

Aus dem Institut für Toxikologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Leiter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Fritz

**IN VITRO-UNTERSUCHUNGEN ZUR MOLEKULAREN WIRKUNG  
VON CISPLATIN UND EINEM CHECKPOINTKINASE-INHIBITOR  
AUF MEDULLOBLASTOMZELLEN MIT UND OHNE C-MYC-  
AMPLIFIKATION SOWIE IHRE WIRKUNG AUF PRIMÄRE  
RATTENNEURONE UND GLIAZELLEN**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Katharina Geist

2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Fritz

Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka

**Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:**

Kruger K, Geist K, Stuhldreier F, Schumacher L, Blumel L, Remke M, et al. Multiple DNA damage-dependent and DNA damage-independent stress responses define the outcome of ATR/Chk1 targeting in medulloblastoma cells. *Cancer Lett.* 2018; 430:34-46.

## Zusammenfassung

Das Medulloblastom ist der häufigste bösartige Hirntumor im Kindesalter. Ein gängiges Chemotherapeutikum in der Medulloblastomtherapie ist das Zytostatikum Cisplatin. Medulloblastome der Gruppe 3 mit c-Myc-Amplifikation haben bis heute eine schlechte Prognose. Die c-Myc-Amplifikation kann zu replikativem Stress in Zellen führen, der wiederum über den Checkpointkinase-1-Signalweg reduziert werden kann. Dies stellt einen möglichen Ansatzpunkt für den Einsatz von Checkpointkinase 1 (Chk1)-Inhibitoren dar. In dieser Arbeit sollte analysiert werden, ob der Chk1-Inhibitor AZD-7762 Medulloblastomzellen für eine Cisplatintherapie sensibilisieren kann und ob die Viabilität von primären Neuronen und Gliazellen durch die zytotoxischen Effekte von Cisplatin und AZD-7762 beeinflusst wird. Dafür wurde der Effekt des Zytostatikums Cisplatin und von AZD-7762 einzeln und in Kombination auf zwei verschiedene Medulloblastomzellen (mit und ohne c-Myc-Amplifikation) sowie auf primäre Neurone und Gliazellen untersucht. Dazu erfolgten nach der Behandlung der Zellen die Messungen von Zellviabilität, Zellzyklusverteilung, induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen und Aktivierung der DNA-Schadensantwort. Die Untersuchungen zeigten, dass Cisplatin in den beiden Medulloblastomzellen sowie in den primären Neuronen und Gliazellen zu einem dosisabhängigen Viabilitätsverlust führte. In den Tumorzellen induzierte Cisplatin einen S-Phase-Arrest, eine Aktivierung der DNA-Schadensantwort, eine Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) und Apoptose. Der Chk1-Inhibitor AZD-7762 schädigte ebenfalls beide Medulloblastomzellen. Um den gleichen Viabilitätsverlust in der c-Myc-amplifizierten-Zelllinie zu erzielen, wurden im Vergleich zur nicht c-Myc-amplifizierten Zelllinie zehnfach niedrigere AZD-7762 Konzentrationen benötigt. Eine AZD-7762-Vorbehandlung konnte beide Medulloblastomzellen signifikant für eine Cisplatinbehandlung sensibilisieren. Die c-Myc-amplifizierte Zelllinie reagierte hierbei deutlich sensibler auf eine Chk1-Inhibition. Cisplatin induzierte zudem einen weitaus stärkeren Viabilitätsverlust in primären Neuronen als AZD-7762. Dies lässt auf einen neuen Therapieansatz in der Behandlung von Medulloblastomen hoffen. Daher stellt die Entwicklung neuer antitumorigen wirksamer Chk-Inhibitoren mit günstigem Nebenwirkungsprofil einen vielversprechenden Ansatz für weiterführende *in vivo*-Analysen sowie anschließende klinische Studien dar.

