *Hexaprenylhydroquinone*; IQ: *5-epi-Ilimaquinone*; K: Kontrolle; NQ: *5-epi-Nakijiquinone Q*; Nst: Naturstoff; SA: *Secalonic acid F*; TP: *Tylophorinine*; VT: *Viriditoxin*.

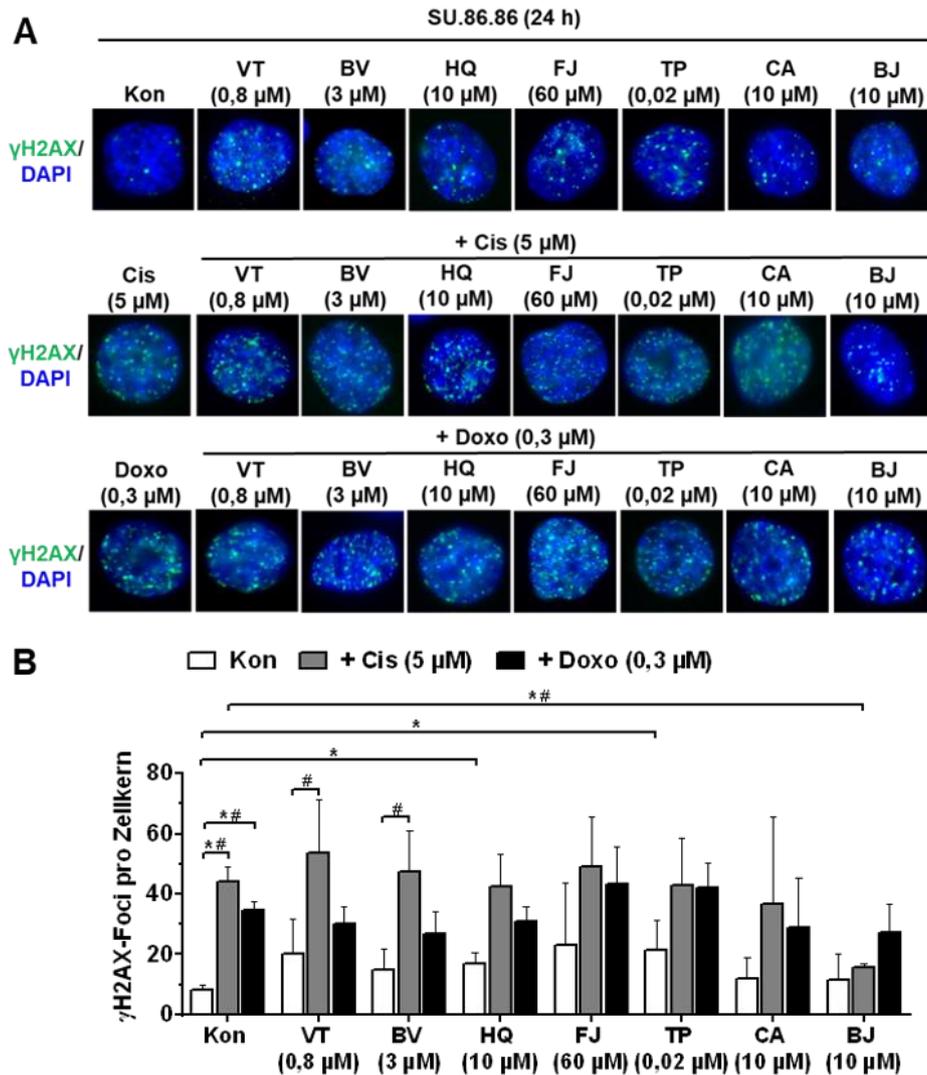


Abbildung 8.8: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf nukleäre γ H2AX-Foci in SU.86.86-Zellen.

Um die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) zu bestimmen, wurde die Anzahl an S139 phosphorylierten H2AX nukleären Foci (γ H2AX-Foci) bestimmt. Dazu wurden SU.86.86-Zellen für 24 h mit einer Konzentration im Bereich der IC_{50} der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 μ M Cisplatin (Cis) oder 0,3 μ M Doxorubicin (Doxo) behandelt. A: Repräsentative Mikroskopbilder zeigen die Formation der γ H2AX-Foci nach der Mono- oder Kombinationsbehandlung. B: Quantitative Auswertung der Menge an γ H2AX-Foci pro Zelle. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM (n = 2-3, N = 50 Zellen). Student's *t*-Test * $p \leq 0,05$; One-way ANOVA # $p \leq 0,05$. BJ: *Beauvericin J*; BV: *Beauvericin*; CA: *Coniellin A*; DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol; FJ: *Fusarielin J*; HQ: *Hexaprenylhydroquinone*; IQ: *5-epi-Ilimaquinone*; K: Kontrolle; NQ: *5-epi-Nakijiquinone Q*; Nst: Naturstoff; SA: *Secalonic acid F*; TP: *Tylophorinine*; VT: *Viriditoxin*.

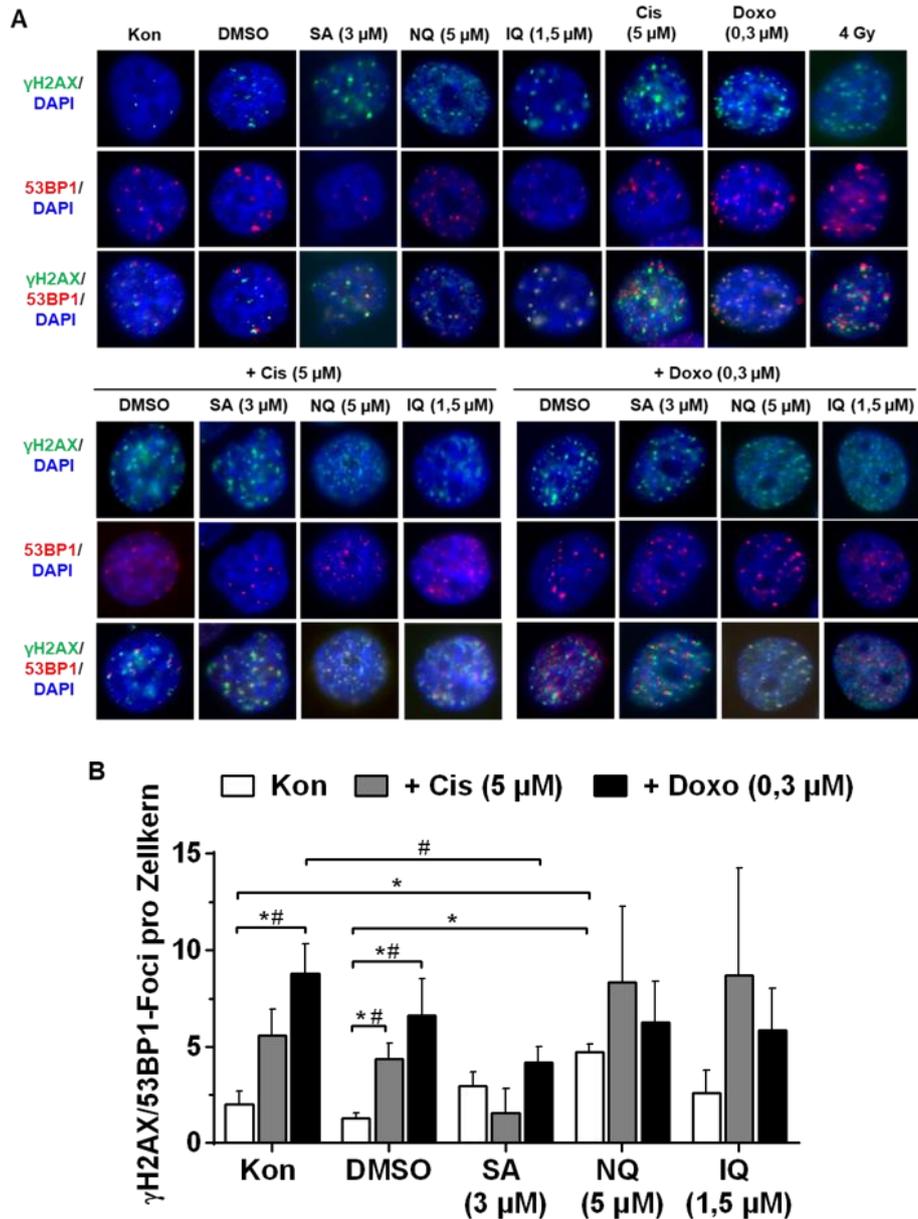


Abbildung 8.9: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf nukleäre γ H2AX-, 53BP1- und kolokalisierte γ H2AX/53BP1-Foci in BxPC3-Zellen.

Um die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen zu bestimmen, wurde die Anzahl nukleärer S139 phosphorylierten H2AX (γ H2AX)-, 53BP1 (P53-bindendes Protein 1)- und kolokalisierte γ H2AX/53BP1-Foci ermittelt. Dazu wurden BxPC3-Zellen für 24 h mit einer Konzentration im Bereich der IC_{50} der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 μ M Cisplatin (Cis) oder 0,3 μ M Doxorubicin (Doxo) behandelt. A: Repräsentative Mikroskopbilder zeigen die Formation der Foci, sowie deren Kolokalisation nach der Mono- oder Kombinationsbehandlung. B: Quantitative Auswertung kolokollierter γ H2AX/53BP1-Foci pro Zelle. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM ($n = 3$, $N \geq 50$ Zellen). Student's t -Test * $p \leq 0,05$; One-way ANOVA # $p \leq 0,05$. Cis: Cisplatin; DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol; DMSO: Dimethylsulfoxid; IQ: 5-*epi-Illimaquinone*; K: Kontrolle; NQ: 5-*epi-Nakijiquinone Q*; Nst: Naturstoff; SA: *Secalonic acid F*.

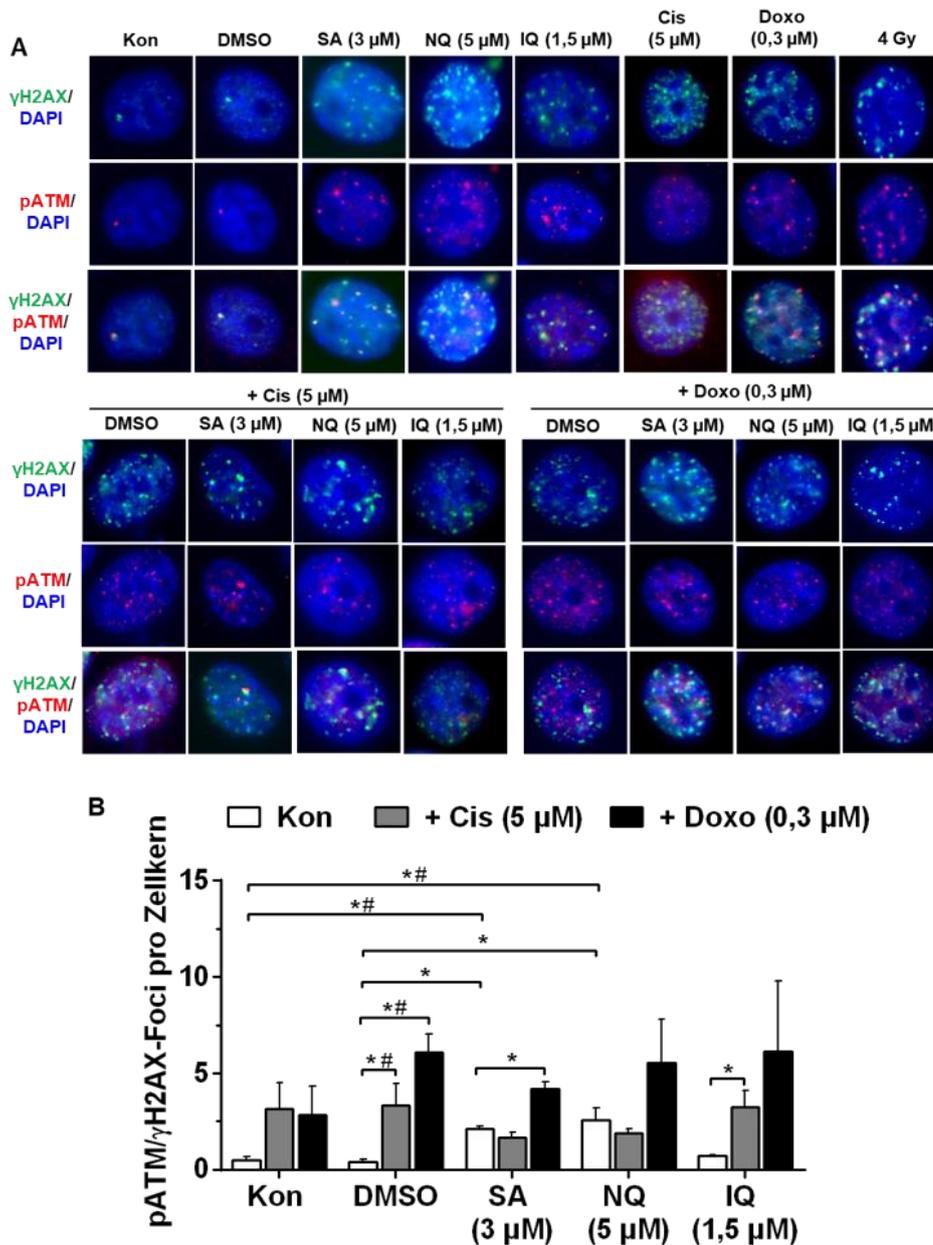


Abbildung 8.10: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf nukleäre γ H2AX-, pATM- und kolokalisierte γ H2AX/pATM-Foci in BxPC3-Zellen.

Um die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) zu bestimmen, wurde die Anzahl nukleärer S139 phosphorylierten H2AX (γ H2AX) -, pATM- und kolokalisierte γ H2AX/pATM-Foci ermittelt. Dazu wurden BxPC3-Zellen für 24 h mit einer Konzentration im Bereich der IC_{50} der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 μ M Cis oder 0,3 μ M Doxo behandelt. A: Repräsentative Mikroskopbilder zeigen die Formation der Foci, sowie deren Kolokalisation nach der Mono- oder Kombinationsbehandlung. B: Quantitative Auswertung kolokalisierte γ H2AX/pATM-Foci pro Zelle. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM (n = 3, N \geq 50 Zellen). Student's *t*-Test *p \leq 0,05; One-way ANOVA #p \leq 0,05. Cis: Cisplatin; DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol; Doxo: Doxorubicin; IQ: *5-epi-Illimaquinone* Q; K: Kontrolle; NQ: *5-epi-Nakijiquinone* Q; Nst: Naturstoff; p: phospho-; SA: *Secalonic acid* F; γ H2AX: *H2A histone family, member X* an Serin 139 phosphoryliert.

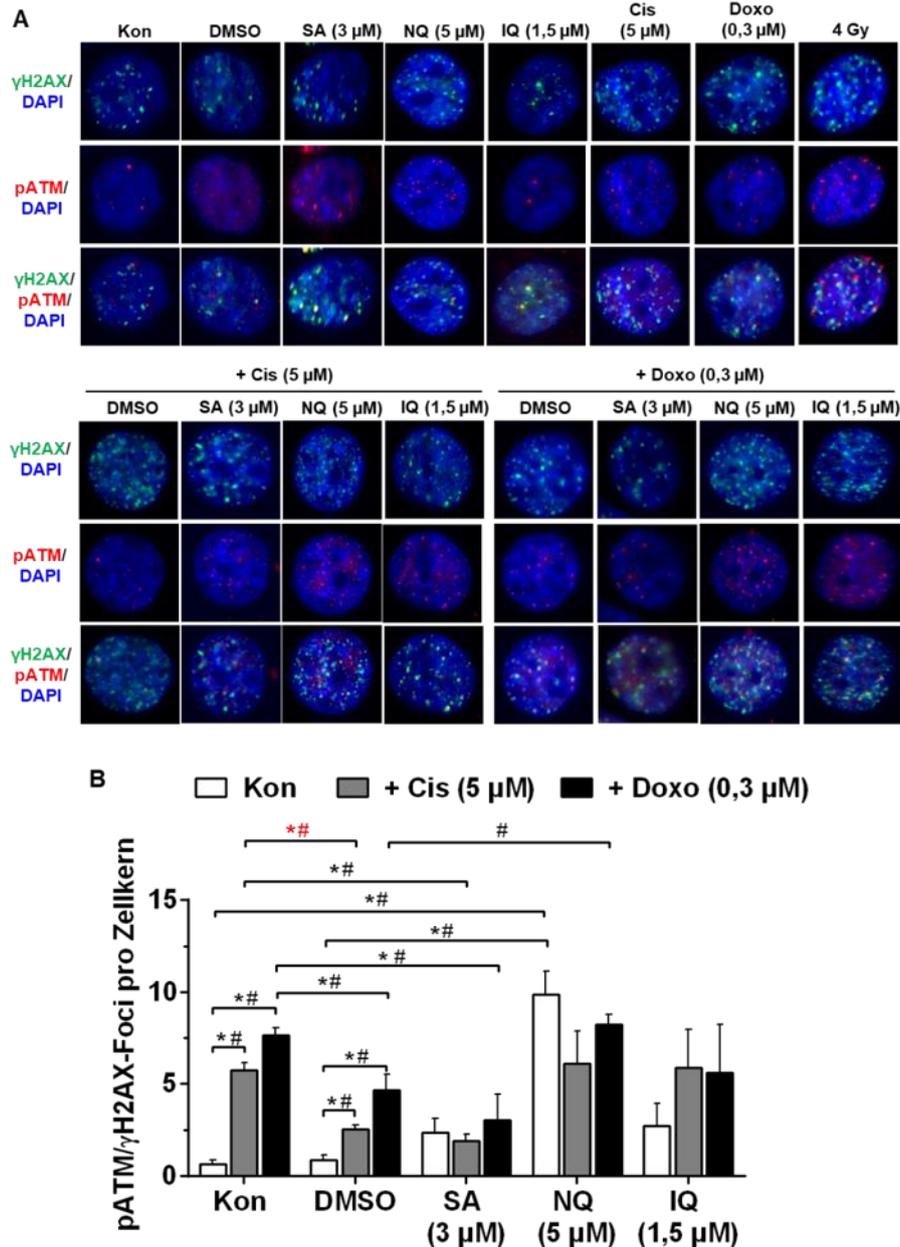


Abbildung 8.12: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf nukleäre γ H2AX-, pATM- und kolokalisierte γ H2AX/pATM-Foci in SU.86.86-Zellen.

Um die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) zu bestimmen, wurde die Anzahl nukleärer S139 phosphorylierten H2AX (γ H2AX)-, pATM- und kolokalisierte γ H2AX/pATM-Foci ermittelt. Dazu wurden SU.86.86-Zellen für 24 h mit einer Konzentration im Bereich der IC_{50} der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 μ M Cis oder 0,3 μ M Doxo behandelt. A: Repräsentative Mikroskopbilder zeigen die Formation der Foci, sowie deren Kolokalisation nach der Mono- oder Kombinationsbehandlung. B: Quantitative Auswertung kolokalisierten γ H2AX/pATM-Foci pro Zelle. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM ($n = 3$, $N \geq 50$ Zellen). Student's t -Test * $p \leq 0,05$; One-way ANOVA # $p \leq 0,05$. Cis: Cisplatin; DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol; Doxo: Doxorubicin; IQ: 5-*epi*-Iliquinone; K: Kontrolle; NQ: 5-*epi*-Nakijiquinone; Nst: Naturstoff; p: phospho-; SA: Secalonic acid F; γ H2AX: H2A histone family, member X an Serin 139 phosphoryliert.