## Summary

Medulloblastoma is the most common malignant brain tumor in childhood. A regular chemotherapeutic agent in medulloblastoma therapy is cisplatin. Group 3 medulloblastomas with c-Myc amplification still have a poor prognosis. The c-Myc amplification can lead to replicative stress in cells, which in turn can be reduced by the checkpoint kinase 1 signaling pathway. This represents a possible attempt for the use of checkpoint kinase 1 (Chk1) inhibitors. The aim of this work was to analyze whether the Chk1 inhibitor AZD-7762 can sensitize medulloblastoma cells for a cisplatin therapy and whether the viability of primary neurons and glial cells is influenced by the cytotoxic effects of cisplatin and AZD-7762. For this purpose, the effect of the cytostatic agent cisplatin and AZD-7762 was investigated individually and in combination on two different medulloblastoma cells (with and without c-Myc amplification) as well as on primary neurons and glial cells. Therefore, cell viability, cell cycle distribution, induced DNA double-strand breaks and the activation of the DNA damage response were measured after cell treatment. The investigations showed that cisplatin induced a dose-dependent loss of viability in the two medulloblastoma cells, as well as in the primary neurons and glial cells. In the tumor cells, cisplatin induced S-phase arrest, the activation of the DNA damage response, the induction of DNA double-strand breaks (DSB) and apoptosis. The Chk1 inhibitor AZD-7762 also damaged both medulloblastoma cells. In order to achieve the same loss of viability, ten times lower AZD-7762 concentrations were required for the treatment of the c-Myc amplified cell line than those for the non-c-Myc-amplified cell line. AZD-7762 pretreatment could significantly sensitize both medulloblastoma cells to cisplatin treatment. The c-Myc-amplified cell line reacts clearly more sensitively to Chk1 inhibition. Cisplatin also induces a far greater loss of viability in primary neurons than AZD-7762. The fact that Chk1 inhibition showed only minor cytotoxic effects on primary cells, gives hope for a new therapeutic approach in the treatment of medulloblastomas. Therefore, the development of new anti-tumor effective Chk inhibitors with a favorable side effect profile represents a promising approach for further in vivo analysis and subsequent clinical studies.

## Abkürzungsverzeichnis

53BP1	P53-bindendes Protein 1
% (v/v)	<i>volume-volume percentage</i> ; Volumenprozent
% (w/v)	<i>mass-volume percentage</i> ; Gewichtsprozent
ANOVA	<i>analysis of variance</i> ; Varianzanalyse
APS	Ammoniumpersulfat
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i> ; Serin/Threonin-Proteinkinase
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related, FRAP-related protein 1</i> ; Serin/Threonin-Proteinkinase
BSA	Bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
Cdc2	<i>Cell division cycle 2</i> ; Cyclin-abhängige Kinase Cdc2 (auch <i>cyclin-dependent kinase 1</i> , Cdk1)
Cdc25	<i>cell division cycle 25</i> ; Phosphatase
CdK	<i>Cyclin dependent kinase</i> ; Cyclin-abhängige Kinase
Chk	Checkpointkinase
CisPt	Cisplatin ( <i>cis</i> -Diammindichloridoplatin(II))
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDR	<i>DNA damage response</i> ; DNA Schadensantwort
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DSB	Doppelstrangbruch
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> ; verstärkte Chemilumineszenz
EdU	5-Ethynyl-2'-desoxyuridin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinases</i> , extrazellulär regulierte Kinase; Serin/Threonin-Proteinkinase
et al.	<i>et alii</i> ; und andere
FCS	<i>fetal calf serum</i> ; fötales Kälberserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> ; Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde der Vereinigten Staaten
G <sub>0</sub> -Phase	<i>gap 0-Phase</i> ; Ruhephase des Zellzyklus
G <sub>1</sub> -Phase	<i>gap 1-Phase</i> ; postmitotische Phase des Zellzyklus
G <sub>2</sub> -Phase	<i>gap 2-Phase</i> ; prämitotische Phase des Zellzyklus
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GpG	Guanin-Guanin
H <sub>2</sub> AX	<i>H<sub>2</sub>A histone family member X</i> ; Histonvariante der H <sub>2</sub> A Histonfamilie
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H3	Histon 3
HCl	Salzsäure
HCT-116-Zellen	humane Zellen eines Kolorektalen Adenokarzinoms