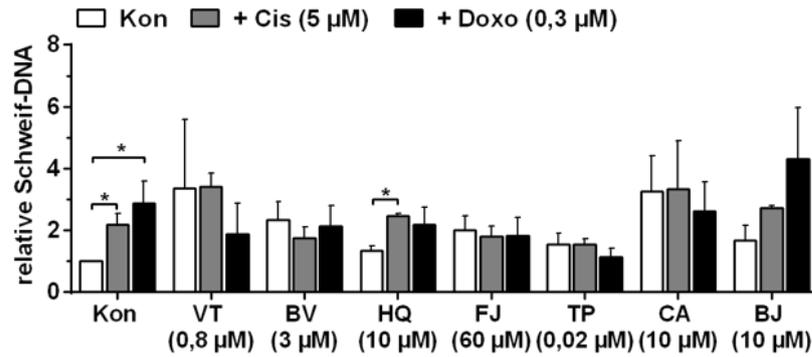
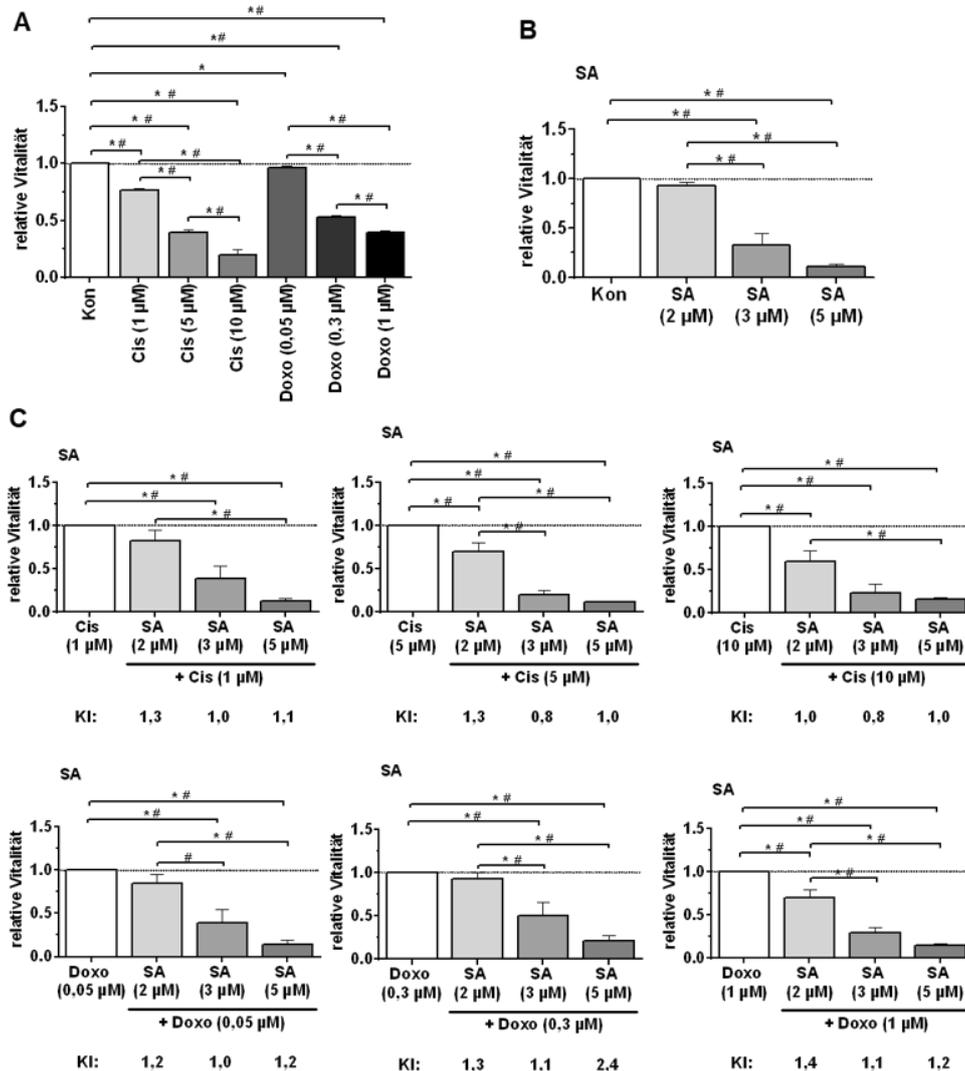


Abbildung 8.13: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf DNA-Strangbrüche.

Mit Hilfe es alkalischen Comet-Assays wurde die Menge an DNA-Einzelstrangbrüchen (SSBs) bestimmt. Dazu wurden SU.86.86-Zellen für 24 h mit einer Konzentration im Bereich der IC₅₀ der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 µM Cis oder 0,3 µM Doxo behandelt. Die Kometen wurden mittels Mikroskopie visualisiert und die Intensität der DNA im Schweif wurde quantifiziert. Quantitative Auswertung der Intensität der Schweif-DNA. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM (n = 2, N = 50 Zellen). Student's *t*-Test **p* ≤ 0,05; One-way ANOVA #*p* ≤ 0,05. BJ: *Beauvericin J*; BV: *Beauvericin*; CA: *Coniellin A*; Cis: Cisplatin; DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol; Doxo: Doxorubicin; FJ: *Fusarielin J*; HQ: *Hexaprenylhydroquinone*; IQ: *5-epi-Illimaquinone*; K: Kontrolle; NQ: *5-epi-Nakijiquinone* Q; Nst: Naturstoff; SA: *Secalonic acid F*; TP: *Tylophorinine*; VT: *Viriditoxin*; γH2AX: *H2A histone family, member X* an Serin 139 phosphoryliert.



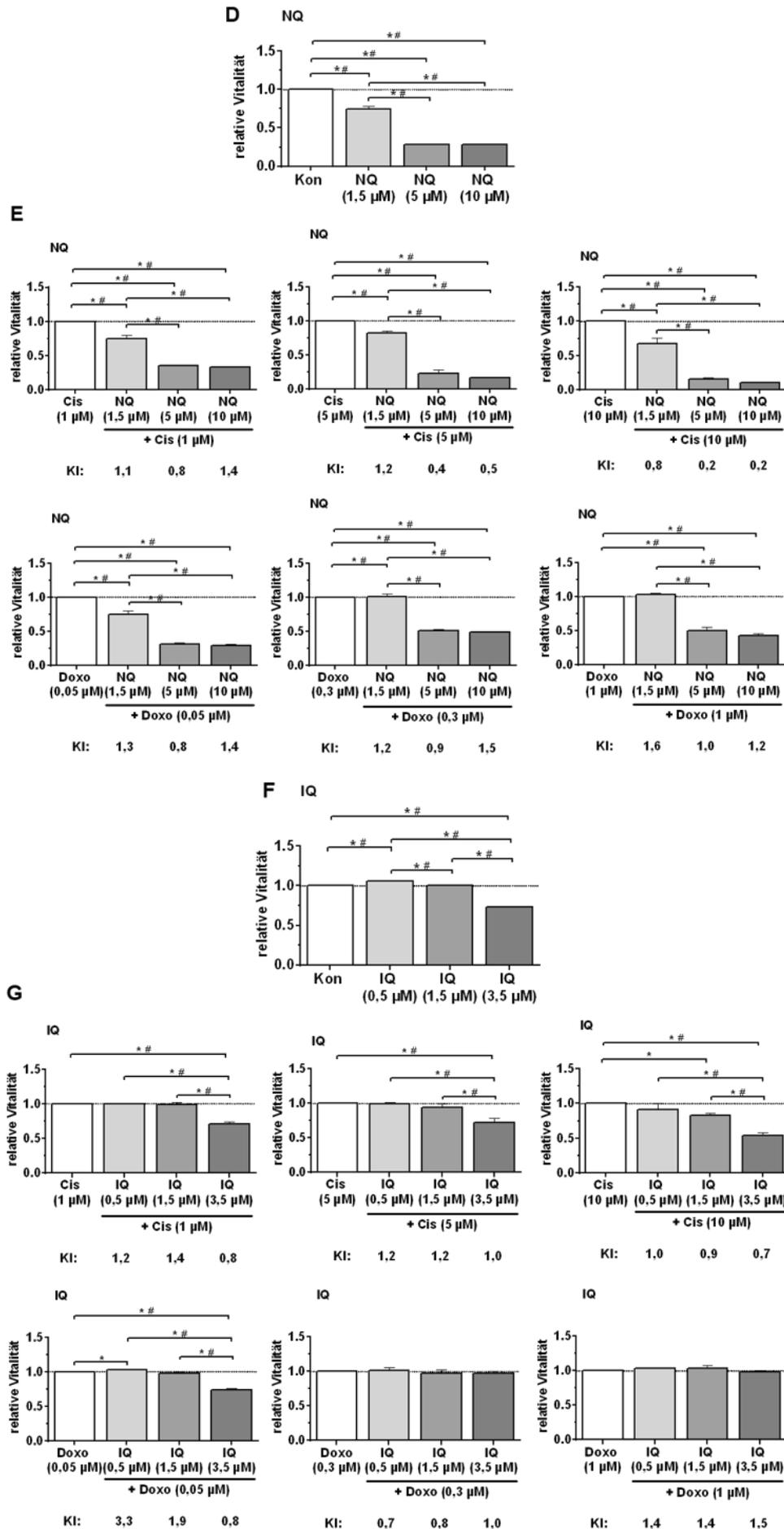
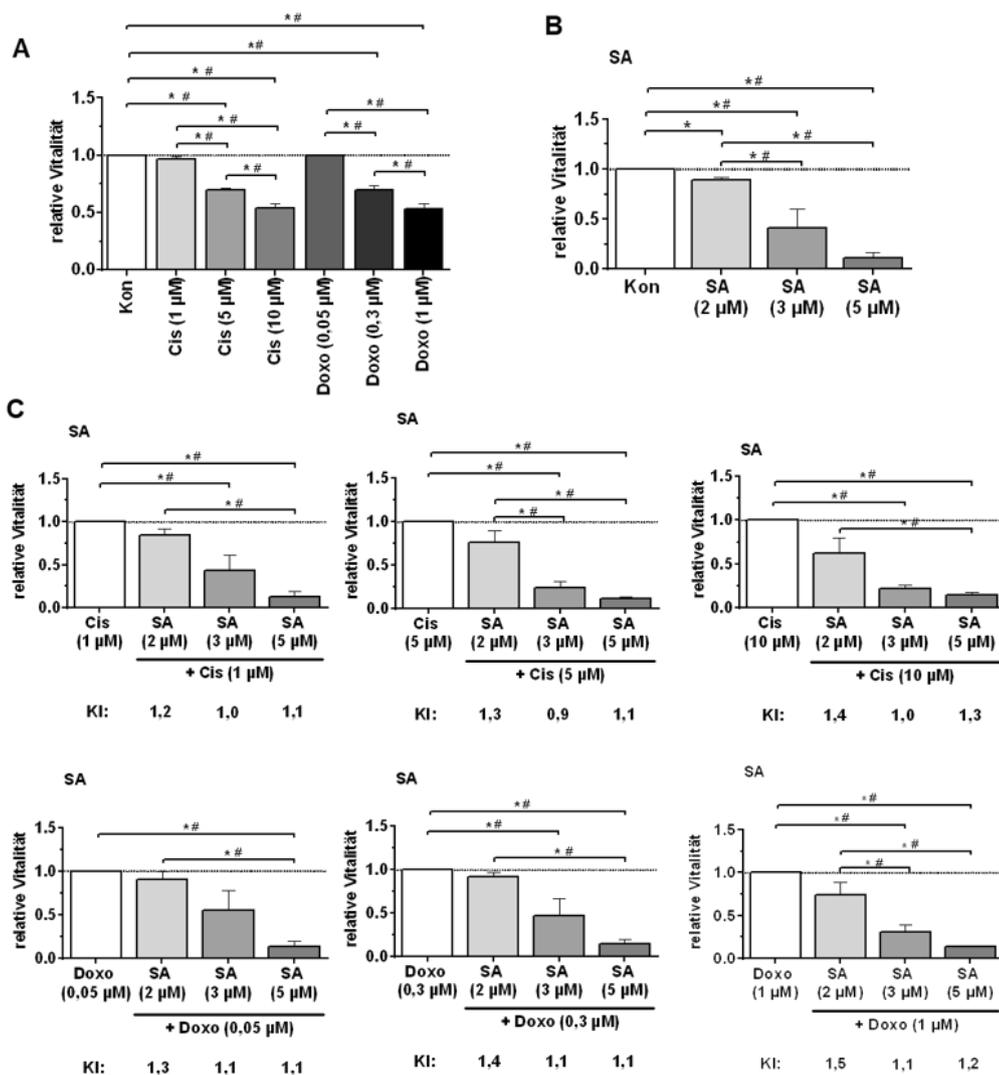


Abbildung 8.14: Einfluss der Kombinationsbehandlung auf die Vitalität von BxPC3-Zellen.

Um die Stärke der Kombinationsbehandlungen zu bewerten wurden BxPC3-Zellen für 72 h mit Konzentrationskombinationen der Naturstoffe und Cis bzw. Doxo behandelt. Die Konzentrationen liegen im Bereich der IC₂₀, IC₅₀ und IC₈₀ der jeweiligen Substanz. Mittels Alamar Blue®-Assay wurde die Vitalität bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der Substanzen allein (A; B; D; F) bzw. der verschiedenen Konzentrationskombinationen (C; E; G) im Vergleich zur Kontrolle (= 1,0) (n = 3, N = 4). Der Kombinationsindex wurde mit Hilfe der CompuSyn-Software bestimmt. Es wird zwischen antagonistischen (KI > 1), additiven (KI = 1) und synergistischen (KI < 1) Effekten unterschieden. Student's *t*-Test *p ≤ 0,05; One-way ANOVA #p ≤ 0,05. Cis: Cisplatin; Doxo: Doxorubicin; IQ: 5-*epi*-Ilimaquinone, KI: Kombinationsindex; Kon: Kontrolle; NQ: 5-*epi*-Nakijiquinone Q; Nst: Naturstoff; SA: Secalonic acid F.



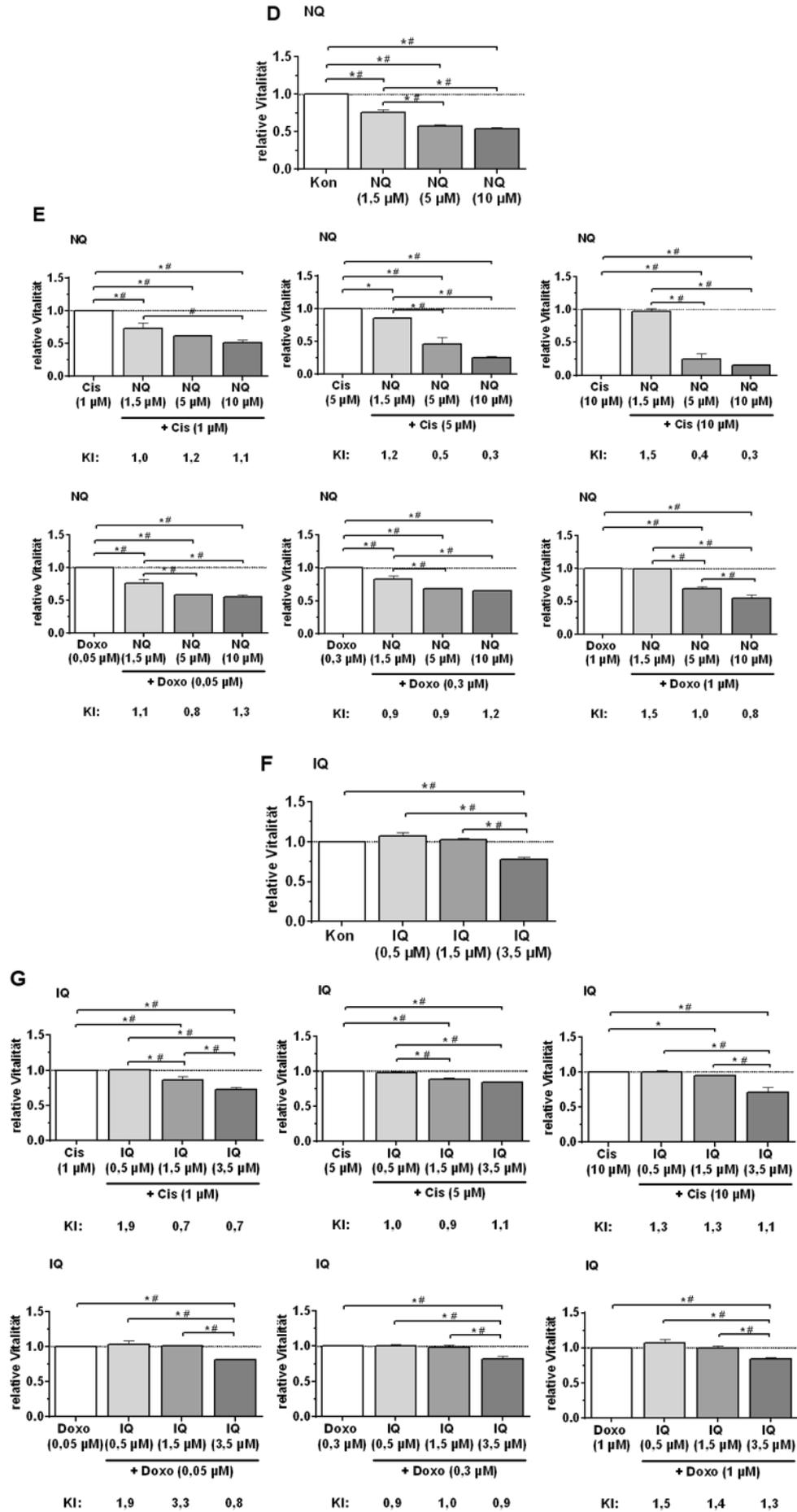
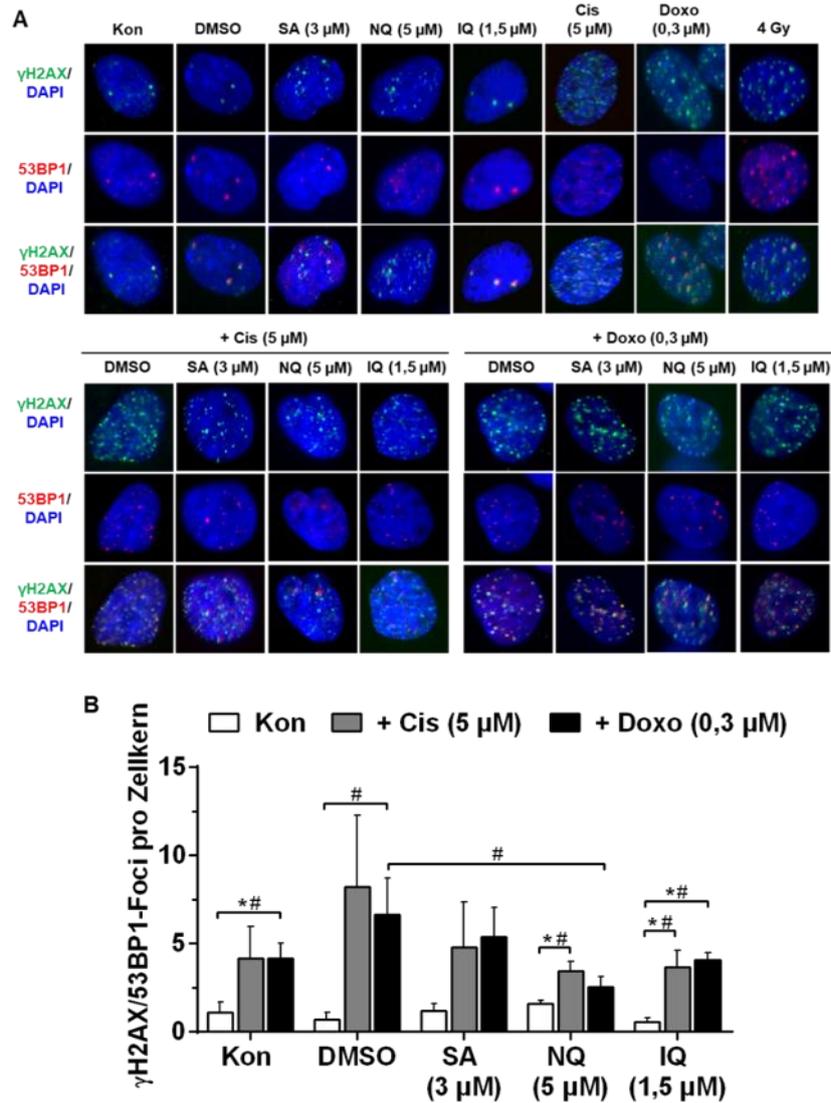
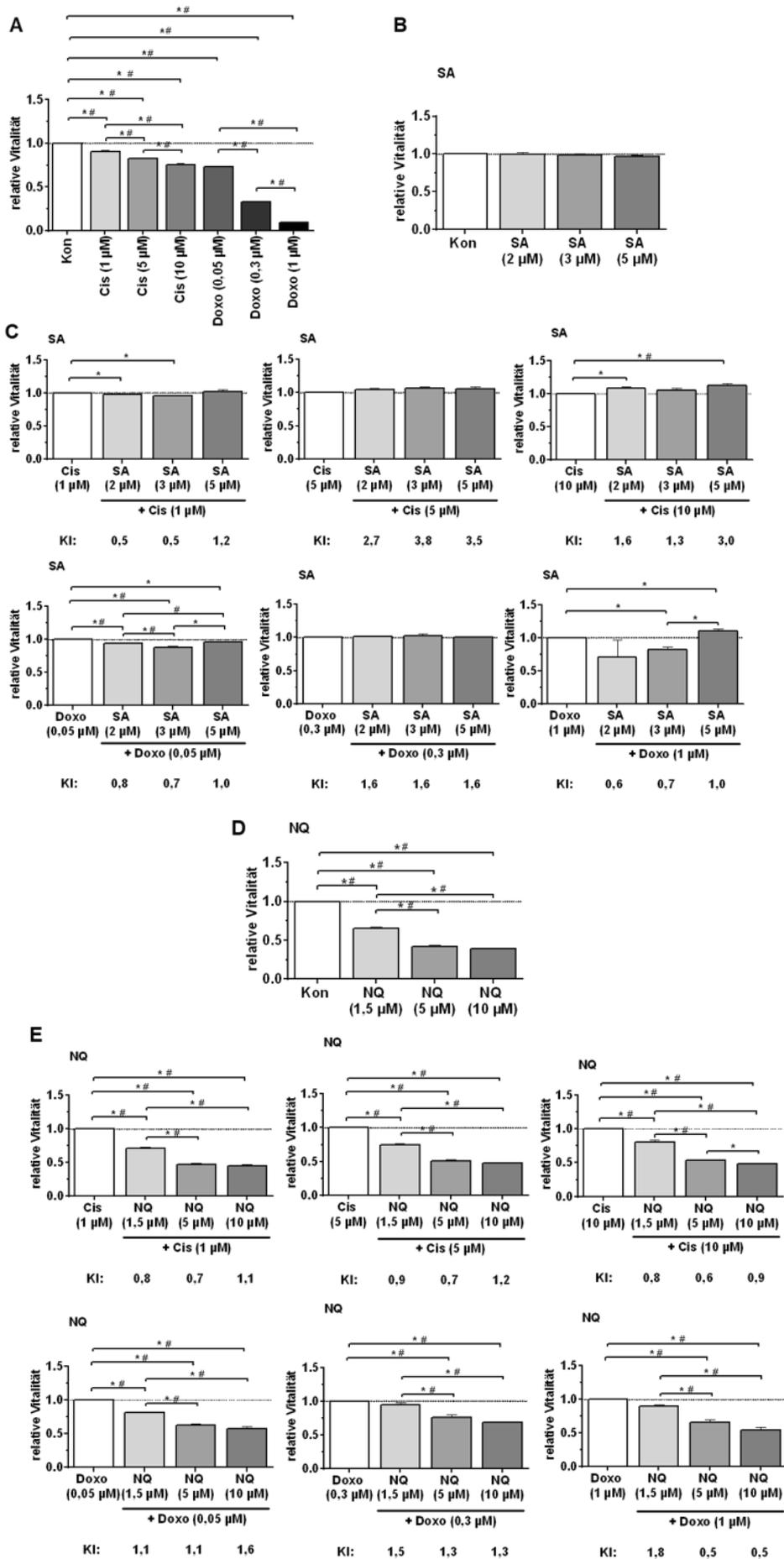


Abbildung 8.15: Einfluss der Kombinationsbehandlung auf die Vitalität von SU.86.86-Zellen

Um die Stärke der Kombinationsbehandlungen zu bewerten wurden SU.86.86-Zellen für 72 h mit Konzentrationskombinationen der Naturstoffe und Cis bzw. Doxo behandelt. Die Konzentrationen liegen im Bereich der IC₂₀, IC₅₀ und IC₈₀ der jeweiligen Substanz. Mittels Alamar Blue®-Assay wurde die Vitalität bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der Substanzen allein (A; B; D; F) bzw. der verschiedenen Konzentrationskombinationen (C; E; G) im Vergleich zur Kontrolle (= 1,0) (n = 3, N = 4). Der Kombinationsindex wurde mit Hilfe der CompuSyn-Software bestimmt. Es wird zwischen antagonistischen (KI > 1), additiven (KI = 1) und synergistischen (KI < 1) Effekten unterschieden. Student's *t*-Test *p ≤ 0,05; One-way ANOVA #p ≤ 0,05. Cis: Cisplatin; Doxo: Doxorubicin; IQ: 5-*epi*-Ilimaquinone, KI: Kombinationsindex; Kon: Kontrolle; NQ: 5-*epi*-Nakijiquinone Q; Nst: Naturstoff; SA: Secalonic acid F.