HD-MB03	humane Medulloblastomzelllinie der Gruppe 3
HeLa-Zellen	menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
hOCT	<i>human organic cation transporter</i> ; menschlicher organischer Kationentransporter
IC <sub>50</sub>	<i>inhibitory concentration 50 %</i> ; inhibitorische Konzentration 50 %
IC <sub>80</sub>	<i>inhibitory concentration 80 %</i> ; inhibitorische Konzentration 80 %
KAP1	<i>KRAB-associated protein-1</i> ; KRAB-assoziiertes Protein-1
KCL	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
LDH	Laktatdehydrogenase
M-Phase	Mitosephase des Zellzyklus
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> ; Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Myc	Myelocytomatose-Onkogen
n	Anzahl der biologischen Replikate
N	Anzahl der technischen Replikate pro biologisches Replikat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
p-	phospho-
P38	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
P53	Tumorsuppressorprotein
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> ; Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	PBS mit 0,3 % Triton X-100
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PI	Propidiumiodid
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i> ; reaktive Sauerstoffspezies
RPA	Replikationsprotein A
RPMI	Zellkulturmedium entwickelt am <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RSR	<i>Replication-Stress-Response</i> ; Replikations-Stress-Reaktion
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SHH	Sonic Hedgehog
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
ssDNA	<i>single-stranded DNA</i> ; Einzelstrang-DNA
TBS	<i>tris buffered saline</i> ; Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	TBS mit Tween 20
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
U2OS-Zellen	Humane Osteosarkom-Zellen
UV	ultraviolett
UW228-2	humane Medulloblastomzelllinie
VE-822	ATM/ATR-Inhibitor

vs.  
WHO  
Wee1  
WNT

versus  
*World Health Organization; Weltgesundheitsorganisation*  
*Mitosis inhibitor protein kinase; Serin/Threonin-Proteinkinase*  
*wingless, Int-1; Signaltransduktionsweg*

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>IX</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>X</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Medulloblastom .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Einteilung.....	1
1.1.2 Prognose und Risikostratifizierung.....	3
1.1.2.1 Ungünstige prognostische Faktoren.....	3
1.1.2.2 Risikostratifizierung.....	4
1.1.3 Therapie.....	5
<b>1.2 Der Zellzyklus .....</b>	<b>7</b>
1.2.1 Zellzykluskontrolle .....	8
1.2.1.1 Chk1 in der DNA-Schadensantwort .....	9
1.2.1.2 C-Myc in der DNA-Schadensantwort.....	13
<b>1.3 Cisplatin .....</b>	<b>14</b>
1.3.1 Aufbau und Wirkung.....	15
1.3.2 Nebenwirkungen .....	16
1.3.2.1 Nephrotoxizität.....	17
1.3.2.2 Neurotoxizität.....	19
<b>1.4 Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>22</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>24</b>
2.1.1 Zelllinien .....	24
2.1.2 Medien und Medienzusätze.....	24
2.1.3 Chemikalien.....	24
2.1.4 Lösungen und Puffer .....	25
2.1.5 Verbrauchsmaterialien .....	28
2.1.6 Antikörper .....	28
2.1.6.1 Primärantikörper .....	28
2.1.6.2 Sekundärantikörper.....	29
2.1.7 Enzyme.....	29
2.1.8 Kits .....	30
2.1.9 Geräte.....	30
2.1.10 Software .....	31
2.1.11 Sonstige Materialien .....	31
2.1.12 Herstellernachweise.....	32
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>33</b>
2.2.1 Zellkultivierung .....	33
2.2.2 Präparation primärer Neurone und Gliazellen aus Rattenembryonen.....	34
2.2.2.1 Kultivierung der Gliazellen .....	34
2.2.2.2 Kultivierung der hippocampalen Neurone .....	35
2.2.3 Alamar Blue-Assay .....	36
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden .....	36
2.2.4.1 Proteinisolierung und Western Blot.....	36