**Abbildung 8.16: Einfluss ausgewählter Naturstoffe auf nukleäre γH2AX-, 53BP1- und kolokalisierte γH2AX/53BP1- Foci in NHDF-Zellen.**

Um die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) zu bestimmen, wurde die Anzahl nukleärer S139 phosphorylierten H2AX (γH2AX) -, 53BP1- und kolokalisierte γH2AX/53BP1-Foci ermittelt. Dazu wurden SU.86.86-Zellen für 24 h mit einer Konzentration im Bereich der IC₅₀ der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 μM Cis oder 0,3 μM Doxo behandelt. A: Repräsentative Mikroskopbilder zeigen die Formation der Foci, sowie deren Kolokalisation nach der Mono- oder Kombinationsbehandlung. B: Quantitative Auswertung kolokalisierte γH2AX/53BP1-Foci pro Zelle. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM (n = 3, N ≥ 50 Zellen). Student's *t*-Test *p ≤ 0,05; One-way ANOVA #p ≤ 0,05. Cis: Cisplatin; DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol; Doxo: Doxorubicin; IQ: 5-*epi*-Ilimaquinone; K: Kontrolle; NQ: 5-*epi*-Nakijiquinone Q; Nst: Naturstoff; SA: Secalonic acid F; γH2AX: H2A histone family, member X an Serin 139 phosphoryliert.



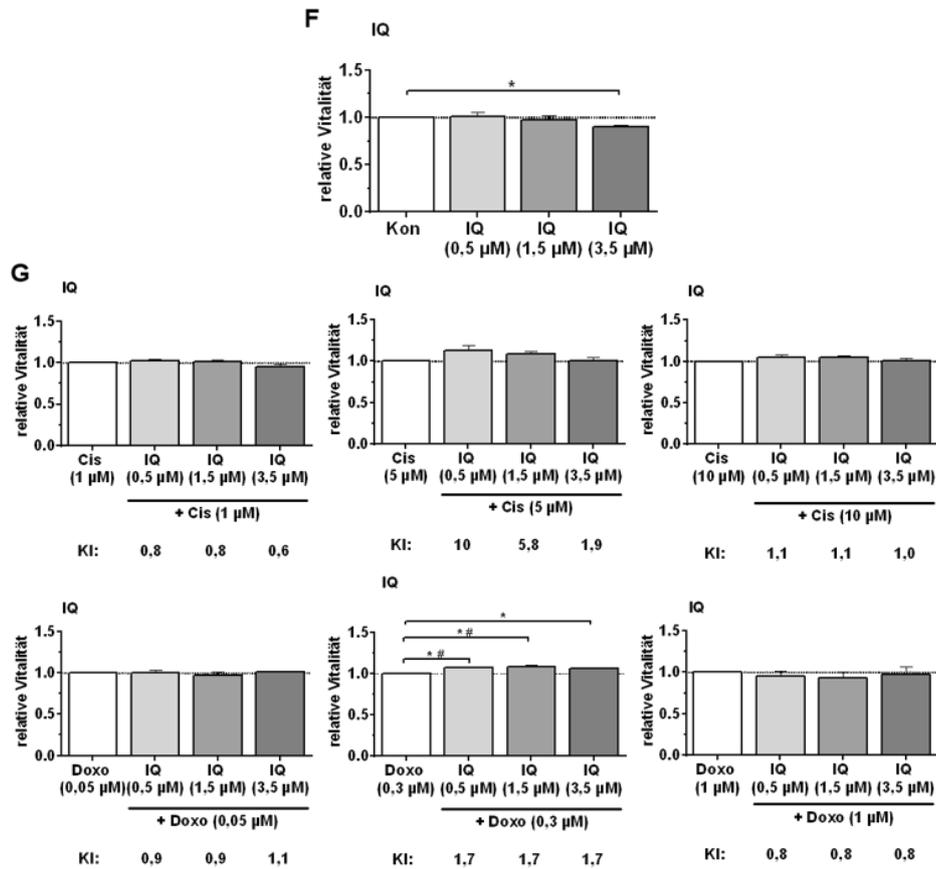


Abbildung 8.18: Einfluss der Kombinationsbehandlung auf die Vitalität von NHDF-Zellen

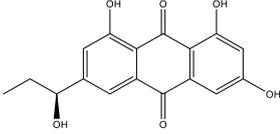
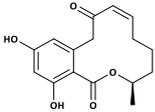
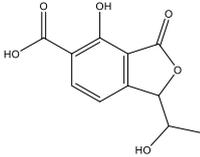
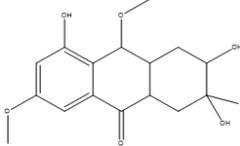
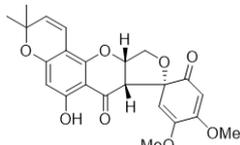
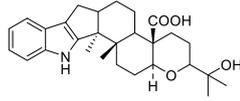
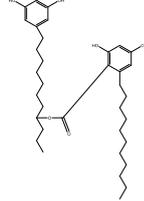
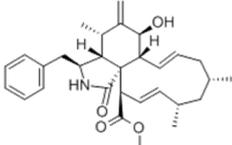
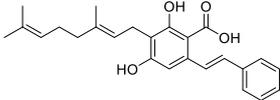
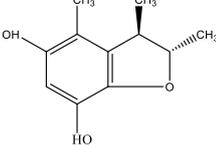
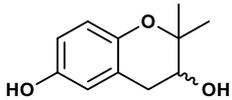
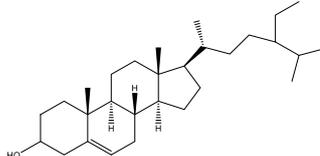
Um die Stärke der Kombinationsbehandlungen zu bewerten wurden NHDF-Zellen für 72 h mit Konzentrationskombinationen der Naturstoffe und Cis bzw. Doxo behandelt. Die Konzentrationen liegen im Bereich der IC_{20} , IC_{50} und IC_{80} der jeweiligen Substanz. Mittels Alamar Blue®-Assay wurde die Vitalität bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der Substanzen allein (A; B; D; F) bzw. der verschiedenen Konzentrationskombinationen (C; E; G) im Vergleich zur Kontrolle (= 1,0) ($n = 3$, $N = 4$). Der Kombinationsindex wurde mit Hilfe der CompuSyn-Software bestimmt. Es wird zwischen antagonistischen ($KI > 1$), additiven ($KI = 1$) und synergistischen ($KI < 1$) Effekten unterschieden. Student's t -Test $*p \leq 0,05$; One-way ANOVA $\#p \leq 0,05$. Cis: Cisplatin; Doxo: Doxorubicin; IQ: *5-epi-Iliimaquinone*, KI: Kombinationsindex; Kon: Kontrolle; NQ: *5-epi-Nakijiquinone Q*; Nst: Naturstoff; SA: *Secalonic acid F*.

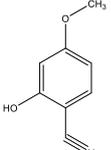
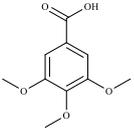
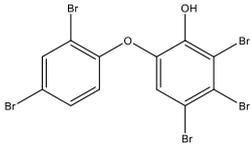
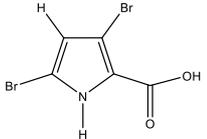
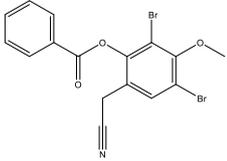
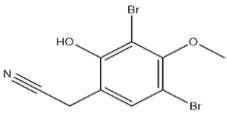
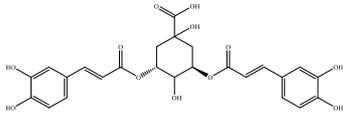
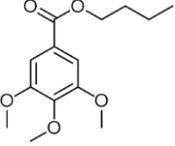
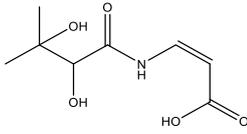
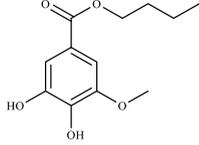
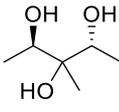
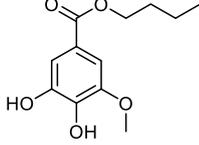
8.2 Auflistung der den Abbildungen zugrunde liegenden Daten

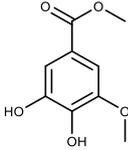
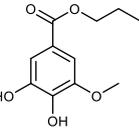
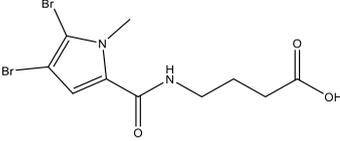
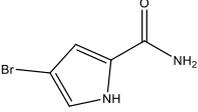
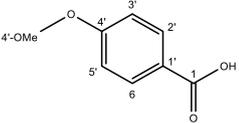
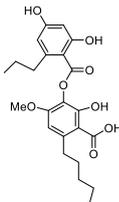
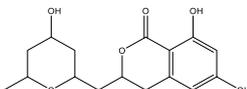
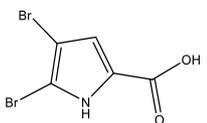
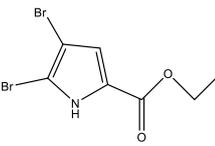
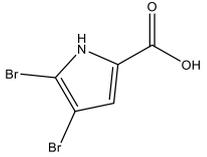
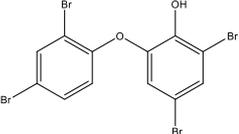
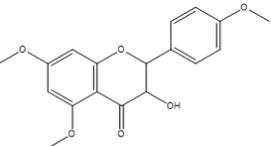
Tabelle 8.1: Daten der ermittelten IC_{50} der Naturstoffe in BxPC3- und SU.86.86-Zellen nach 72-stündiger Dauerbehandlung.

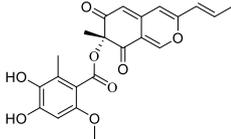
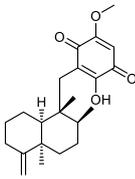
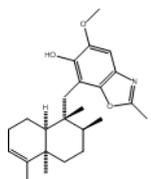
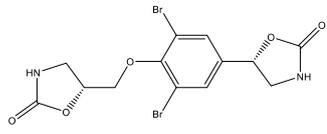
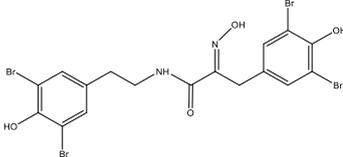
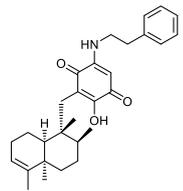
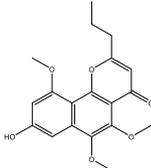
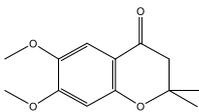
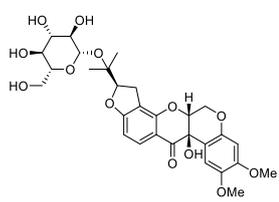
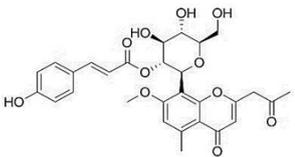
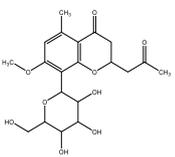
BxPC3- und SU.86.86-Zellen wurden für die Bestimmung des jeweiligen IC_{50} für 72 h mit Konzentrationen zwischen 0,1 μ M und 100 μ M des jeweiligen Naturstoffes (Nst) behandelt. Die Zugabe des Naturstoffes erfolgte 24 h nach Aussaat. Die metabolische Aktivität der Zellen, welche als Maß für die Vitalität dient, wurde mit dem Alamar Blue® Assay bestimmt. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.1 (A) zugrunde liegenden IC_{50} -Werte für BxPC3- und SU.86.86-Zellen ($n = 3$; $N = 4$).

Nst	IC_{50} [μ M]	
	BxPC3	SU.86.86
(R)-(+)-Methylsuccinic acid	> 100	> 100
(-) Ageloxime D	= 15	= 15
(-) Arctigenin	= 20	= 5
(-) α -Bisabolol	= 100	= 100
(-) Matairesinol	> 100	= 41
(+) Aeroplysinin-1	= 10	= 30
(+) Agelasidine C	> 100	> 100
(+) Avarol	= 30	= 30
(+)-Isochromophilone VI	= 0,1	= 0,1
(E)-Methyl-3-(4-methoxyphenoxy)propenoat	= 4	= 4

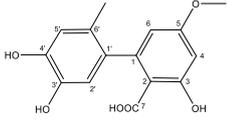
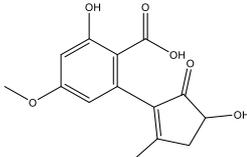
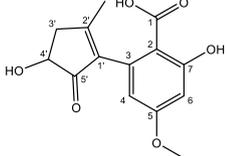
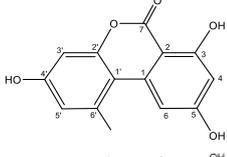
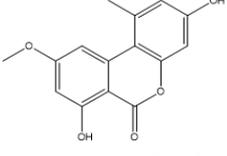
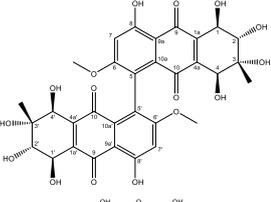
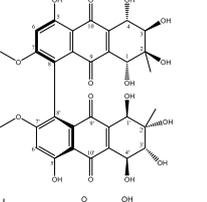
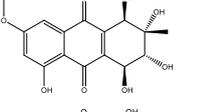
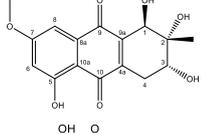
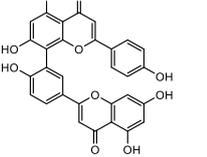
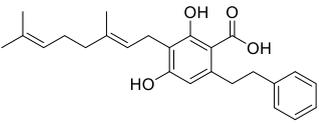
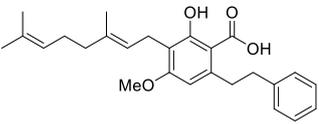
(S)-(-) <i>Rhodoptilometrin</i>		= 5	= 25
(S)- <i>cis-Resorcylide</i>		= 35	= 35
1,3-Dihydro-4-hydroxy-1(1-hydroxyethyl)-3-oxoisobenzofuran-5-carboxylic acid		> 100	> 100
10-Methylaltersolanol Q		= 100	> 100
11-Hydroxy-amorphispironone		= 30	= 30
12-Carboxyl-paspaline		= 15	= 15
15-Dehydroxy-integracin B		= 40	= 40
18-Dehydroxy-cytochalasin H		= 1,5	= 1,5
2-(1'E-styryl)-5-geranyl-resorcin-1-carboxylic acid		= 25	= 25
2, 3, 4-Trimethyl-5, 7-dihydroxy-3-dihydrobenzofuran		> 100	> 100
2,2-Dimethylchroman-3,6-diol		> 100	> 100
24-Ethylcholesta-5-en-3β-ol		> 100	> 100

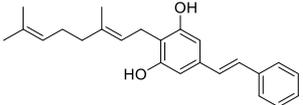
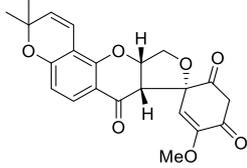
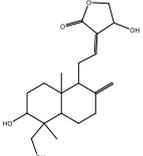
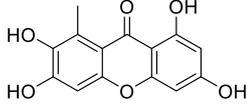
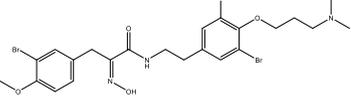
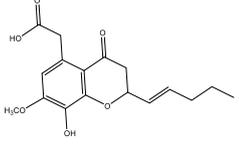
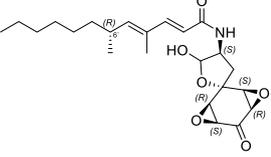
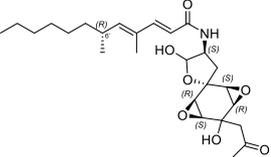
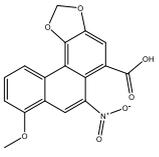
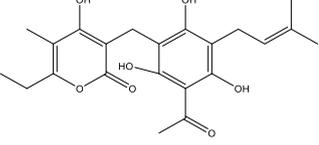
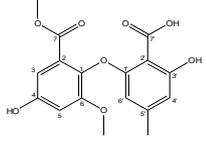
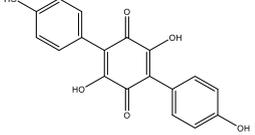
2-Hydroxy-4-methoxyphenylacetoneitril		> 100	> 100
3, 4, 5-O-trimethylgallate		> 100	> 100
3, 4, 6-Tribromo-2-(2',4'-dibromophenoxy)phenol		= 2	= 2
3, 5-Dibromo-1H-pyrrole-2-carboxylic acid		> 100	> 100
3, 5-Dibromo-2-benzoyloxy-4-methoxyphenylacetoneitril		> 100	= 100
3, 5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxyphenylacetoneitril		> 100	> 100
3, 5-Dicaffeoylquinic acid		> 100	> 100
3,4,5-Tri-O-methylgallic acid butyl ester		> 100	> 100
3l2m-9.10-1		> 100	> 100
3-Methoxybutyl gallate		= 70	= 70
3-Methyl-2,3,4-pentanetriol		> 100	> 100
3-O-Methylgallic acid butyl ester		= 40	= 40

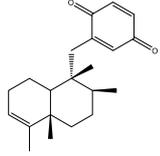
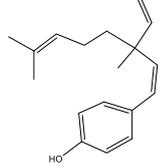
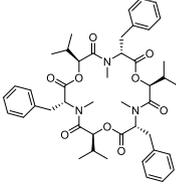
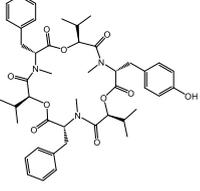
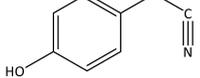
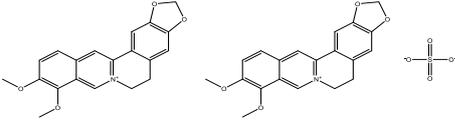
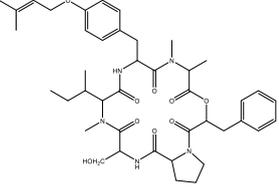
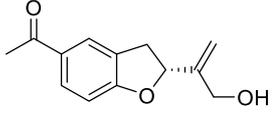
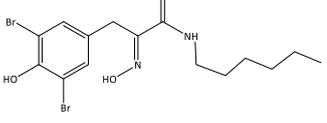
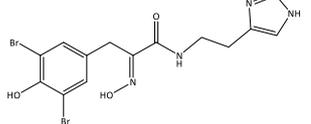
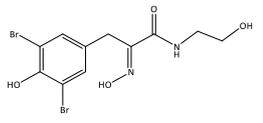
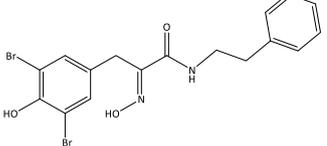
3-O-Methylgallic acid methyl ester		= 0,1	= 0,1
3-O-Methylgallic acid propyl ester		= 15	= 65
4 - (4,5 -dibromo-1-methyl-1H-pyrrole-2-carboxamido) Butanoic acid		> 100	> 100
4 -Bromopyrrole-2-carboxamide		> 100	> 100
4 -Methoxybenzoic acid		> 100	> 100
4 '-O-Methyl norhomosekikaic acid		= 100	= 100
4'- Hydroxyasperentin		> 100	> 100
4, 5-Dibromo-1H-pyrrol-2-carbon acid		> 100	> 100
4, 5-Dibromo-1H-pyrrol-2-carbonacidethylester		> 100	= 40
4, 5-Dibromo-1H-pyrrol-2-carboxamide		> 100	> 100
4, 6-Dibromo-2-(2',4'-dibromophenoxy)phenol		= 5	= 5
4', 5, 7 - Trimethoxydihydroflavonol		> 100	> 100

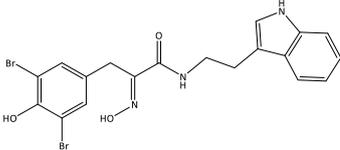
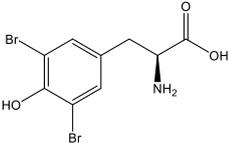
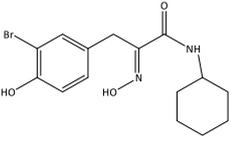
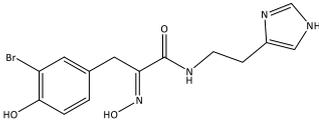
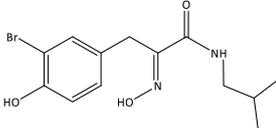
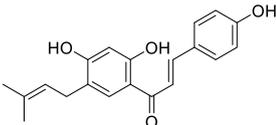
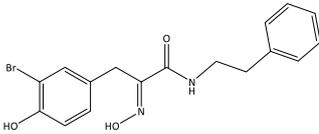
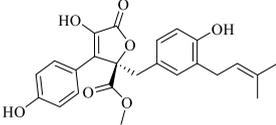
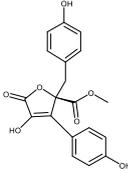
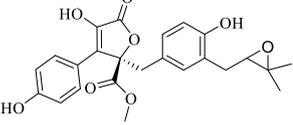
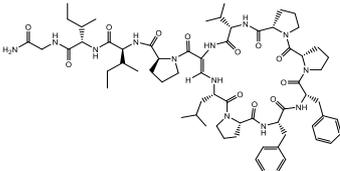
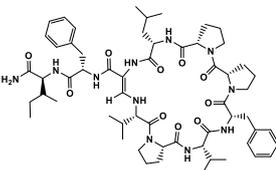
<i>4'-hydroxy-3'-methoxy-Mitorubrin</i>		= 100	>	100
<i>5-epi-Illimaquinone</i>		= 8	=	1,5
<i>5-epi-Nakijiquinone C</i>		= 40	=	40
<i>5-(3,5-dibromo-4-(2-oxooxazolidin-5yl)methoxy)phenyl Oxazolidin-2-one</i>		= 100	>	100
<i>5,5'-Dibromohemibastadin-1</i>		> 100	>	100
<i>5-epi-Nakijiquinone Q</i>		= 2	=	5
<i>6-Methoxycomaparvin-5-methyl ether</i>		= 3	>	100
<i>6,7-Dimethoxy-2,2-dimethyl-4-chromanone</i>		> 100	>	100
<i>6'-O-β-D-glucopyranosyl-12a-hydroxydalpanol</i>		= 100	=	10
<i>7-O-Methylaloeresin A</i>		> 100	>	100
<i>7-O-Methylaloesin</i>		> 100	>	100

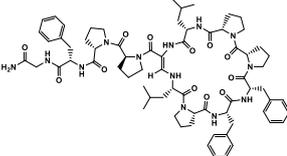
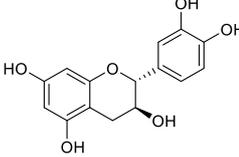
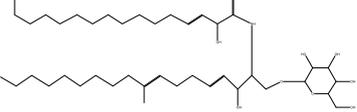
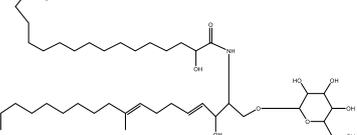
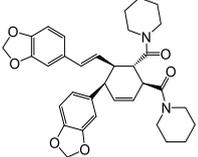
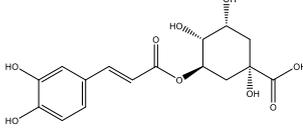
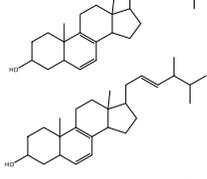
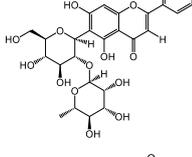
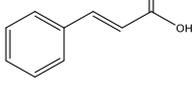
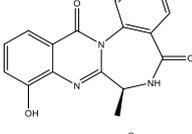
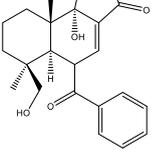
<i>8-OH-manzamine A</i>		= 5	=	4
<i>9, 21-Didehydroryanodine</i>		> 100	>	100
<i>Aaptamine</i>		= 30	=	30
<i>Acremonisol</i>		= 100	>	100
<i>Acteoside</i>		= 65	>	100
<i>Aerophobin 2</i>		> 100	>	100
<i>Aerothionin</i>		= 25	=	25
<i>Agelanin B</i>		> 100	>	100
<i>Agelasine D</i>		= 30	=	30
<i>Aloeemodin</i>		= 30	=	40
<i>Aloeresin A</i>		= 100	=	100
<i>Aloesin</i>		= 100	>	100

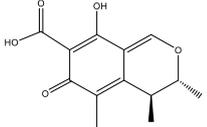
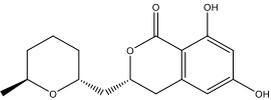
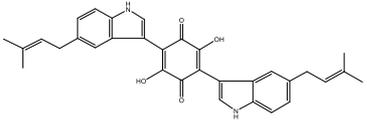
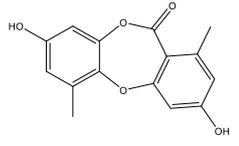
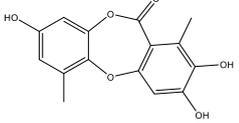
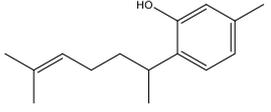
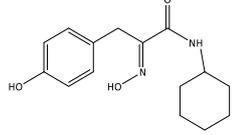
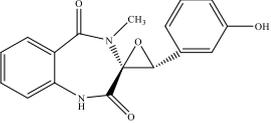
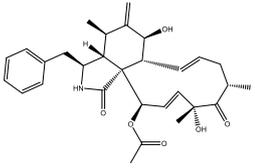
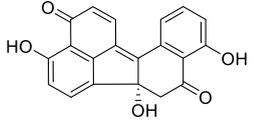
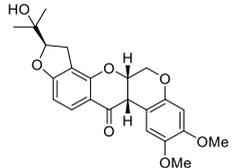
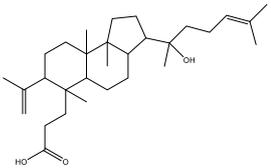
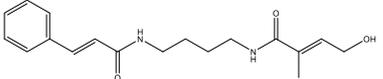
<i>Altenusin</i>		= 60	= 100
<i>Alteric acid</i>		> 100	= 10
<i>Alternarienoic acid</i>		> 100	> 100
<i>Alternariol</i>		= 2,5	= 5
<i>Alternariol monomethyl ether</i>		= 15	= 15
<i>Alterporriol D</i>		= 20	= 20
<i>Alterporriol E</i>		> 100	> 100
<i>Altersolanol A</i>		= 2,5	= 2,5
<i>Altersolanol C</i>		= 3,5	= 3,5
<i>Amenthoflavone</i>		= 30	= 30
<i>Amorfrutin 4</i>		= 0,1	= 0,1
<i>Amorfrutin B</i>		= 25	= 25

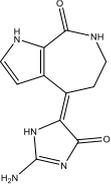
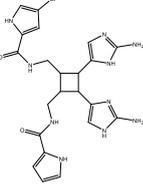
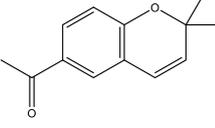
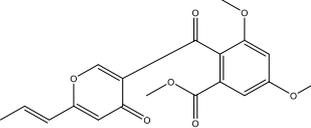
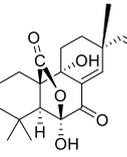
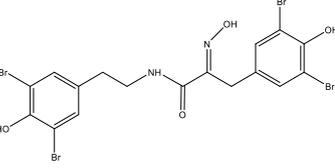
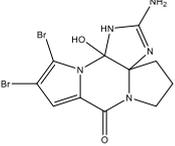
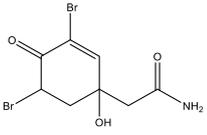
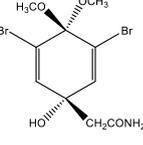
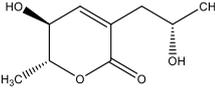
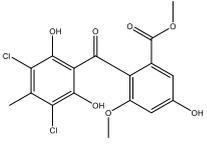
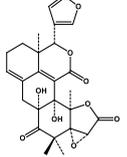
<i>Amorphastilbol</i>		= 30	= 30
<i>Amorphispironone B</i>		= 30	= 30
<i>Andrographolide</i>		= 7	= 7
<i>Anomalin A</i>		= 40	= 40
<i>Aplysamine - 2</i>		= 35	= 35
<i>Aposphaerin A</i>		> 100	> 100
<i>Aranorosin</i>		= 2,5	= 2,5
<i>Aranorosinol B</i>		= 30	= 30
<i>Aristolochic acid</i>		= 1,5	= 40
<i>Arzanol</i>		= 100	= 100
<i>Asterric acid</i>		> 100	> 100
<i>Atromentine</i>		= 100	> 100

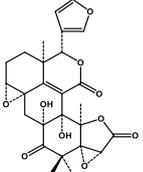
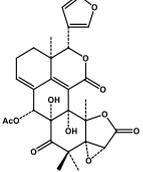
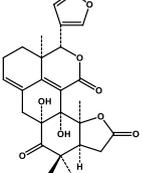
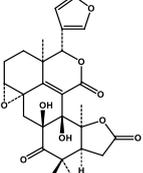
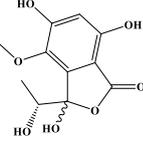
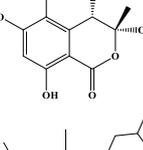
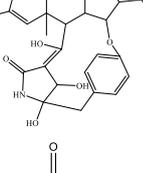
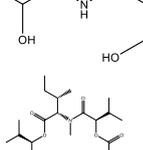
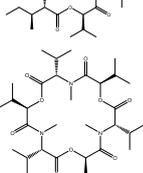
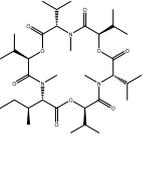
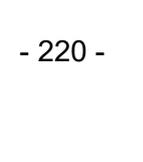
<i>Avaron</i>		= 30	= 30
<i>Bakuchiol</i>		= 20	= 20
<i>Beauvericin</i>		= 6	= 3
<i>Beauvericin J</i>		= 10	= 10
<i>Benzylnitrile</i>		> 100	> 100
<i>Berberin hemisulfat</i>		= 50	= 80
<i>Bionectriamide A</i>		= 30	= 30
<i>Bitalin A</i>		> 100	> 100
<i>Br2Hexylamide</i>		= 40	= 1
<i>Br2Histamide</i>		> 100	> 100
<i>Br2Hydroxyethylamide</i>		= 100	> 100
<i>Br2Phenethylamide</i>		> 100	> 100

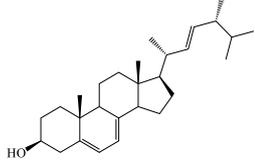
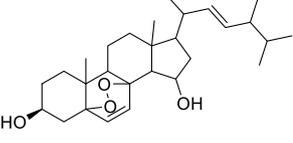
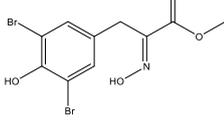
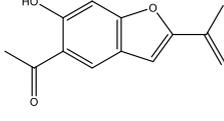
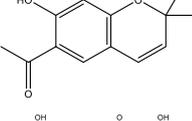
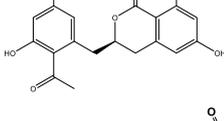
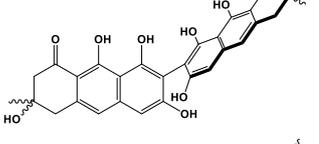
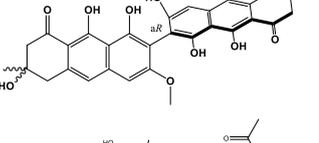
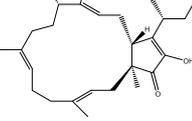
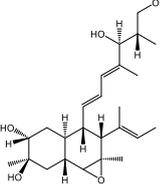
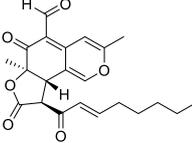
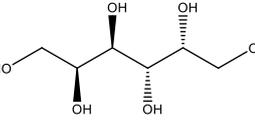
<i>Br2Tryptamide</i>		= 30	= 60
<i>Br2Tyrosin</i>		> 100	> 100
<i>BrCyclohexylamide</i>		= 100	= 100
<i>BrHistamide</i>		> 100	> 100
<i>BrIsobutylamide</i>		> 100	> 100
<i>Brousochalcone B</i>		= 4	= 30
<i>BrPhenethylamide</i>		> 100	= 100
<i>Butyrolactone I</i>		= 100	= 100
<i>Butyrolactone II</i>		> 100	> 100
<i>Butyrolactone III</i>		= 0,1	= 0,1
<i>Callyaerin E</i>		= 25	= 25
<i>Callyaerin F</i>		= 20	= 20

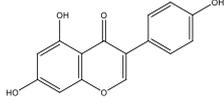
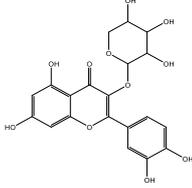
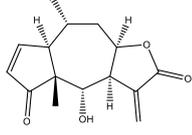
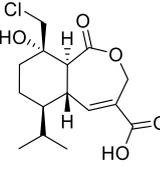
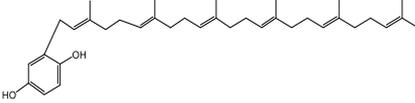
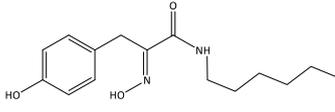
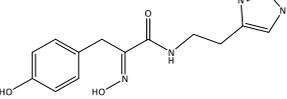
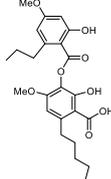
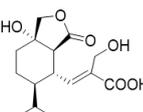
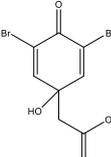
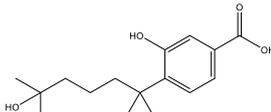
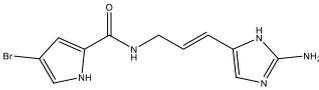
<i>Callyaerin G</i>		= 3	= 3
<i>Catechin</i>		= 100	= 100
<i>Cerebroside C</i>		> 100	> 100
<i>Cerebroside D</i>		> 100	> 100
<i>Chabamide</i>		= 30	= 10
<i>Chlorogenic acid</i>		> 100	> 100
<i>Cholest-5-en-3β-ol/(22E, 24S)-24-Methylcholesta-5,22-dien-3β-ol</i>		> 100	> 100
<i>Chrysin 6-C-(2''-O-α-L-rhamnopyranosyl)-β-D-glucopyranoside</i>		> 100	> 100
<i>Cinnamic acid</i>		> 100	> 100
<i>Circumdatin G</i>		> 100	> 100
<i>Citreodrimene B</i>		= 2,5	= 4

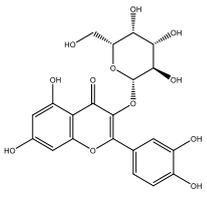
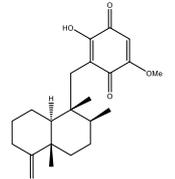
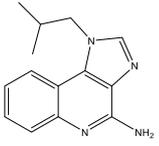
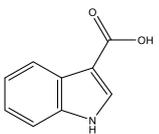
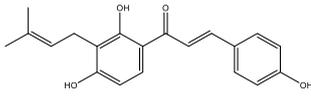
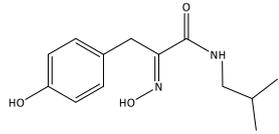
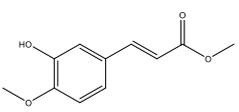
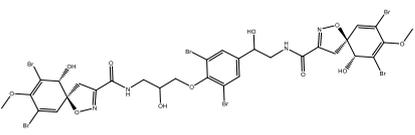
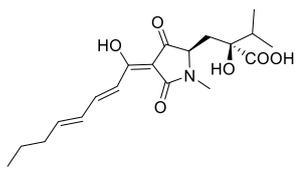
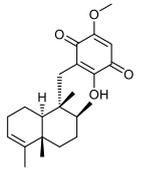
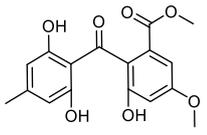
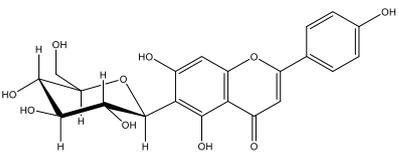
<i>Citrinin</i>		= 100	= 100
<i>Cladosporin</i>		= 100	= 100
<i>Cochliodinol</i>		= 1,5	= 1,5
<i>Corynesidone A</i>		= 2	= 45
<i>Corynesidone C</i>		= 20	= 50
<i>Curcuphenol</i>		> 100	> 100
<i>Cyclohexylamide</i>		> 100	> 100
<i>Cyclopenol</i>		= 100	> 100
<i>Cytochalasin D deriv.</i>		= 0,1	= 0,1
<i>Daldinone I</i>		= 3	= 3
<i>Dalpanol</i>		> 100	> 100
<i>Dammarenol acid</i>		= 1	= 1
<i>Dasyclamide</i>		> 100	> 100

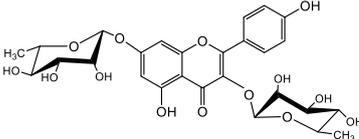
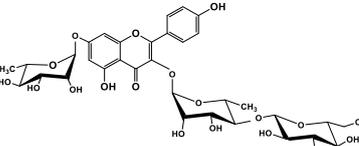
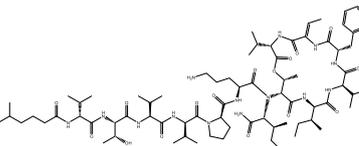
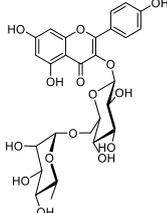
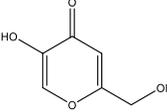
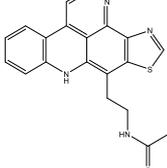
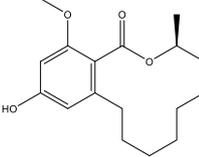
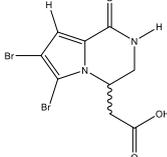
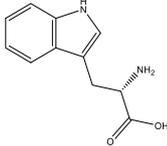
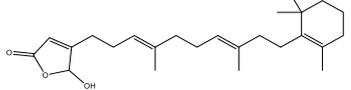
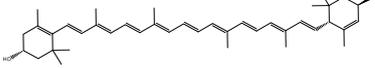
<i>Debromhymenialdisin</i>		= 30	= 80
<i>Debromsceptrin</i>		> 100	> 100
<i>Demethoxyencecalin</i>		> 100	> 100
<i>Deoxyfunicone</i>		= 80	> 100
<i>Diaporthins B</i>		= 4	= 4
<i>Dibromhemibastadin-1</i>		> 100	> 100
<i>Dibromhydroxyphakel lin</i>		> 100	> 100
<i>Dienon</i>		= 25	= 25
<i>Dienondimethoxyketal</i>		> 100	> 100
<i>Dihydroaspirone</i>		> 100	> 100
<i>Dihydrogeodin</i>		= 100	= 100
<i>Dukunolide A (LS4E-3)</i>		> 100	> 100

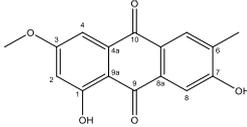
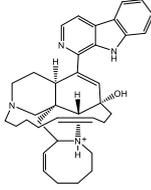
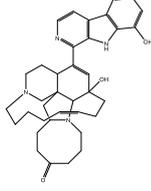
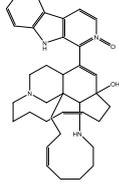
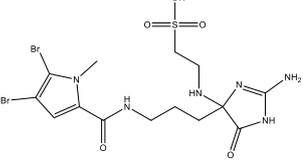
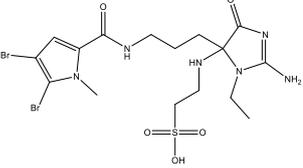
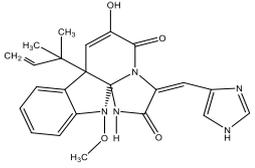
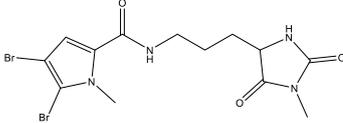
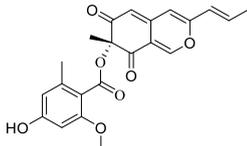
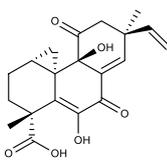
<i>Dukunolide B (LS4E-2)</i>		> 100	> 100
<i>Dukunolide C (LS4E-4)</i>		= 10	= 10
<i>Dukunolide D</i>		> 100	> 100
<i>Dukunolide F</i>		> 100	> 100
<i>Embepthalide C</i>		> 100	> 100
<i>Embeurekol B</i>		> 100	> 100
<i>Emb-peptide = WLIP</i>		= 15	= 15
<i>Enamidin</i>		> 100	> 100
<i>Enniatin A1</i>		= 4	= 4
<i>Enniatin B</i>		= 1,5	= 1,5
<i>Enniatin B1</i>		= 3,5	= 3,5