2.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	37
2.2.4.3 Western Blot Analyse .....	37
2.2.5 Untersuchungen zur Zellzyklusverteilung.....	38
2.2.5.1 Durchflusszytometrie.....	38
2.2.5.2 Immunzytochemie: Bestimmung des mitotischen Index .....	39
2.2.5.3 EdU-Zellproliferationsassay .....	40
2.2.6 Ko-Lokalisation von $\gamma$ H2AX- und 53BP1-Foci zur Analyse von DNA-Schäden .....	41
2.2.7 Statistische Auswertung .....	42
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Wachstumsverhalten der beiden Medulloblastomzelllinien .....</b>	<b>43</b>
<b>3.2 Cisplatin induziert einen dosisabhängigen Viabilitätsverlust in Medulloblastomzellen. ....</b>	<b>44</b>
<b>3.3 Cisplatin induziert einen S-Phase-Arrest in Medulloblastomzellen .....</b>	<b>46</b>
3.3.1 Durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus nach Cisplatinbehandlung .....	46
3.3.2 Immunzytochemische Färbungen zur Bestimmung der mitotischen Aktivität von Medulloblastomzellen nach Behandlung mit Cisplatin.....	49
<b>3.4 Cisplatin induziert DNA-Doppelstrangbrüche und aktiviert die DNA-Schadensantwort. ....</b>	<b>52</b>
3.4.1 Cisplatin induziert DNA-Doppelstrangbrüche in Medulloblastomzellen.....	53
3.4.2 Cisplatin induziert die Aktivierung der DNA-Schadensantwort in zwei Medulloblastomzelllinien.....	54
<b>3.5 Chk1-Inhibition induziert einen dosisabhängigen Viabilitätsverlust in   Medulloblastomzellen .....</b>	<b>56</b>
<b>3.6 Chk1-Inhibition sensibilisiert Medulloblastomzellen gegenüber einer   Cisplatinbehandlung .....</b>	<b>59</b>
3.6.1 Chk1-Hemmung sensibilisiert Medulloblastomzellen für den Cisplatin-induzierten Viabilitätsverlust.....	59
3.6.2 Chk1-Inhibierung verstärkt die durch Cisplatin-induzierte Bildung von Doppelstrangbrüchen in Medulloblastomzellen.....	61
3.6.3 Chk1-Inhibition verstärkt die Cisplatin-induzierte Aktivierung der DNA-Schadensantwort in Medulloblastomzellen .....	65
<b>3.7 Einfluss von Cisplatin und AZD-7762 auf hippocampale Neurone und Gliazellen.....</b>	<b>67</b>
3.7.1 Isolation von primären Neuronen und Gliazellen aus Rattenembryonen und fluoreszenzmikroskopische Identifizierung der hippocampalen Neurone.....	68
3.7.2 Cisplatin führt im Gegensatz zur Chk1-Inhibition zu einem dosisabhängigen Viabilitätsverlust in primären Neuronen und Gliazellen .....	70
3.7.3 Cisplatin induziert Doppelstrangbrüche in primären Neuronen .....	73
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>76</b>
<b>4.1 Cisplatin schädigt dosisabhängig Medulloblastomzellen mit und ohne c-Myc-   Amplifikation .....</b>	<b>76</b>
4.1.1 Eine c-Myc-Amplifikation sensibilisierte Medulloblastomzellen nicht für eine Behandlung mit Cisplatin .....	77
4.1.2 Cisplatin induzierte einen S-Phase-Arrest in Medulloblastomzellen .....	78
4.1.3 Cisplatin induziert Apoptose in Medulloblastomzellen.....	81
4.1.4 Cisplatin aktiviert die DNA-Schadensantwort in Medulloblastomzellen.....	82
<b>4.2 Eine c-Myc-Überexpression sensibilisiert Medulloblastomzellen für eine   Checkpointkinase-Inhibition.....</b>	<b>85</b>
<b>4.3 Chk1-Inhibition sensibilisiert für Cisplatin-induzierte Schäden in Medulloblastomzellen   .....</b>	<b>89</b>