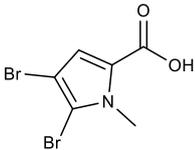
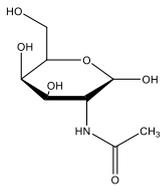
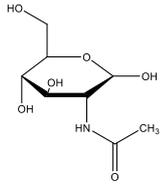
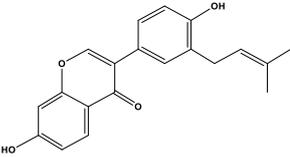
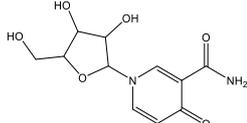
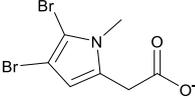
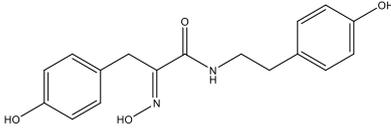
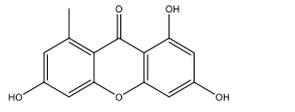
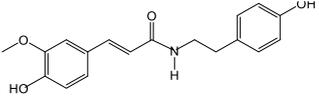
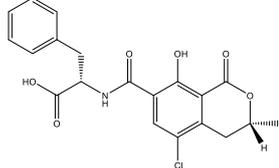
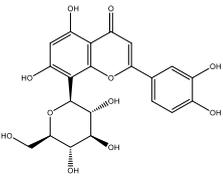
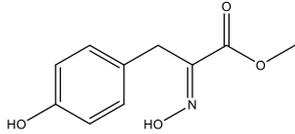
<i>Ergosterol</i>		= 20	= 20
<i>Ergosterol-5,8- peroxide A</i>		> 100	= 60
<i>Ester-Br2</i>		= 10	> 100
<i>Euparin</i>		= 100	= 35
<i>Eupatoriumchromene 1</i>		> 100	> 100
<i>Feralolide</i>		= 70	= 100
<i>Flavomannin A</i>		> 100	> 100
<i>Flavomannin D</i>		= 40	= 40
<i>Fusaproliferin</i>		= 0,1	= 0,1
<i>Fusarielin J</i>		= 60	= 60
<i>Coniellin A</i>		= 8,5	= 10
<i>Galactitol</i>		> 100	> 100

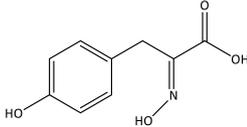
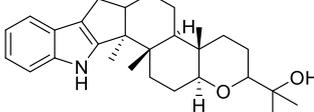
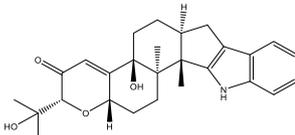
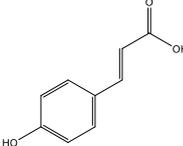
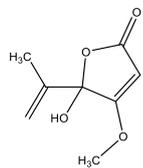
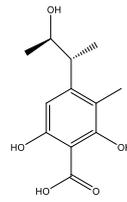
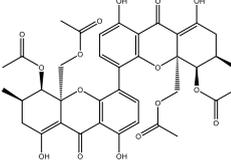
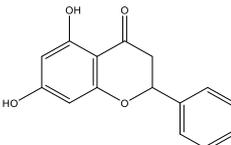
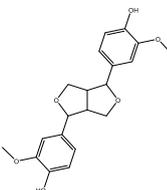
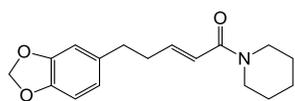
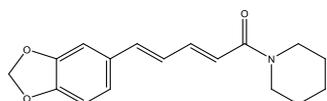
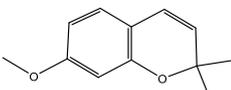
<i>Genestein</i>		> 100	> 100
<i>Guaiaverin</i>		> 100	> 100
<i>Helenalin</i>		= 5	= 1
<i>Heptelidic acid chlorohydrin</i>		= 20	= 20
<i>Hexaprenylhydrochinon</i>		= 2,5	= 10
<i>Hexylamide</i>		= 100	= 60
<i>Histamide</i>		= 100	> 100
<i>Homosekikaic acid</i>		= 91	= 91
<i>Hydroheptelidic acid</i>		> 100	> 100
<i>Hydroxydienon acid</i>		= 100	> 100
<i>Hydroxysydon acid</i>		> 100	> 100
<i>Hymenidin</i>		> 100	> 100

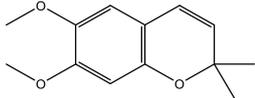
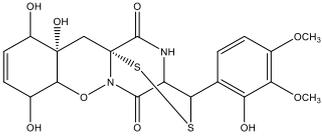
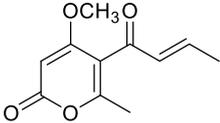
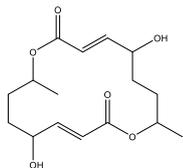
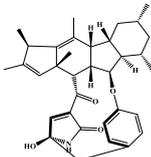
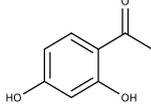
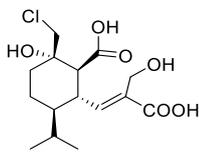
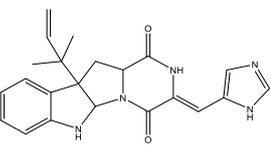
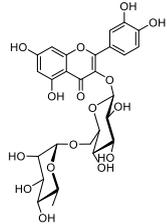
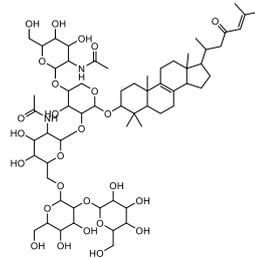
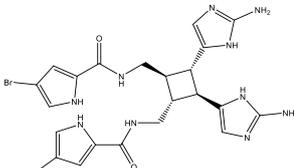
<i>Hyperoside</i>		> 100	> 100
<i>Ilimaquinone</i>		= 7	= 7
<i>Imiquimod</i>		> 100	> 100
<i>Indole-3-carboxylic acid</i>		> 100	> 100
<i>Isobavachalcone</i>		= 9	= 7
<i>Isobutylamide</i>		> 100	> 100
<i>Isoferulic acid methylester</i>		> 100	> 100
<i>Isofistularin 3</i>		= 30	= 30
<i>Isoharzianic acid</i>		> 100	> 100
<i>Isospongiaquinone</i>		= 1	= 0,1
<i>Isosulochrin</i>		= 100	> 100
<i>Isovitexin</i>		> 100	> 100

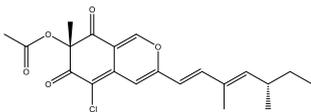
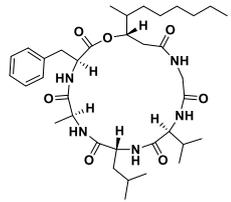
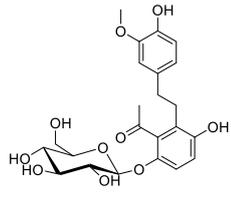
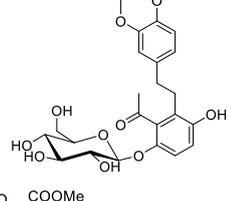
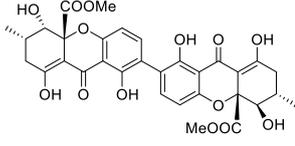
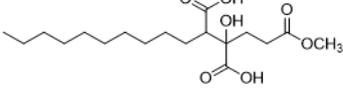
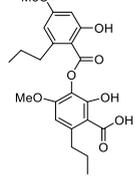
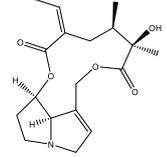
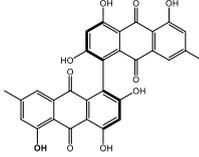
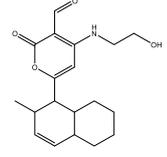
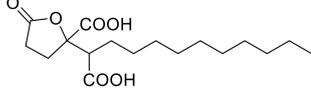
<i>Kaempferitrin</i>		> 100	> 100
<i>Kaempferol 3-O-beta-D-glucopyranosyl(1-4)-alpha-L-rhamnopyranosyl-7-O-alpha-L-rhamnopyranoside</i>		> 100	> 100
<i>Kahalalide F</i>		= 1	= 1
<i>Kaempferol-3-rutinoside</i>		> 100	> 100
<i>Kojic acid</i>		> 100	> 100
<i>Kuanoniamin D</i>		= 8,1	= 6
<i>Lasiodiplodin</i>		= 30	= 30
<i>Longamide B</i>		> 100	> 100
<i>L-Tryptophan</i>		> 100	> 100
<i>Luffariellolid</i>		= 19	= 6
<i>Lutein</i>		> 100	> 100

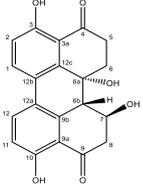
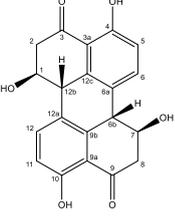
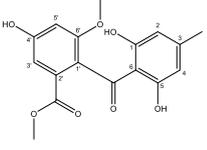
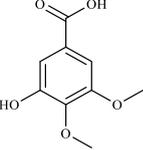
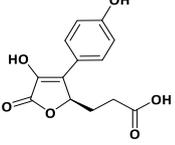
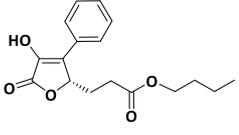
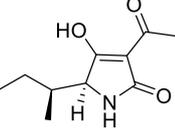
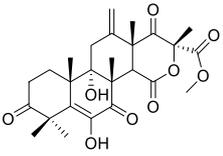
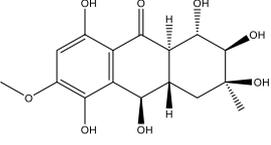
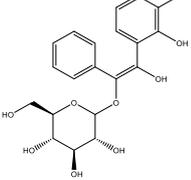
<i>Macrosporin</i>		> 100	> 100
<i>Manzamine A</i>		= 4	= 4
<i>Manzamine F</i>		= 56	= 32
<i>Manzamine J N-Oxid</i>		= 20	= 7
<i>Mauritamide B</i>		> 100	> 100
<i>Mauritamide C</i>		= 40	> 100
<i>Meleagrín</i>		= 40	= 40
<i>Midpacamide</i>		= 30	> 100
<i>Monomethylmitorubrin</i>		= 40	= 0,1
<i>Myrocin A</i>		= 40	= 40

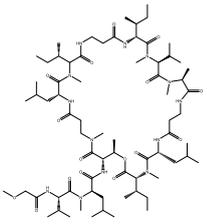
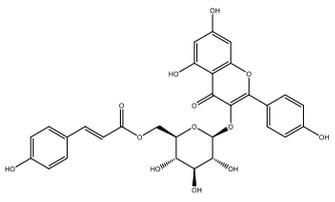
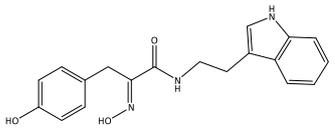
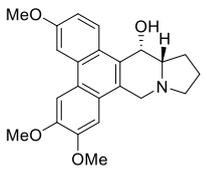
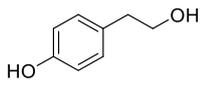
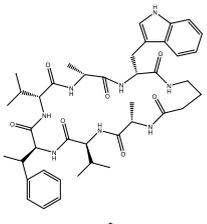
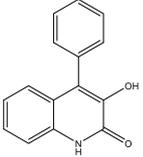
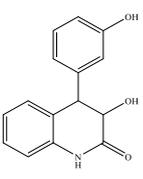
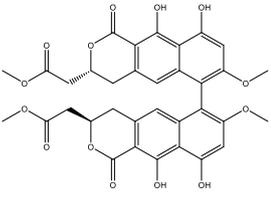
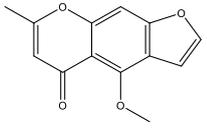
<i>N</i> -Methyl-4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid		> 100	>	100
<i>N</i> -Acetyl-D-Galactosamine		= 100	>	100
<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamine		> 100	>	100
Neobavaisoflavone		= 40	=	40
Nicotinamide, 1,4-dihydro-4-oxo-1-β-D-ribofuranosyl-(7Cl)		> 100	>	100
<i>N</i> -methyl-4,5-dibromopyrrole-2-methylcarboxylate		= 0,1	=	0,1
Nor-Bromhemibastadin		= 50	>	100
Norlichexanthone		= 60	=	60
<i>N</i> -trans-Feruoyltyramine		= 30	>	100
Ochratoxin A		= 7	=	7
Orientin		> 100	>	100
Oximester		> 100	>	100

<i>Oxim acid</i>		= 40	>	100
<i>Paspaline</i>		= 4	=	4
<i>Paxillin</i>		= 50	=	50
<i>p-Coumaric acid</i>		= 0,1	>	100
<i>Penicillic acid</i>		= 20	=	20
<i>Phenol A acid</i>		> 100	>	100
<i>Phomoxanthone A</i>		= 3	=	3
<i>Pinocembrin</i>		= 20	=	1,5
<i>Pinoresinol</i>		= 30	>	100
<i>Piperanine</i>		= 1	=	1
<i>Piperin</i>		> 100	>	100
<i>Precocene I</i>		= 1	=	1

<i>Precocene II</i>		= 3	>	100
<i>Pretrichodermamide A</i>		= 100	=	100
<i>Pyrenocine A</i>		= 4	=	4
<i>Pyrenophorol</i>		= 20	=	20
<i>Pyrrocidine D</i>		= 3	=	3
<i>Resacetophenon</i>		= 40	>	100
<i>Rhinomilisin G</i>		= 25	=	25
<i>Roquefortin C</i>		= 80	=	50
<i>Rutin</i>		> 100	>	100
<i>Sarasinoside A 1</i>		= 10	=	10
<i>Sceptrin</i>		> 100	>	100

<i>Sclerotiorin</i>		> 100	= 100
<i>Scopularide A</i>		> 100	> 100
<i>Scorzodihydrostilbene A</i>		> 100	> 100
<i>Scorzodihydrostilbene B</i>		> 100	> 100
<i>Secalonic acid F</i>		= 3	= 3
<i>Secospiculisporic acid B</i>		> 100	> 100
<i>Sekikaic acid</i>		= 40	= 70
<i>Senecionine</i>		> 100	> 100
<i>Skyrin</i>		= 20	= 20
<i>Solanapyrone C</i>		> 100	> 100
<i>Spiculisporic acid</i>		> 100	> 100

<i>Stemphytoxin I</i>		= 30	= 30
<i>Stemphyperlenol</i>		= 30	= 30
<i>Sulochrin</i>		= 40	> 100
<i>Syringic acid</i>		> 100	> 100
<i>Talbutyrolactone A</i>		> 100	> 100
<i>Talbutyrolactone B</i>		> 100	> 100
<i>Tenuazonic acid</i>		= 45	= 45
<i>Terretonin</i>		= 0,1	= 0,1
<i>Tetrahydroxybostricin</i>		= 0,1	= 25
<i>Tetrahydroxystilbeneglucoside</i>		> 100	> 100

<i>Theonellapeptolide 1e</i>		= 40	= 20
<i>Tilirosid</i>		= 100	= 100
<i>Tryptamide</i>		= 0,2	= 0,2
<i>Tylophorinine</i>		= 0,01	= 0,02
<i>Tyrosol</i>		> 100	> 100
<i>Unguisin E</i>		> 100	> 100
<i>Viridicatin</i>		= 30	= 30
<i>Viridicatol</i>		= 50	= 50
<i>Viriditoxin</i>		= 0,8	= 0,8
<i>Visnagin</i>		> 100	> 100

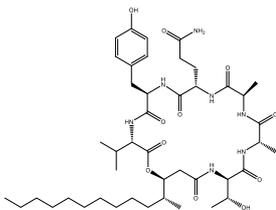
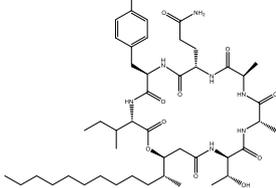
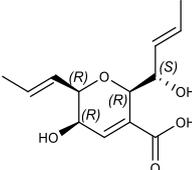
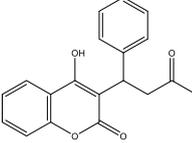
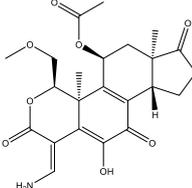
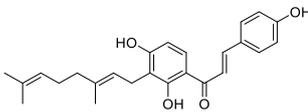
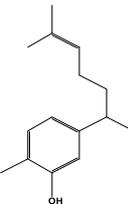
<i>W493 A</i>		= 50	= 25
<i>W493 B</i>		> 100	> 100
<i>Waal acid</i>		> 100	> 100
<i>Warfarin</i>		> 100	> 100
<i>Wortmannin C</i>		= 2	= 10
<i>Xanthoangelol</i>		= 10	= 10
<i>Xanthorrhizol</i>		= 100	= 20

Tabelle 8.2: Daten des Alamar Blue®-Assays nach 72-stündiger Dauerbehandlung mit SA, NQ und IQ.

BxPC3- und SU.86.86-Zellen wurden für die Bestimmung der jeweiligen IC_{50} für 72 h mit Konzentrationen zwischen 0,1 μ M und 100 μ M des jeweiligen Naturstoffes (Nst) behandelt. Die Zugabe des Naturstoffes erfolgte 24 h nach Aussaat. Die metabolische Aktivität der Zellen, welche als Maß für die Vitalität dient, wurde mit dem Alamar Blue®-Assay bestimmt. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.1 (B) zugrunde liegenden Mittelwerte \pm SEM in Prozent der unbehandelten Kontrolle für BxPC3- und SU.86.86-Zellen (n = 3; N = 4).

Konzentration [μ M]	BxPC3 (72 h)			SU.86.86 (72 h)		
	SA [%]	NQ [%]	IQ [%]	SA [%]	NQ [%]	IQ [%]
0	100	100	100	100	100	100
0,1	89,67 \pm 7,90	99,67 \pm 0,62	95,90 \pm 13,36	105,53 \pm 20,14	95,94 \pm 9,05	90,74 \pm 7,15
1	81,90 \pm 9,87	88,22 \pm 8,23	84,95 \pm 9,22	91,71 \pm 22,75	85,41 \pm 5,54	74,46 \pm 16,97
10	1,64 \pm 0,28	19,66 \pm 0,23	36,98 \pm 6,12	1,95 \pm 0,21	25,21 \pm 2,92	34,72 \pm 5,83
100	0,73 \pm 0,02	6,95 \pm 0,37	1,53 \pm 0,30	1,04 \pm 0,13	1,29 \pm 0,70	1,80 \pm 0,09

Tabelle 8.3: Daten des γ H2AX-Arrays von BxPC3- und SU.86.86-Zellen nach Behandlung mit den Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin.

Um den Aktivitätsstatus der DDR zu ermitteln, wurden BxPC3- und SU.86.86 Zellen für 24 h mit zytotoxischen Naturstoffen ($IC_{50} < 100 \mu M$) allein oder in Kombination mit 5 μM Cis oder 0,3 μM Doxo behandelt. Anschließend wurde die Modulation der Phosphorylierung von γ H2AX über das Gesamtfluoreszenzsignal als Marker für DNA-Schäden detektiert. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.2 zugrunde liegenden Mittelwerte für BxPC3- und SU.86.86-Zellen als Vielfaches der unbehandelten Kontrolle. Grün markierte Werte zeigen eine Abnahme um $\geq 20\%$ im Vergleich zur Kontrolle bzw. zu Cis oder Doxo, rot markierte Werte zeigen eine Zunahme von $\geq 30\%$ im Vergleich zur Kontrolle bzw. Cis oder Doxo. Cisplatin; Doxo: Doxorubicin; Nst: Naturstoff; γ H2AX: *H2A histone family, member X* an Serin 139 phosphoryliert.

Nst	BxPC3 (24 h)			SU.86.86 (24 h)		
	basal	+Cis	+Doxo	basal	+Cis	+Doxo
(-) <i>Ageloxime D</i>	0,99	3,15	2,84	0,99	2,74	3,18
(-) <i>Arctigenin</i>	1,01	2,93	2,14	1,12	2,43	3,18
(-) <i>α-Bisabolol</i>	0,76	1,68	1,78	0,97	1,48	1,92
(-) <i>Matairesinol</i>	0,73	2,04	2,37	1,15	2,63	3,87
(+) <i>Aeropylsinin-1</i>	1,00	2,25	2,96	1,28	2,56	4,53
(+) <i>Aeropylsinin-1</i>	1,12	2,30	1,91	1,29	2,18	2,26
(+) <i>Avarol</i>	0,68	2,31	2,58	1,20	2,22	4,13
(+) <i>Isochromophilone VI</i>	0,99	2,29	2,01	0,93	2,35	2,47
(E)-Methyl-3-(-4-methoxyphenoxy)propenoat	1,00	3,00	3,37	1,13	2,48	3,86
(S)-(-)Rhodoptilometrin	0,91	2,59	2,75	1,15	1,57	3,00
(S)-cis-Resorcylide	2,89	2,03	1,72	1,41	1,99	2,34
11-hydroxyamorphispironone	0,69	0,91	1,52	1,36	1,70	2,55
12-carboxyl-paspaline	1,01	2,30	2,09	0,88	2,09	2,53
15-dehydroxy-integracin B	0,91	2,04	1,89	1,02	2,00	2,41
18-Dehydroxycytochalasin H	1,09	2,29	2,33	1,31	2,06	2,47
2-(1'E-styryl)-5-geranyl-resorcin-1-carboxylic acid	0,71	1,50	1,48	1,03	1,50	1,74
2-Hydroxy-4-methoxyphenylacetonitril	0,86	2,97	2,49	0,85	2,20	3,33
3, 4, 6-tribromo-2-(2',4'-dibromophenoxy)phenol	1,05	3,19	3,00	0,95	2,68	3,28
3-Methoxybutyl gallate	0,72	1,36	2,08	1,32	1,24	1,55
3-O-Methylgallic acid butyl ester	0,98	2,20	2,22	1,05	2,47	2,42
3-O-Methylgallic acid methyl ester	0,95	2,29	2,39	1,03	1,76	2,41
3-O-Methylgallic acid propyl ester	0,90	2,29	2,34	1,26	1,82	2,32
4'-O-Methyl norhomosekikaic acid	0,92	2,01	2,13	0,82	1,95	2,36
4,5 Dibromo-1H-pyrrol-2-carbonsäureethylester	0,59	2,07	2,70	1,13	2,19	3,37
4,6-dibromo-2-(2',4'-dibromophenoxy)phenol	1,06	3,24	2,95	0,93	2,80	3,47
5-epi-Ilimaquinone	2,13	3,57	3,34	2,63	3,72	3,58
5-epi-Nakijiquinone C	1,33	2,22	1,95	1,46	2,30	2,20
5-epi-Nakijiquinone Q	3,08	4,92	4,75	3,33	2,89	3,51
6-Methoxycomaparvin-5-methyl ether	0,88	1,98	2,01	0,94	1,64	2,13
6'-O- β -D-glucopyranosyl-12a-hydroxydalpanol	0,87	1,50	1,25	1,12	1,41	1,68
8-OH-manzamine A	0,73	2,02	2,11	1,08	2,86	3,79
Aaptamine	0,93	1,84	1,81	0,95	1,80	1,82
Aerothionin	1,07	2,09	2,53	1,24	2,36	4,07

<i>Agelasine D</i>	1,03	2,31	2,19	1,12	2,55	2,95
<i>Aloeemodin</i>	0,87	2,63	2,63	1,11	2,58	3,54
<i>Altenusin</i>	0,90	1,78	2,09	1,29	1,37	1,95
<i>Alteric acid</i>	0,92	2,24	2,04	1,12	1,63	2,22
<i>Alternariol</i>	0,89	2,66	2,59	1,02	2,64	3,15
<i>Alternariol monomethyl ether</i>	0,88	2,91	3,26	1,11	2,65	3,93
<i>Alterporriol D</i>	0,93	2,44	2,23	1,23	1,76	2,34
<i>Altersolanol A</i>	1,04	3,30	2,85	1,21	2,87	3,33
<i>Altersolanol C</i>	0,96	1,94	1,72	1,14	2,11	2,23
<i>Amenthoflavone</i>	0,80	1,46	1,52	1,04	1,59	1,78
<i>Amorfrutin 4</i>	0,90	1,69	1,88	1,08	2,41	2,61
<i>Amorfrutin B</i>	0,62	1,21	1,56	1,18	1,61	2,28
<i>Amorphastilbol</i>	0,93	2,06	1,93	1,10	1,65	1,95
<i>amorphispironone B</i>	0,90	1,63	1,49	1,16	1,57	1,93
<i>Andrographolide</i>	0,96	2,10	1,83	1,18	2,54	2,67
<i>Anomalin A</i>	0,94	2,20	2,51	0,85	2,24	2,09
<i>Aplysamine-2</i>	0,67	1,48	1,65	1,28	1,67	2,55
<i>Aranorosin</i>	0,87	2,71	3,14	1,16	2,64	3,54
<i>Aranorosinol B</i>	1,03	2,69	2,62	1,01	2,47	3,08
<i>Aristolochic acid</i>	2,06	2,51	2,74	1,10	1,92	2,19
<i>Avaron</i>	0,68	2,85	1,95	1,23	2,85	3,31
<i>Bakuchiol</i>	1,09	2,81	2,88	1,20	2,64	3,69
<i>Beauvericin</i>	0,97	2,01	2,47	1,06	2,02	2,75
<i>Beauvericin J</i>	0,74	0,95	1,92	2,19	1,56	2,01
<i>Berberin hemisulfat</i>	0,76	1,42	2,08	1,20	1,89	1,56
<i>Bionectriamide A</i>	0,78	2,19	3,68	1,23	1,54	3,60
<i>Br2Hexylamide (new)</i>	0,85	2,66	2,98	1,21	2,50	3,66
<i>Br2Tryptamide</i>	0,96	2,10	2,31	0,88	2,10	2,99
<i>Brousochalcone B</i>	0,84	2,35	1,93	1,33	1,98	3,33
<i>BrPhenethylamide (new)</i>	0,87	2,83	3,41	1,21	2,25	4,04
<i>Butyrolactone III</i>	1,10	2,55	2,19	0,85	2,49	2,53
<i>Callyaerin E</i>	0,85	1,82	1,71	1,05	1,82	2,31
<i>Callyaerin F</i>	0,97	1,83	2,14	0,89	1,31	1,77
<i>Callyaerin G</i>	1,01	2,17	1,83	1,01	2,32	2,40
<i>Chabamide</i>	0,89	2,07	2,19	1,19	1,95	2,77
<i>Cinnamic acid</i>	0,78	1,64	1,68	0,96	1,46	1,68
<i>Citreodrimene B</i>	0,88	1,91	1,87	0,94	1,49	1,92
<i>Cochliodinol</i>	1,03	1,81	1,96	0,89	1,89	2,10
<i>Coniellin A</i>	1,00	2,20	2,19	2,83	2,38	2,75
<i>Corynesidone A</i>	1,10	3,26	3,00	1,28	2,75	3,88
<i>Corynesidone C</i>	1,04	2,35	2,49	1,67	1,81	2,25
<i>Cytochalasin D derv.</i>	1,05	2,19	2,13	0,84	2,15	2,48
<i>Daldinone I</i>	1,03	2,02	1,57	1,10	2,35	1,78
<i>Dammarenolsäure</i>	1,03	2,51	1,95	0,86	2,45	2,78
<i>Debromhymenialdisin</i>	0,85	2,83	2,90	0,99	2,47	3,76
<i>Deoxyfunicone</i>	1,00	2,13	2,08	1,07	1,90	2,40
<i>diaporthins B</i>	1,09	2,07	1,59	1,17	2,51	2,45
<i>Dibromhemibastadin-1</i>	0,80	1,64	1,87	1,02	1,48	1,65
<i>Dienon</i>	1,09	3,17	2,48	0,99	2,85	3,21
<i>Dienone dimethoxyketal</i>	0,89	2,13	2,40	1,11	1,72	2,33
<i>Dihydrogeodin</i>	0,69	2,48	2,91	1,11	2,26	3,82
<i>Dukunolide C (LS4E-4)</i>	0,89	2,03	2,02	1,06	2,50	2,93
<i>Emb-peptide = WLIP</i>	0,92	3,36	3,02	1,01	2,79	3,49
<i>Enniatin A1</i>	0,78	2,78	3,06	1,09	2,26	3,30
<i>Enniatin B</i>	1,04	2,94	2,79	0,98	2,69	3,19
<i>Enniatin B1</i>	0,96	1,68	1,70	0,99	1,86	2,17

<i>Ergosterol</i>	1,06	2,98	2,92	1,06	2,55	3,07
<i>Ester-Br2</i>	1,05	2,16	1,91	1,05	2,46	3,07
<i>Euparin</i>	1,13	2,17	2,20	1,02	2,50	2,45
<i>Feralolide</i>	0,85	2,39	3,08	1,33	1,55	3,13
<i>Flavomannin D</i>	0,93	1,68	1,41	1,14	1,56	1,49
<i>Fusaproliferin</i>	1,08	2,02	2,00	0,95	2,01	2,54
<i>Fusarielin J</i>	0,79	1,91	2,42	1,09	1,99	3,71
<i>Helenalin</i>	1,98	1,92	0,00	1,05	2,19	2,24
<i>Heptelidic acid chlorohydrin</i>	0,93	1,74	1,58	0,97	1,55	2,07
<i>Hexaprenylhydrochinon</i>	1,41	2,26	2,54	0,89	1,61	1,94
<i>Hexylamide (new)</i>	0,80	2,62	2,93	1,35	2,40	4,31
<i>Homosekikaic Acid</i>	0,82	3,32	3,31	0,87	2,37	3,37
<i>Hydroxysydonsäure</i>	0,84	2,92	2,34	0,86	2,09	3,14
<i>Hyperoside</i>	0,78	2,86	1,69	0,89	2,01	2,41
<i>Ilimaquinone</i>	1,12	2,45	2,35	1,19	2,45	2,21
<i>Indol-3-carboxylic acid</i>	0,73	2,65	2,35	0,91	2,17	2,83
<i>Isobavachalcone</i>	1,18	3,24	3,22	0,87	1,99	3,01
<i>Isofistularin 3</i>	0,72	2,67	3,89	1,22	2,40	5,33
<i>Isospongiaquinone</i>	1,08	2,55	2,11	0,83	2,61	2,55
<i>Isosulochrin</i>	0,97	1,95	2,26	0,95	1,71	2,08
<i>Isovitexin</i>	0,89	2,90	1,92	0,94	2,29	2,46
<i>Kaempferitrin</i>	0,88	3,74	3,16	0,90	2,35	2,41
<i>Kaempferol 3-O- β-D- glucopyranosyl (1-4) α-L- rhamnopyranosyl-7-O-α-L- rhamnopyranoside</i>	0,79	3,74	2,95	0,86	2,27	2,51
<i>Kahalalide F</i>	2,93	2,16	2,59	1,15	3,17	2,84
<i>Kämpferol - 3 - rutinoside</i>	0,86	3,07	1,36	0,91	2,21	2,44
<i>Kojic acid</i>	0,83	3,52	3,53	0,82	2,53	3,47
<i>Kuanoniamin D</i>	1,00	2,12	2,73	1,29	2,01	2,33
<i>Lasiodiplodin</i>	0,85	1,66	2,10	1,19	1,55	1,77
<i>Longamide B</i>	0,76	3,49	2,88	0,87	2,10	3,05
<i>Luffariellolid</i>	1,95	2,53	2,39	0,82	2,87	3,97
<i>Lutein</i>	0,78	3,59	3,14	0,94	2,32	3,12
<i>Macrosporin</i>	0,85	2,78	2,54	0,88	2,43	3,36
<i>Manzamine A</i>	0,84	1,94	1,83	1,05	2,26	3,27
<i>Manzamine F</i>	0,87	2,96	2,25	0,81	3,10	3,51
<i>Manzamine J N-Oxid</i>	0,93	1,78	2,52	1,01	1,98	3,45
<i>Mauritamide B</i>	0,78	3,07	2,66	0,81	2,21	3,18
<i>Mauritamide C</i>	0,86	1,80	1,94	0,81	1,18	1,45
<i>Meleagrין</i>	0,99	2,80	2,26	1,00	2,40	2,96
<i>Midpacamide</i>	0,84	2,29	2,60	1,01	2,42	3,64
<i>Monomethylmitorubrin</i>	1,00	2,04	1,90	1,03	2,19	2,36
<i>Myrocin A</i>	1,12	1,78	2,25	1,14	1,35	1,69
<i>Neobavaisoflavone</i>	0,75	3,11	1,27	1,04	2,88	3,38
<i>N-methyl-4,5-dibromopyrrole-2- methylcarboxylate</i>	0,87	2,40	2,80	1,22	1,59	2,36
<i>Nor-Bromhemibastadin</i>	1,02	2,42	2,49	1,04	2,34	3,02
<i>Norlichexanthone</i>	1,00	2,13	2,21	1,05	1,87	2,41
<i>Ochratoxin A</i>	0,91	1,41	1,43	1,17	1,49	1,90
<i>Oximester</i>	0,83	1,61	1,83	0,96	1,24	1,99
<i>Oximsäure</i>	1,03	2,24	2,44	1,03	2,35	3,10
<i>Paspaline</i>	1,01	2,11	2,07	0,94	2,21	2,57
<i>Paxillin</i>	0,90	2,51	3,17	1,23	1,48	2,45
<i>p-Coumaric acid</i>	0,91	1,84	1,72	1,01	2,20	2,51
<i>Penicillic Acid</i>	1,02	2,35	1,76	1,08	2,13	2,19

<i>Phomoxanthon A</i>	1,03	2,16	1,80	1,11	2,49	3,01
<i>Pinocebrin</i>	0,85	1,58	1,76	1,35	1,60	2,36
<i>Pinoresinol</i>	1,01	2,30	2,36	1,01	2,00	2,32
<i>Piperanine</i>	0,95	2,26	2,07	1,08	2,42	2,45
<i>Precocene I</i>	0,93	2,06	1,80	1,02	2,27	2,54
<i>Precocene II</i>	0,98	1,99	1,94	1,08	2,37	2,65
<i>Pretrichodermamide A</i>	0,99	2,04	2,23	0,95	1,90	2,37
<i>Pyrenocine A</i>	1,06	2,05	1,83	1,02	2,26	2,43
<i>Pyrenophorol</i>	1,06	2,23	1,92	1,08	2,05	2,44
<i>Pyrracidine D</i>	0,93	1,88	1,92	0,90	1,89	2,31
<i>Resacetophenon</i>	0,86	2,21	2,44	1,02	1,69	2,31
<i>Rhinomilisin G</i>	0,87	1,66	1,63	0,95	1,77	1,99
<i>Roquefortin C</i>	0,92	2,26	2,24	1,20	2,37	3,77
<i>Sarasinoside A 1</i>	1,07	2,00	2,21	0,89	1,88	2,68
<i>Secalonic acid F</i>	1,67	3,17	2,61	1,69	3,38	3,44
<i>Sekikaic acid</i>	0,81	2,84	2,45	1,03	2,86	3,17
<i>Skyrin</i>	1,43	2,15	3,65	1,18	2,18	4,28
<i>Stemphylltoxin I</i>	0,94	2,14	2,11	1,11	1,80	2,14
<i>Stemphyperyleneol</i>	0,35	3,10	2,59	1,22	2,97	3,22
<i>Sulochrin</i>	1,03	2,30	2,08	0,97	1,70	2,45
<i>Tenuazonic acid</i>	0,95	1,96	2,01	0,77	1,91	2,42
<i>Tenuazonsäure</i>	1,01	1,93	1,77	0,91	1,99	2,52
<i>Terretonin</i>	1,08	2,06	2,12	0,81	2,45	2,51
<i>Tetrahydroxybostricin</i>	0,87	2,58	2,81	1,10	2,71	3,68
<i>Theonellapeptolide Ie</i>	1,01	3,11	2,16	0,92	2,13	2,01
<i>Tryptamide</i>	0,91	2,38	2,48	1,22	1,91	2,45
<i>Tylophorinine</i>	1,61	2,54	2,42	2,89	2,78	2,78
<i>Viridicatin</i>	0,71	2,73	3,50	1,06	2,21	3,31
<i>Viridicatol</i>	1,03	2,12	2,01	1,17	2,27	2,67
<i>Viriditoxin</i>	0,80	0,90	1,60	0,93	1,21	1,49
<i>W493 A</i>	0,86	2,59	2,83	1,10	1,47	2,53
<i>Wortmannin</i>	0,77	1,37	2,84	1,18	2,28	3,85
<i>Wortmannin A</i>	0,75	0,99	1,75	0,97	1,70	3,17
<i>Wortmannin C</i>	0,84	2,34	2,83	1,16	1,31	1,94
<i>Xanthoangelol</i>	0,96	2,13	1,92	1,04	1,66	2,00
<i>Xanthorrhizol</i>	0,84	2,78	3,63	1,22	1,85	3,70

Tabelle 8.4: Daten der γ H2AX-Foci-Analysen von BxPC3- und SU.86.86-Zellen nach Behandlung mit Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin.

Um die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) zu bestimmen, wurde die Anzahl nukleärer S139 phosphorylierten H2AX (γ H2AX) ermittelt. Dazu wurden Pankreaskarzinomzellen (BxPC3 und SU.86.86) für 24 h mit einer Konzentration im Bereich der IC_{50} der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 μ M Cis oder 0,3 μ M Doxo behandelt. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5 zugrunde liegenden Mittelwerte + SEM der Foci-Anzahl pro Zelle ($n = 3$, $N \geq 50$ Zellen). Cis: Cisplatin; Doxo: Doxorubicin; IQ: 5-*epi-Ilimaquinone*, Kon: Kontrolle; NQ: 5-*epi-Nakijiquinone* Q; Nst: Naturstoff; SA: *Secalonic acid F*; γ H2AX: *H2A histone family, member X* an Serin 139 phosphoryliert.

Nst	BxPC3 (24 h)			SU.86.86 (24 h)		
	basal	+Cis	+Doxo	basal	+Cis	+Doxo
Kon	4,83 $\pm 0,70$	14,76 $\pm 2,66$	18,42 $\pm 5,00$	8,26 $\pm 1,42$	44,25 $\pm 4,60$	34,71 $\pm 2,92$
DMSO	5,11 $\pm 1,23$	18,28 $\pm 5,87$	22,99 $\pm 4,33$	7,35 $\pm 0,84$	38,76 $\pm 5,47$	39,47 $\pm 3,47$
SA (3 μ M)	9,77 $\pm 0,66$	12,72 $\pm 1,31$	22,59 $\pm 4,58$	25,26 $\pm 4,43$	42,44 $\pm 7,13$	37,34 $\pm 4,82$
NQ (5 μ M)	18,40 $\pm 4,77$	20,28 $\pm 10,22$	26,11 $\pm 8,67$	44,50 $\pm 9,52$	36,82 $\pm 4,93$	38,57 $\pm 3,44$
IQ (1,5 μ M)	11,06 $\pm 4,02$	11,61 $\pm 2,37$	20,69 $\pm 8,62$	27,67 $\pm 6,89$	58,78 $\pm 4,26$	41,97 $\pm 5,90$

Tabelle 8.5: Daten der 53BP1-Foci-Analysen von BxPC3- und SU.86.86-Zellen nach Behandlung mit Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin.

Um die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) zu bestimmen, wurde die Anzahl nukleärer 53BP1-Foci ermittelt. Dazu wurden Pankreaskarzinomzellen (BxPC3 und SU.86.86) für 24 h mit einer Konzentration im Bereich der IC_{50} der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 μ M Cis oder 0,3 μ M Doxo behandelt. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5 zugrunde liegenden Mittelwerte + SEM der Foci-Anzahl pro Zelle ($n = 3$, $N \geq 50$ Zellen). Cis: Cisplatin; Doxo: Doxorubicin; IQ: 5-*epi-Ilimaquinone*, Kon: Kontrolle; NQ: 5-*epi-Nakijiquinone* Q; Nst: Naturstoff; SA: *Secalonic acid F*.

Nst	BxPC3 (24 h)			SU.86.86 (24 h)		
	basal	+Cis	+Doxo	basal	+Cis	+Doxo
Kon	14,99 $\pm 6,26$	19,40 $\pm 7,21$	22,63 $\pm 4,69$	11,98 $\pm 4,56$	15,37 $\pm 5,44$	16,10 $\pm 5,11$
DMSO	9,08 $\pm 3,19$	12,17 $\pm 2,33$	11,54 $\pm 3,58$	30,71 $\pm 13,79$	24,00 $\pm 9,43$	54,36 $\pm 28,52$
SA (3 μ M)	9,06 $\pm 2,53$	7,81 $\pm 6,90$	15,17 $\pm 3,62$	24,55 $\pm 14,64$	20,01 $\pm 2,72$	21,29 $\pm 3,10$
NQ (5 μ M)	11,15 $\pm 1,02$	19,20 $\pm 8,16$	12,60 $\pm 5,24$	50,95 $\pm 25,07$	23,93 $\pm 5,16$	74,61 $\pm 25,81$
IQ (1,5 μ M)	4,41 $\pm 0,38$	33,29 $\pm 19,26$	24,33 $\pm 7,73$	30,32 $\pm 16,43$	24,86 $\pm 4,48$	38,38 $\pm 9,75$

Tabelle 8.6: Daten der pATM-Foci-Analysen von BxPC3- und SU.86.86-Zellen nach Behandlung mit Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin.

Um die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) zu bestimmen, wurde die Anzahl nukleärer pATM-Foci ermittelt. Dazu wurden Pankreaskarzinomzellen (BxPC3 und SU.86.86) für 24 h mit einer Konzentration im Bereich der IC_{50} der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 μ M Cis oder 0,3 μ M Doxo behandelt. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5 zugrunde liegenden Mittelwerte + SEM der Foci-Anzahl pro Zelle ($n = 3$, $N \geq 50$ Zellen). Cis: Cisplatin; Doxo: Doxorubicin; IQ: 5-*epi*-Ilimaquinone, Kon: Kontrolle; NQ: 5-*epi*-Nakjiquinone Q; Nst: Naturstoff; SA: Secalonic acid F.