<b>4.4 Auswirkungen von Cisplatin und AZD-7762 auf primäre Neurone und Gliazellen .....</b>	<b>94</b>
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>99</b>
<b>6. ANHANG .....</b>	<b>107</b>
<b>6.1 Ergänzende Abbildungen.....</b>	<b>107</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>108</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die Phasen des Zellzyklus.	8
Abb. 2: Schematische Darstellung der Chk1-Aktivierung und Wirkung.	11
Abb. 3: Wachstumsverhalten von UW228-2- und HD-MB03-Medulloblastomzellen.	44
Abb. 4: Lebensfähigkeit von Medulloblastomzellen nach Behandlung mit Cisplatin.	45
Abb. 5: Analyse des Zellzyklus von zwei Medulloblastomzelllinien mittels Durchflusszytometrie nach 24 h und 72 h Behandlung mit Cisplatin.	48
Abb. 6: Analyse der SubG1-Fraktion von zwei Medulloblastomzelllinien nach 24 h und 72 h Behandlung mit Cisplatin.	49
Abb. 7: Mitotische Aktivität von Medulloblastomzellen vor und nach Cisplatingabe.	50
Abb. 8: Analyse der S-Phase-Aktivität von Medulloblastomzellen nach 6 h und 6 h + 24 h Behandlung mit Cisplatin.	51
Abb. 9: $\gamma$ H2AX- und 53BP1-Foci zeigen die durch Cisplatin induzierten DNA-Doppelstrangbrüche auf.	54
Abb. 10: Western Blot-Analysen zeigen die Aktivierung der DNA-Schadensantwort in Medulloblastomzellen nach Cisplatinbehandlung.	55
Abb. 11: Einfluss der Chk1-Inhibition auf die Viabilität von Medulloblastomzellen.	58
Abb. 12: Der Chk1-Inhibitor AZD-7762 sensibilisiert Medulloblastomzellen gegenüber einem Cisplatin-induzierten Viabilitätsverlust.	60
Abb. 13: Die Vorbehandlung von Medulloblastomzellen mit einem Chk1-Inhibitor führt zu mehr Cisplatin-induzierten Doppelstrangbrüchen.	64
Abb. 14: Untersuchung des Einflusses einer Chk1-Inhibition auf die Cisplatin-induzierte Aktivierung der DNA-Schadensantwort in Medulloblastomzellen.	66
Abb. 15: Kultivierung hippocampaler Neuronen und Gliazellen von 18 Tage alten Rattenembryonen.	68
Abb. 16: Kultivierung und fluoreszenzmikroskopische Darstellung von hippocampalen Rattenneuronen durch den neuronalen Marker Anti-MAP2.	70
Abb. 17: Viabilitätsmessung von Neuronen und Gliazellen aus Rattenembryonen nach 72-stündiger Dauerbehandlung mit Cisplatin oder dem Chk1-Inhibitor AZD-7762.	72
Abb. 18: Cisplatin induziert Doppelstrangbrüche in primären Rattenneuronen.	74
Abb. 19: Lebensfähigkeit von Medulloblastomzellen nach Behandlung mit dem ATR-Inhibitor VE-822.	107

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Genetische und histologische Klassifikation des Medulloblastoms	2
Tabelle 2: Verwendete Zelllinien	24
Tabelle 3: Medien und Medienzusätze	24
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien	24
Tabelle 5: Lösungen und Puffer	25
Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien	28
Tabelle 7: Auflistung der Primärantikörper	28
Tabelle 8: Auflistung der Sekundärantikörper	29
Tabelle 9: Verwendete Enzyme	29
Tabelle 10: Verwendete Kits	30
Tabelle 11: Geräte	30
Tabelle 12: Computersoftware	31
Tabelle 13: Weitere verwendete Materialien	31
Tabelle 14: Herstellerhauptsitze	32
Tabelle 15: Einfluss von Cisplatin auf die Viabilität der Medulloblastomzellen	46
Tabelle 16: Einfluss einer Chk1-Inhibition auf die Zellviabilität von Medulloblastomzellen mit und ohne c-Myc-Amplifikation	58