Nst	BxPC3 (24 h)			SU.86.86 (24 h)		
	basal	+Cis	+Doxo	basal	+Cis	+Doxo
Kon	2,45 $\pm 0,47$	13,99 $\pm 1,61$	15,89 $\pm 5,06$	3,27 $\pm 1,00$	13,55 $\pm 1,39$	21,53 $\pm 5,19$
DMSO	1,65 $\pm 0,83$	11,60 $\pm 3,74$	19,67 $\pm 3,28$	2,76 $\pm 1,03$	6,32 $\pm 0,27$	12,14 $\pm 3,54$
SA (3 μ M)	6,24 $\pm 0,68$	7,85 $\pm 0,72$	11,24 $\pm 3,92$	7,51 $\pm 2,52$	6,39 $\pm 0,20$	9,88 $\pm 6,15$
NQ (5 μ M)	10,78 $\pm 4,61$	9,05 $\pm 5,05$	17,53 $\pm 8,25$	15,15 $\pm 4,16$	18,60 $\pm 5,91$	24,66 $\pm 4,90$
IQ (1,5 μ M)	4,33 $\pm 1,78$	14,16 $\pm 3,58$	18,34 $\pm 6,04$	4,66 $\pm 2,23$	13,30 $\pm 2,80$	11,85 $\pm 7,55$

Tabelle 8.7: Daten der Comet-Analysen von SU.86.86-Zellen nach Behandlung mit Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin.

Mit Hilfe es alkalischen Comet-Assays wurde die Menge an DNA-Einzelstrangbrüchen (SSBs) bestimmt. Dazu wurden SU.86.86-Zellen für 24 h mit einer Konzentration im Bereich der IC_{50} der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 μ M Cis oder 0,3 μ M Doxo behandelt. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.6 zugrunde liegenden Mittelwerte + SEM der Intensitäten der DNA im Schweif als ($n = 2$, $N = 50$ Zellen). Cis: Cisplatin; Doxo: Doxorubicin; IQ: 5-*epi*-Ilimaquinone, Kon: Kontrolle; NQ: 5-*epi*-Nakjiquinone Q; Nst: Naturstoff; SA: Secalonic acid F.

Nst	SU.86.86 (24 h)		
	basal	+Cis	+Doxo
Kon	1,00	2,19 \pm 0,35	2,88 \pm 0,72
DMSO	1,05 \pm 0,08		
SA (3 μ M)	1,66 \pm 0,51	1,71 \pm 0,80	1,47 \pm 0,36
NQ (5 μ M)	1,42 \pm 0,13	1,82 \pm 0,59	2,35 \pm 0,50
IQ (1,5 μ M)	1,78 \pm 0,32	3,20 \pm 0,63	2,31 \pm 0,44

Tabelle 8.8: Daten des Alamar Blue®-Assay und des daraus resultierenden Kombinationindexes von BxPC3- und SU.86.86-Zellen nach Kombinationsbehandlungen der Naturstoffe mit Cisplatin und Doxorubicin.

Um die Stärke der Kombinationsbehandlungen zu bewerten wurden BxPC3- und SU.86.86-Zellen für 72 h mit Konzentrationskombinationen der Naturstoffe und Cis bzw. Doxo behandelt. Die Konzentrationen liegen im Bereich der IC_{20} , IC_{50} und IC_{80} der jeweiligen Substanz. Mittels Alamar Blue®-Assay wurde die Vitalität bestimmt und der Kombinationsindex wurde mit Hilfe der CompuSyn-Software bestimmt. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.8 zugrunde liegenden Kombinationsindexe der zuvor getesteten Konzentrationen. Es wird zwischen antagonistischen, additiven und synergistischen Effekten unterschieden. Cis: Cisplatin; Doxo: Doxorubicin; IQ: *5-epi-Ilimaquinone*; NQ: *5-epi-Nakijiquinone Q*; SA: *Secalonic acid F*.

Nst	BxPC3 (72 h)		SU.86.86 (72 h)	
	+Cis	+Doxo	+Cis	+Doxo
SA (3 μ M)	0,80	1,10	0,90	1,10
NQ (5 μ M)	0,40	0,90	0,50	0,90
IQ (1,5 μ M)	1,20	0,80	0,90	1,00

Tabelle 8.9: Daten der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalysen von BxPC3-Zellen nach Behandlung mit Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin.

BxPC3-Zellen wurden für 24 und 72 h mit einer Konzentration im Bereich der IC₅₀ der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 µM Cis oder 0,3 µM Doxo behandelt. Anschließend wurde die Zellzyklusverteilung mittels eines Durchflusszytometers ermittelt. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.9 zugrunde liegenden Mittelwerte + SEM in Prozent der gemessene Gesamtzellzahl (n = 3, N = 1) Cis: Cisplatin; Doxo: Doxorubicin; IQ: 5-*epi*-Ilimaquinone, Kon: Kontrolle; NQ: 5-*epi*-Nakijiquinone Q; Nst: Naturstoff; SA: Secalonic acid F.

	BxPC3 (24 h)				BxPC3 (72 h)			
	SubG1 [%]	G ₀ /G ₁ [%]	S [%]	G ₂ /M [%]	SubG1 [%]	G ₀ /G ₁ [%]	S [%]	G ₂ /M [%]
Kon	0,19 ±0,06	59,65 ±2,10	13,25 ±2,02	26,91 ±1,13	0,96 ±0,21	69,17 ±2,73	12,84 ±1,88	17,02 ±3,12
Cis	0,18 ±0,07	44,92 ±4,41	29,00 ±5,96	25,90 ±1,93	4,20 ±1,04	29,08 ±3,42	26,81 ±6,52	39,91 ±5,44
Doxo	0,19 ±0,06	6,81 ±0,48	10,14 ±3,68	82,87 ±4,06	15,04 ±4,87	37,39 ±4,23	22,22 ±3,03	25,36 ±1,57
DMSO	0,14 ±0,06	60,51 ±1,59	13,72 ±2,52	25,63 ±2,94	1,11 ±0,32	71,68 ±2,40	13,04 ±1,95	14,17 ±2,23
DMSO +Cis	0,22 ±0,07	47,12 ±7,53	26,50 ±4,22	26,16 ±6,14	4,12 ±1,01	31,23 ±3,13	28,73 ±7,58	35,92 ±4,09
DMSO +Doxo	0,22 ±0,09	8,51 ±0,85	20,69 ±11,90	70,57 ±12,72	14,11 ±4,19	36,74 ±4,90	26,23 ±4,67	22,91 ±2,45
SA (3 µM)	1,82 ±0,67	53,31 ±4,10	8,92 ±1,69	35,95 ±2,40	12,88 ±3,92	52,41 ±5,61	19,99 ±4,27	14,72 ±1,72
SA +Cis	2,18 ±0,87	54,16 ±4,41	11,00 ±1,60	32,67 ±5,77	28,81 ±9,41	50,81 ±6,56	10,80 ±4,36	9,59 ±4,26
SA +Doxo	1,91 ±0,79	50,04 ±4,97	14,82 ±5,28	33,23 ±10,07	16,76 ±4,14	47,89 ±6,79	19,80 ±3,37	15,55 ±2,86
NQ (5 µM)	0,32 ±0,18	59,48 ±7,26	16,51 ±4,63	23,69 ±3,43	3,83 ±0,84	74,35 ±5,50	10,78 ±1,77	11,04 ±3,61
NQ +Cis	0,66 ±0,33	62,16 ±2,81	16,76 ±3,22	20,42 ±2,54	16,98 ±5,14	64,65 ±5,81	8,37 ±1,73	10,00 ±4,21
NQ +Doxo	0,58 ±0,36	47,42 ±9,83	20,17 ±5,64	31,84 ±4,59	5,46 ±1,05	68,71 ±5,69	12,93 ±2,38	12,90 ±3,77
IQ (1,5 µM)	0,17 ±0,09	54,42 ±3,24	17,49 ±6,03	27,92 ±2,98	0,73 ±0,19	69,23 ±1,98	15,35 ±2,73	14,69 ±2,43
IQ +Cis	0,35 ±0,17	54,22 ±5,51	21,47 ±4,70	24,00 ±3,89	5,83 ±1,81	29,36 ±2,84	26,22 ±5,11	39,88 ±4,89
IQ +Doxo	0,25 ±0,08	22,54 ±8,33	22,45 ±4,50	54,76 ±11,74	12,69 ±3,73	35,06 ±3,60	26,12 ±4,59	26,12 ±4,02

Tabelle 8.10: Daten der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalysen von SU.86.86-Zellen nach Behandlung mit Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin.

SU.86.86-Zellen wurden für 24 und 72 h mit einer Konzentration im Bereich der IC₅₀ der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 µM Cis oder 0,3 µM Doxo behandelt. Anschließend wurde die Zellzyklusverteilung mittels eines Durchflusszytometers ermittelt. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.10 zugrunde liegenden Mittelwerte + SEM in Prozent der gemessene Gesamtzellzahl (n = 3, N = 1) Cis: Cisplatin; Doxo: Doxorubicin; IQ: 5-*epi*-Ilimaquinone, Kon: Kontrolle; NQ: 5-*epi*-Nakijiquinone Q; Nst: Naturstoff; SA: Secalonic acid F.

	SU.86.86 (24 h)				SU.86.86 (72 h)			
	SubG1 [%]	G ₀ /G ₁ [%]	S [%]	G ₂ /M [%]	SubG1 [%]	G ₀ /G ₁ [%]	S [%]	G ₂ /M [%]
Kon	0,80 ±0,41	47,99 ±4,55	19,52 ±3,42	31,70 ±5,76	6,27 ±2,89	57,01 ±7,04	25,56 ±10,61	11,16 ±1,52
Cis	0,59 ±0,31	41,56 ±4,95	26,98 ±3,25	30,88 ±6,83	14,28 ±5,74	37,36 ±3,13	27,22 ±5,86	21,14 ±3,35
Doxo	0,66 ±0,30	24,45 ±3,38	24,81 ±4,33	50,09 ±7,14	18,75 ±6,64	29,26 ±8,16	34,86 ±16,18	17,15 ±3,64
DMSO	0,47 ±0,24	47,74 ±4,57	17,75 ±2,09	34,03 ±5,15	4,46 ±2,48	53,75 ±5,17	27,43 ±8,63	14,36 ±1,57
DMSO +Cis	0,59 ±0,32	45,62 ±2,98	26,97 ±3,25	26,83 ±4,81	13,56 ±4,93	36,29 ±5,53	30,45 ±9,06	19,70 ±2,07
DMSO +Doxo	1,00 ±0,56	20,88 ±3,02	24,07 ±4,35	54,04 ±7,53	17,74 ±5,08	35,74 ±3,37	27,54 ±7,09	18,97 ±2,88
SA (3 µM)	2,07 ±0,94	49,77 ±2,48	14,91 ±2,99	33,25 ±3,24	21,67 ±5,08	41,25 ±4,14	23,29 ±6,76	13,80 ±2,38
SA +Cis	2,03 ±0,85	50,53 ±3,02	16,01 ±2,41	31,42 ±3,28	24,57 ±6,51	43,09 ±2,24	18,64 ±4,87	13,70 ±4,05
SA +Doxo	1,71 ±0,70	49,06 ±2,64	18,45 ±3,65	30,77 ±4,49	24,20 ±6,55	40,42 ±3,17	20,26 ±5,11	15,13 ±4,74
NQ (5 µM)	0,99 ±0,46	63,37 ±7,31	13,56 ±2,29	22,08 ±6,38	19,43 ±5,38	53,12 ±6,78	13,13 ±3,59	14,33 ±7,50
NQ +Cis	0,88 ±0,37	64,99 ±6,44	12,83 ±2,07	21,30 ±5,69	23,70 ±10,21	50,16 ±1,97	16,09 ±5,29	10,05 ±3,03
NQ +Doxo	0,87 ±0,38	63,69 ±6,58	13,67 ±2,49	21,77 ±5,82	20,28 ±5,29	54,22 ±4,86	13,64 ±3,57	11,86 ±5,44
IQ (1,5 µM)	0,78 ±0,44	40,18 ±3,44	25,02 ±2,33	34,03 ±4,60	21,46 ±17,59	43,45 ±5,23	24,14 ±9,91	10,96 ±3,24
IQ +Cis	0,60 ±0,31	51,54 ±6,10	22,89 ±1,19	24,97 ±7,10	12,07 ±3,72	43,10 ±2,54	24,28 ±2,56	20,55 ±2,76
IQ +Doxo	0,49 ±0,22	35,27 ±3,28	31,91 ±3,82	32,33 ±4,90	14,44 ±4,43	34,01 ±3,25	30,52 ±6,09	21,04 ±3,62

Tabelle 8.11: Daten der immunocytochemischen Analysen der Proliferation von BxPC3- und SU.86.86-Zellen nach Behandlung mit Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin.

BxPC3- und SU.86.86-Zellen wurden für 24 h mit einer Konzentration im Bereich der IC₅₀ der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 µM Cis oder 0,3 µM Doxo behandelt. Anschließend wurde die Anzahl an phospho-Histon 3 (pH3) -positiven Zellen nach immunocytochemischer Färbung bestimmt. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.11 zugrunde liegenden Mittelwerte + SEM relativ zur Kontrolle (n = 3, N = 1). Cis: Cisplatin; Doxo: Doxorubicin; IQ: 5-*epi*-Ilimaquinone, Kon: Kontrolle; NQ: 5-*epi*-Nakijiquinone Q; Nst: Naturstoff; SA: Secalonic acid F.

Nst	BxPC3 (24 h)			SU.86.86 (24 h)		
	basal	+Cis	+Doxo	basal	+Cis	+Doxo
Kon	1,00	0,30 ±0,11	0,48 ±0,08	1,00	1,21 ±0,42	1,55 ±0,21
DMSO	0,96 ±0,36	0,24 ±0,07	0,71 ±0,32	0,96 ±0,10	0,51 ±0,18	1,00 ±0,34
SA (3 µM)	0,89 ±0,09	0,45 ±0,02	0,38 ±0,06	2,89 ±0,81	1,20 ±0,47	2,14 ±1,39
NQ (5 µM)	0,41 ±0,13	0,47 ±0,28	0,24 ±0,05	1,15 ±0,23	1,44 ±0,40	1,70 ±0,42
IQ (1,5 µM)	1,13 ±0,33	0,20 ±0,005	0,42 ±0,14	0,90 ±0,17	1,69 ±0,54	0,95 ±0,21

Tabelle 8.12: Daten der Apo-ONE®-Assays von BxPC3-Zellen nach Behandlung mit Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin.

BxPC3-Zellen wurden für 24 h bzw. 72 h mit einer Konzentration im Bereich der IC₅₀ der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 µM Cis oder 0,3 µM Doxo behandelt. Mittels Apo-ONE®-Assay wurde die Caspasenaktivität fluorimetrisch bestimmt. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.12 zugrunde liegenden Mittelwerte + SEM als Vielfaches der Kontrolle. Cis: Cisplatin; Doxo: Doxorubicin; IQ: 5-*epi*-Ilimaquinone, Kon: Kontrolle; NQ: 5-*epi*-Nakijiquinone Q; Nst: Naturstoff; SA: Secalonic acid F.

Nst	BxPC3 (24 h)			BxPC3 (72 h)		
	basal	+Cis	+Doxo	basal	+Cis	+Doxo
Kon	1,00	1,04 ±0,15	0,80 ±0,05	1,00	3,27 ±0,31	8,34 ±0,15
DMSO	0,94 ±0,03			1,07 ±0,07		
SA (3 µM)	4,58 ±0,06	7,17 ±0,24	4,99 ±0,51	3,12 ±0,28	3,29 ±0,43	3,08 ±0,47
NQ (5 µM)	1,30 ±0,17	2,18 ±0,39	1,49 ±0,21	1,23 ±0,37	6,95 ±0,64	1,73 ±0,54
IQ (1,5 µM)	0,96 ±0,02	1,12 ±0,15	0,85 ±0,06	1,02 ±0,07	3,91 ±0,72	5,70 ±0,84

Tabelle 8.13: Daten der Apo-ONE®-Assays von SU.86.86-Zellen nach Behandlung mit Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin.

SU.86.86-Zellen wurden für 24 h bzw. 72 h mit einer Konzentration im Bereich der IC₅₀ der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 µM Cis oder 0,3 µM Doxo behandelt. Mittels Apo-ONE®-Assay wurde die Caspasenaktivität fluorimetrisch bestimmt. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.13 zugrunde liegenden Mittelwerte + SEM als Vielfaches der Kontrolle. Cis: Cisplatin; Doxo: Doxorubicin; IQ: 5-*epi*-Ilimaquinone, Kon: Kontrolle; NQ: 5-*epi*-Nakijiquinone Q; Nst: Naturstoff; SA: Secalonic acid F.

Nst	BxPC3 (24 h)			BxPC3 (72 h)		
	basal	+Cis	+Doxo	basal	+Cis	+Doxo
Kon	1,00	1,34 ±0,09	1,42 ±0,16	1,00	2,07 ±0,64	3,35 ±0,18
DMSO	1,06 ±0,10			1,11 ±0,07		
SA (3 µM)	5,30 ±0,28	1,73 ±1,82	9,47 ±0,54	3,07 ±0,19	2,90 ±0,18	3,00 ±0,11
NQ (5 µM)	2,08 ±0,19	2,90 ±0,14	2,21 ±0,06	1,55 ±0,25	6,55 ±0,58	1,82 ±0,25
IQ (1,5 µM)	1,19 ±0,13	2,04 ±0,46	1,57 ±0,14	0,70 ±0,12	1,16 ±0,14	1,42 ±0,27

Tabelle 8.14: Daten des TEAC-Assays.

Das antioxidative Potenzial der Naturstoffe wurde über den zellfreien Trolox Equivalent Antioxidative Capacity (TEAC)-Assay bestimmt. Dazu wurden die Naturstoffe verdünnt und zu der Arbeitslösung aus ABTS und APS gegeben. Die Abnahme der Absorption, welche auf der Reaktion der Substanzen mit dem grünen Radikalkation beruht, wurde bei einer Wellenlänge von 734 nm gemessen. Der TEAC-Wert ergibt sich aus dem Verhältnis zwischen der Steigung der zu untersuchenden Substanz und der Steigung der Referenzsubstanz Trolox. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.14 zugrunde liegenden Mittelwerte + SEM. ABTS: Diammonium-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonat, APS: Ammoniumpersulfat; IQ: 5-*epi*-Ilimaquinone; Nst: Naturstoff; NQ: 5-*epi*-Nakijiquinone Q; SA: Secalonic acid F.

	TEAC-Wert
Trolox	1,00
DMSO	0,176±0,037
SA	0,487±0,120
NQ	0,061±0,037
IQ	0,050±0,037

Tabelle 8.15: Daten der Southwestern Blot-Analysen zur Bildung von Cis-(1,2-GpG)-DNA-Intrastrangaddukten in BxPC3- und SU.86.86-Zellen nach Behandlung mit den Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin.

BxPC3-Zellen und SU.86.86-Zellen wurden für 24 h in Abwesenheit oder Anwesenheit von Cis mit den Naturstoffen behandelt. Anschließend wurde die Menge an Cis-(1,2-GpG) -DNA-Intrastrangverknüpfungen mit Southwestern Blot-Analysen untersucht. Es erfolgte eine desitometrische Auswertung und die Signalintensität wurde auf die Methylenblaufärbung bezogen. Die Signalintensität der DNA der unbehandelten Kontrolle wurde subtrahiert. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.15 zugrunde liegenden Mittelwerte + SEM relativ zu Cis allein (n = 3; N = 1). Cis: Cisplatin; IQ: 5-epi-Illiciquinone, NQ: 5-epi-Nakijiquinone Q; SA: Secalonic acid F.

	BxPC3 (24 h)	SU.86.86 (24 h)
Cis	1,00	1,00
DMSO+Cis	1,05±0,40	1,43±0,24
SA (3 µM) + Cis	3,01±0,95	7,26±0,71
NQ (5 µM) + Cis	3,15±1,15	5,13±2,03
IQ (1,5 µM) + Cis	1,64±0,41	1,93±0,73

Tabelle 8.16: Daten der durchflusszytometrischen Analysen der intrazellulären Doxorubicinkonzentration in SU.86.86-Zellen.

SU.86.86-Zellen wurden für 24 h mit dem Naturstoff allein oder in Kombination mit Doxo behandelt. Anschließend wurde direkt oder 4 h nach der Behandlung die intrazelluläre Konzentration mittels Durchflusszytometrie analysiert. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.16 zugrunde liegenden Fluoreszenzintensitäten als Mittelwert + SEM (n = 3; N = 1). Doxo: Doxorubicin; IQ: 5-epi-Illiciquinone, NQ: 5-epi-Nakijiquinone Q; SA: Secalonic acid F.

Nst	SU.86.86 (24 h)		
	Eigenfluoreszenz (Nst allein)	Aufnahme (0 h)	Abgabe (+ 4 h)
Kon	1188,05±65,36	5115,00±615,26	2758,49±33,59
DMSO	1188,31±73,62	5436,95±1020,97	2726,05±350,97
SA (3 µM)	1359,15±181,76	6572,43±1345,97	3169,93±59,17
NQ (5 µM)	1322,56±194,09	4647,63±384,90	2814,30±203,01
IQ (1,5 µM)	1224,61±143,63	4409,61±203,13	2986,23±303,30

Tabelle 8.17: Daten des Alamar Blue®-Assays nach 72-stündiger Dauerbehandlung mit SA, NQ und IQ.

HT29-, HCT-116-, NCI-H1975-, MDA-MB-231- und NHDF-Zellen wurden für die Bestimmung des jeweiligen IC₅₀-Wertes für 72 h mit Konzentrationen zwischen 0,1 µM und 100 µM des jeweiligen Naturstoffes (Nst) behandelt. Die Zugabe des Naturstoffes erfolgte 24 h nach Aussaat. Die metabolische Aktivität der Zellen, welche als Maß für die Vitalität dient, wurde mit dem Alamar Blue®-Assay bestimmt. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.17 und Abbildung 3.18 zugrunde liegenden Mittelwerte ± SEM in Prozent der unbehandelten Kontrolle (n=3; N=4).

Konzentration [µM]	HT29 (72 h)		
	SA [%]	NQ [%]	IQ [%]
0	100	100	100
0,1	110,48±5,34	110,16±4,88	101,70±4,61
1	108,86±6,84	147,29±12,03	109,33±2,18
10	34,36±5,66	74,13±5,03	
100	15,16±1,52	4,20±0,33	36,70±10,99

Konzentration [µM]	HCT-116 (72 h)		
	SA [%]	NQ [%]	IQ [%]
0	100	100	100
0,1	96,83±1,93	99,44±1,49	101,12±0,46
1	96,97±1,03	84,65±2,03	99,82±2,47
10	2,81±0,56	20,70±1,02	60,93±16,63
100	2,16±0,67	0,57±0,11	9,92±5,55

Konzentration [µM]	MDA-MB-231 (72 h)		
	SA [%]	NQ [%]	IQ [%]
0	100	100	100
0,1	92,03±2,49	82,90±11,73	94,45±2,82
1	91,62±2,52	75,50±2,32	94,01±1,86
10	88,40±1,20	48,55±0,90	89,99±2,89
100	16,42±1,36	8,09±0,35	62,26±5,30

Konzentration [µM]	NCI-H1975 (72 h)		
	SA [%]	NQ [%]	IQ [%]
0	100	100	100
0,1	95,50±0,57	99,38±2,81	97,75±1,40
1	93,39±0,27	78,50±11,62	96,42±0,72
10	13,09±1,69	32,00±4,26	75,11±306
100	6,03±0,78	0,75±0,18	10,36±2,31

Konzentration [μM]	NHDF (72 h)		
	SA [%]	NQ [%]	IQ [%]
0	100	100	100
0,1	96,29 \pm 1,38	92,97 \pm 8,14	96,16 \pm 2,93
1	95,65 \pm 0,89	80,18 \pm 3,99	96,70 \pm 3,14
10	97,71 \pm 1,39	37,49 \pm 1,71	83,56 \pm 5,89
100	18,44 \pm 4,79	22,33 \pm 0,44	40,71 \pm 6,08

Tabelle 8.18: Daten der γH2AX -, 53BP1- und pATM-Foci-Analysen von NHDF-Zellen nach Behandlung mit Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin.

Um die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) zu bestimmen, wurde die Anzahl nukleärer γH2AX -, 53BP1- und pATM-Foci ermittelt. Dazu wurden NHDF-Zellen für 24 h mit einer Konzentration im Bereich der IC_{50} der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 μM Cis oder 0,3 μM Doxo behandelt. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.20 zugrunde liegenden Mittelwerte + SEM der Foci-Anzahl pro Zelle ($n = 3$, $N \geq 50$ Zellen). Cis: Cisplatin; Doxo: Doxorubicin; IQ: 5-*epi*-Ilimaquinone, Kon: Kontrolle; NQ: 5-*epi*-Nakijiquinone Q; Nst: Naturstoff; p: phospho-; SA: Secalonic acid F; γH2AX : H2A histone family, member X an Serin 139 phosphoryliert.

Nst	γH2AX -Foci			53BP1-Foci			pATM-Foci		
	basal	+Cis	+Doxo	basal	+Cis	+Doxo	basal	+Cis	+Doxo
Kon	3,95 \pm 1,41	16,06 \pm 4,06	27,12 \pm 5,50	5,92 \pm 2,16	11,35 \pm 2,54	15,02 \pm 2,15	2,02 \pm 0,39	3,83 \pm 1,69	7,44 \pm 2,95
DMSO	3,12 \pm 0,20	16,94 \pm 3,70	32,15 \pm 5,68	7,79 \pm 2,55	16,30 \pm 0,18	16,06 \pm 1,92	0,77 \pm 0,24	4,44 \pm 1,46	12,01 \pm 1,85
SA (3 μM)	9,34 \pm 2,28	16,11 \pm 3,99	30,11 \pm 6,85	6,06 \pm 2,39	10,73 \pm 4,14	11,79 \pm 1,35	2,16 \pm 0,87	4,78 \pm 3,20	13,90 \pm 3,45
NQ (5 μM)	12,83 \pm 2,41	19,12 \pm 4,36	29,83 \pm 2,52	9,10 \pm 1,26	8,95 \pm 0,78	7,36 \pm 1,79	6,05 \pm 2,12	3,21 \pm 0,67	12,88 \pm 5,05
IQ (1,5 μM)	4,60 \pm 1,36	17,88 \pm 3,90	26,87 \pm 2,50	2,33 \pm 1,01	9,07 \pm 2,43	10,95 \pm 0,38	1,62 \pm 0,72	3,69 \pm 1,04	17,60 \pm 2,67

Tabelle 8.19: Daten des Alamar Blue®-Assay und des daraus resultierenden Kombinationindexes von NHDF-Zellen nach Kombinationsbehandlungen der Naturstoffe mit Cisplatin und Doxorubicin.

Um die Stärke der Kombinationsbehandlungen zu bewerten wurden NHDF-Zellen für 72 h mit Konzentrationskombinationen der Naturstoffe und Cis bzw. Doxo behandelt. Die Konzentrationen liegen im Bereich der IC_{20} , IC_{50} und IC_{80} der jeweiligen Substanz. Mittels Alamar Blue®-Assay wurde die Vitalität bestimmt und der Kombinationsindex wurde mit Hilfe der CompuSyn-Software bestimmt. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.21 zugrunde liegenden Kombinationsindexe der zuvor getesteten Konzentrationen. Es wird zwischen antagonistischen, additiven und synergistischen Effekten unterschieden. Cis: Cisplatin; Doxo: Doxorubicin; IQ: *5-epi-Illimaquinone*; NQ: *5-epi-Nakijiquinone Q*; SA: *Secalonic acid F*.

	NHDF (72 h)	
	+Cis	+Doxo
SA (3 μ M)	3,80	1,60
NQ (5 μ M)	0,70	1,30
IQ (1,5 μ M)	5,80	1,70

Tabelle 8.20: Daten der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalysen von NHDF-Zellen nach Behandlung mit Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin.

NHDF-Zellen wurden für 24 und 72 h mit einer Konzentration im Bereich der IC₅₀ der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 µM Cis oder 0,3 µM Doxo behandelt. Anschließend wurde die Zellzyklusverteilung mittels eines Durchflusszytometers ermittelt. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.22 zugrunde liegenden Mittelwerte + SEM in Prozent der gemessene Gesamtzellzahl (n = 3, N = 1) Cis: Cisplatin; Doxo: Doxorubicin; IQ: 5-*epi*-Ilimaquinone, Kon: Kontrolle; NQ: 5-*epi*-Nakijiquinone Q; Nst: Naturstoff; SA: Secalonic acid F.

	NHDF (24 h)				NHDF (72 h)			
	SubG1 [%]	G ₀ /G ₁ [%]	S [%]	G ₂ /M [%]	SubG1 [%]	G ₀ /G ₁ [%]	S [%]	G ₂ /M [%]
Kon	0,17 ±0,07	82,95 ±3,01	4,93 ±0,60	11,95 ±2,69	0,26 ±0,08	83,62 ±3,29	6,02 ±2,29	10,10 ±1,13
Cis	0,13 ±0,07	53,89 ±7,75	11,51 ±2,61	34,46 ±7,18	0,49 ±0,16	56,53 ±1,97	7,07 ±1,95	35,90 ±3,98
Doxo	0,16 ±0,07	64,21 ±7,49	11,10 ±1,81	24,53 ±7,78	2,70 ±1,03	59,88 ±7,75	14,15 ±3,99	23,27 ±5,32
DMSO	0,12 ±0,06	83,11 ±3,22	4,87 ±1,29	11,90 ±2,92	0,33 ±0,08	84,64 ±3,83	5,60 ±3,00	9,42 ±1,13
DMSO +Cis	0,13 ±0,06	56,34 ±5,58	10,32 ±2,65	33,21 ±4,16	0,56 ±0,11	61,38 ±3,19	5,87 ±1,42	32,19 ±4,58
DMSO +Doxo	0,13 ±0,11	71,53 ±1,66	8,74 ±0,68	19,60 ±2,45	2,69 ±0,99	60,65 ±6,70	14,18 ±5,35	22,49 ±3,71
SA (3 µM)	0,05 ±0,03	84,35 ±4,99	5,97 ±2,25	9,63 ±2,76	0,38 ±0,21	86,48 ±2,87	3,94 ±1,41	9,20 ±1,60
SA +Cis	0,14 ±0,06	58,23 ±4,93	11,64 ±2,27	29,98 ±4,31	0,65 ±0,22	60,47 ±3,39	8,32 ±3,81	30,56 ±4,65
SA +Doxo	0,22 ±0,08	66,25 ±6,46	11,88 ±2,35	21,66 ±5,74	2,59 ±0,91	62,42 ±5,53	14,48 ±4,79	20,51 ±2,73
NQ (5 µM)	0,22 ±0,14	84,93 ±4,46	6,64 ±1,68	8,22 ±2,89	3,01 ±1,76	83,11 ±2,62	5,04 ±1,59	8,85 ±1,37
NQ +Cis	0,26 ±0,17	84,55 ±3,62	6,71 ±1,20	8,49 ±2,59	4,12 ±2,33	80,19 ±3,91	5,76 ±1,91	9,93 ±0,80
NQ +Doxo	0,31 ±0,18	72,76 ±2,71	8,87 ±0,77	18,05 ±2,60	7,05 ±4,15	69,75 ±1,39	10,98 ±2,14	12,21 ±3,98
IQ (1,5 µM)	0,10 ±0,04	80,49 ±3,94	6,72 ±1,70	12,70 ±3,24	0,33 ±0,12	84,84 ±3,58	5,27 ±2,43	9,56 ±1,16
IQ +Cis	0,10 ±0,03	57,71 ±6,81	11,96 ±2,55	30,24 ±5,75	0,59 ±0,14	49,44 ±6,32	6,32 ±1,19	43,65 ±7,53
IQ +Doxo	0,21 ±0,09	65,55 ±7,44	9,37 ±1,42	24,87 ±7,02	2,63 ±1,02	61,37 ±4,38	15,27 ±5,86	20,73 ±2,81

Tabelle 8.21: Daten der Apo-ONE®-Assays von NHDF-Zellen nach Behandlung mit Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin oder Doxorubicin.

NHDF-Zellen wurden für 24 h bzw. 72 h mit einer Konzentration im Bereich der IC₅₀ der ausgewählten Naturstoffe allein oder in Kombination mit 5 µM Cis oder 0,3 µM Doxo behandelt. Mittels Apo-ONE®-Assay wurde die Caspasenaktivität fluorimetrisch bestimmt. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.23 zugrunde liegenden Mittelwerte + SEM als Vielfaches der Kontrolle. Cis: Cisplatin; Doxo: Doxorubicin; IQ: *5-epi-Illimaquinone*, Kon: Kontrolle; NQ: *5-epi-Nakijiquinone Q*; Nst: Naturstoff; SA: *Secalonic acid F*.

Nst	NHDF (24 h)			NHDF (72 h)		
	basal	+Cis	+Doxo	basal	+Cis	+Doxo
Kon	1,00	0,85 ±0,09	1,31 ±0,04	1,00	0,98 ±0,14	1,26 ±0,23
DMSO	0,99 ±0,02			0,95 ±0,04		
SA (3 µM)	0,92 ±0,04	0,90 ±0,06	1,41 ±0,02	0,90 ±0,04	1,09 ±0,08	1,37 ±0,04
NQ (5 µM)	1,12 ±0,15	1,20 ±0,15	2,83 ±0,32	1,19 ±0,13	1,25 ±0,10	3,21 ±1,17
IQ (1,5 µM)	0,94 ±0,02	0,84 ±0,09	1,41 ±0,14	0,97 ±0,02	1,18 ±0,16	1,40 ±0,04

Tabelle 8.22: Daten der Southwestern Blot-Analysen zur Bildung von Cis-(1,2-GpG)-DNA-Intrastrangaddukten in NHDF-Zellen nach Behandlung mit den Naturstoffen allein oder in Kombination mit Cisplatin.

NHDF-Zellen wurden für 24 h in Abwesenheit oder Anwesenheit von Cis mit den Naturstoffen behandelt. Anschließend wurde die Menge an Cis-(1,2-GpG) -DNA-Intrastrangverknüpfungen mit Southwestern Blot-Analysen untersucht. Es erfolgte eine desitometrische Auswertung und die Signalintensität wurde auf die Methylenblaufärbung bezogen. Die Signalintensität der DNA der unbehandelten Kontrolle wurde subtrahiert. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.24 zugrunde liegenden Mittelwerte + SEM relativ zu Cis allein (n = 3; N = 1). Cis: Cisplatin; IQ: *5-epi-Illimaquinone*, NQ: *5-epi-Nakijiquinone Q*; SA: *Secalonic acid F*.

Nst	NHDF (24 h)
Cis	1,00
DMSO+Cis	1,34±0,27
SA (3 µM) + Cis	1,06±0,33
NQ (5 µM) + Cis	1,83±0,72
IQ (1,5 µM) + Cis	1,45±0,83

Tabelle 8.23: Daten des Alamar Blue® Assays nach 72-stündiger Dauerbehandlung mit SA, NQ und IQ in primären Rattenhepatozyten.

Primäre Rattenhepatozyten wurden für 24 h (B) und 48 h (B) mit dem Naturstoff allein oder in der Kombination mit Cis bzw. Doxo behandelt. Die Zugabe erfolgte 24 h nach Aussaat. Die metabolische Aktivität der Zellen, welche als Maß für die Vitalität dient, wurde mit dem Alamar Blue®-Assay bestimmt. Aufgelistet sind die der Abbildung 3.25 zugrunde liegenden Mittelwerte + SEM in Prozent der unbehandelten Kontrolle (n = 1-3; N = 4). Cis: Cisplatin; IQ: 5-epi-Illimaquinone, MMS: Methylmethansulfonat; NQ: 5-epi-Nakijiquinone Q; SA: Secalonic acid F.

Nst	Primäre Rattenhepatozyten (24 h)			Primäre Rattenhepatozyten (48 h)		
	basal	+Cis	+Doxo	basal	+Cis	+Doxo
Kon	100	95,25 ±3,36	101,40 ±2,52	100	91,02 ±2,86	102,93 ±3,57
DMSO	108,89 ±4,08	96,09 ±0,82	99,56 ±6,66	102,89 ±4,67	97,94 ±3,93	104,49 ±8,72
SA (3 µM)	90,90 ±25,12	81,34 ±18,06	90,65 ±26,81	73,25 ±8,40	63,37 ±8,36	88,92 ±5,85
NQ (5 µM)	113,65 ±2,32	96,05 ±2,57	101,02 ±2,27	83,44 ±16,12	95,92 ±8,84	100,71 ±4,76
IQ (1,5 µM)	102,50 ±3,58	97,12 ±3,66	108,23 ±2,51	94,29 ±10,34	98,11 ±3,29	95,40 ±14,20
MMS (2 mM)	0,84 ±0,24			1,62 ±0,33		

8.3 Publikationen und Kongressbeiträge

Aus Prioritätsgründen wurden Teile dieser Arbeit bereits publiziert.

8.3.1 Liste der Publikationen

van Stuijvenberg, J., *et al.* (2020).

"Targeting the DNA damage response (DDR) by natural compounds." *Bioorg Med Chem* 28(4): 115279.

8.3.2 Liste der Kongressteilnahmen

8.3.2.1 Posterpräsentationen

van Stuijvenberg, J., Proksch, P. und Fritz, G.

Targeting mechanisms of the DNA damage response (DDR) to overcome anticancer drug resistance of tumor cells. 85. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT), Stuttgart, Februar 2019

van Stuijvenberg, J., Proksch, P. und Fritz, G.

Targeting mechanisms of the DNA damage response by natural compounds. 67th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), Innsbruck, September 2019
Posterpreis

van Stuijvenberg, J., Proksch, P. und Fritz, G.

DNA damage response (DDR) as a target of natural compounds. 3. GRK2158 Symposium "Natural compounds and analogs against therapy resistant tumours and microorganisms"; Düsseldorf, Mai 2019

van Stuijvenberg, J., Proksch, P. und Fritz, G.

Natural compounds as a source of new anticancer agents targeting mechanisms of the DNA damage response. 86. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT), Stuttgart, März 2020

8.3.2.2 Vorträge

van Stuijvenberg, J., Proksch, P. und Fritz, G.

Identification of DDR-modulating natural compounds for the treatment of therapy-resistant tumor cells. 1. GRK2158 Symposium "Natural compounds and analogs against therapy resistant tumours and microorganisms"; Düsseldorf, September 2017

van Stuijvenberg, J., Proksch, P. und Fritz, G.

Targeting mechanisms of DNA damage response (DDR) to overcome anticancer drug resistance of tumor cells. 2. GRK2158 Symposium "Natural compounds and analogs against therapy resistant tumours and microorganisms"; Peking, September 2018

Danksagung

Schreiben musste ich diese Arbeit zwar allein – doch an ihrem guten Gelingen beteiligt waren jede Menge mir nahestehender Menschen, denen ich Dank schulde.

Allen voran möchte ich Herrn Prof. Fritz für die Möglichkeit danken, diese Dissertation in seinem Institut anfertigen zu dürfen. Vor allem bedanke ich mich für die lehrreichen Gespräche, die Möglichkeit über mich hinaus zu wachsen und seine beharrlichen Anstrengungen zur Publikation meiner Daten.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herrn Prof. Proksch für die Übernahme des Zeitgutachtens und die Möglichkeit an einem Symposium in Peking teilzunehmen.

Darüber hinaus möchte ich dem Graduiertenkolleg 2158 und der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) danken. Neben der finanziellen Unterstützung der vorliegenden Arbeit bot mir das GRK2158 nicht nur einen interdisziplinären Austausch, sondern auch diverse Einblicke in die präklinische Wirkstoffforschung.

Ich möchte allen Toxis für die schönen letzten Jahre bedanken. Danke für die nette Aufnahme, das angenehme Arbeitsklima und die Hilfe bei allen theoretischen und praktischen Fragen. Bei einigen möchte ich mir hier noch einmal persönlich (in alphabetischer Reihenfolge) bedanken:

Annabelle – Du warst die magischste Masterstudentin, die ich mir vorstellen und wünschen konnte! Es ist schön, wenn man sich ohne Worte versteht und über die gleichen Dinge aufregen kann.

Claudi – Danke für deine Hilfe in jeglicher Situation! Bist du BEREIT für die nächsten Experimente?

Kathi – Liebste Kathi, ich danke dir für die ganze Mühe, die du mit mir in diese Arbeit gesteckt hast. Die wissenschaftlichen Diskussionen waren ravencl-AWESOME!

Juli – Liebste neue Büropartnerin, ich danke dir für jedes laute Lachen, dass man über den ganzen Flur hört!

Lena – Lenus, ich danke dir für deine Unterstützung im Hitzebunker. You're slyther-INCREDIBLE!

Pohli – Liebste Pohli, ich danke dir für all die Ohrwürmer! *Ja der Mais, ja der Mais, ja der Mais marschier...*

Ronja – Ronnie, danke für alles im und außerhalb des Labors. Es ist mir immer eine Freude. You're gryffindorable!

Sarah aka. Täubchen – Liebstes Täubchen, ich danke dir für alles. Du darfst gerne wieder ein paar Tage bei mir wohnen, wenn das nächste Parookaville ansteht. *Madness, love and pure happiness!*

Verena – Danke, dass ich so viel von dir lernen durfte!

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie: Danke für eure Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Danke, dass ich durch euch weiß, was Liebe ist oder Freundschaft. Danke, dass ihr mir immer wieder aufs Neue zeigt, was wirklich zählt und dass es wesentlich wichtigere Dinge als einen erfolgreichen Versuch gibt. Auch wenn mein Ehrgeiz mich mal wieder packt, weiß ich das tief in meinem Herzen!

Anke, Kerstin – Danke für die unermüdliche Mühen bei der Korrektur dieser Arbeit.

Miri, Kim – Einfach nur Danke, dass es euch gibt!

Ein besonderer Dank gilt meinem Mann **Daniel** (ich muss zugeben, das hört sich immer noch verrückt an!). Danke, dass du mich immer wieder motiviert hast und mir gezeigt hast, dass mit Optimismus alles besser ist! Danke, dass du mir immer den Mut gibst, ich selbst zu sein. Ohne dich hätte ich das niemals geschafft. Was würde Harry Potter sagen? Wir sind nur so stark, wie wir vereint sind und so schwach, wie wir getrennt sind.

Widmen möchte ich diese Arbeit meinem Papa! Danke, dass du mir die Wissenschaft immer nah gebracht hast. Wie lautet das 11. Gebot? Du sollst dich nicht verblüffen lassen! Mama, Papa - Danke, dass ihr mir immer das Gefühl gegeben habt, etwas Besonderes zu sein.

DANKE!

PS: **Marvin** – du hattest Recht! Die 30 naht ;)

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die hier vorliegende Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Diese Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form, abgesehen von den angegebenen Publikationen, noch bei keiner anderen Institution eingereicht oder veröffentlicht. Ich habe keinen anderen Promotionsversuch unternommen.

Düsseldorf, den 13.04.2021

Jana Aengenvoort