# 1 Einleitung

## 1.1 Medulloblastom

Das Medulloblastom ist der häufigste bösartige Hirntumor im Kindesalter (1). Hirntumore stellen bei Kindern die zweithäufigste Gruppe maligner Erkrankungen nach den Leukämien dar (2). Die höchste Inzidenz des Medulloblastoms zeigt sich im Alter von 5 bis 7 Jahren, wobei mehr Jungen betroffen sind als Mädchen (3, 4). Typischer Weise liegt das Medulloblastom infratentoriell und wächst vom Kleinhirnwurm ausgehend (5). Durch die Lage kommt es zu den typischen Symptomen wie Ataxie, Nystagmus, morgendlicher Übelkeit, Kopfschmerzen und Schwindel bis hin zum Koma. Sie entstehen zum einen durch die Beeinträchtigung der Kleinhirnfunktion sowie durch den sekundär erhöhten Hirndruck, da sich der Tumor vom Kleinhirn aus in der Fossa posterior ausbreitet und auf den vierten Ventrikel drückt.

### 1.1.1 Einteilung

Hirntumore werden von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) histologisch nach ihrer Malignität in vier verschiedene Grade (I-IV) unterteilt. Das Medulloblastom wird als Grad IV-Hirntumor klassifiziert (6). Die Grad III- und Grad IV-Tumoren metastasieren besonders häufig und haben eine deutlich schlechtere Prognose (6). Medulloblastome wiederum werden nach genetischen und histologischen Merkmalen jeweils in vier Entitäten unterteilt (s. Tabelle 1). Die vier genetischen Untergruppen umfassen nach der WHO-Klassifikation von 2016 Medulloblastome mit WNT-Aktivierung, mit SHH-Aktivierung TP53 Wildtyp, mit SHH-Aktivierung TP53 mutiert und Medulloblastome, die nicht-WNT / nicht-SHH aktiviert sind (7, 8). Der WNT- sowie der Sonic-Hedgehog- (SHH-) Signalweg sind zwei Signaltransduktionswege, die Wachstum und Differenzierung einer Zelle regulieren (9). TP53 ist ein Gen, welches für das Tumorsuppressorprotein P53 kodiert. P53 hält im aktiven Zustand den Zellzyklus an, sodass entstandene DNA-Schäden repariert werden können. Ist der Schaden irreparabel, induziert P53 den Eintritt der Zelle in die Apoptose. Liegt eine Mutation im TP53-Gen vor, fehlt der Zelle diese Wächterfunktion und es kommt zu einem stark erhöhten Entartungsrisiko (9). Die zuletzt genannte Untergruppe (Medulloblastome, die nicht-WNT / nicht-SHH aktiviert sind) wird definitionsgemäß in die Gruppe 3 und Gruppe 4 Medulloblastome unterteilt (s. Tabelle 1) (7, 8). Von beiden Untergruppen ist

der zelluläre Ursprung nicht bekannt (10). Gruppe 3 Medulloblastome mit c-Myc-Amplifikation weisen die schlechteste Prognose aller Medulloblastome auf (11). C-Myc ist ein Protoonkogen, welches für den gleichnamigen Transkriptionsfaktor kodiert und die Transkription von proliferationsfördernden Genen induziert. Eine Überexpression von c-Myc trägt zur Tumorentstehung bei und findet sich in vielen malignen Tumoren (12).

Genetische Klassifikation	Histologische Klassifikation
Medulloblastom mit WNT-Aktivierung (WNT-Signaltransduktionsweg-Aktivierung)	Klassisches Medulloblastom
Medulloblastom mit SHH Aktivierung (Sonic Hedgehog-Signaltransduktionsweg) TP53 Wildtyp	Desmoplastisch, noduläres Medulloblastom
Medulloblastom mit SHH-Aktivierung, TP53 mutiert	Extensiv noduläres Medulloblastom
Medulloblastom, nicht-WNT / nicht-SHH aktiviert <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gruppe 3 Medulloblastom</li> <li>• Gruppe 4 Medulloblastom</li> </ul>	Großzellig, anaplastisches Medulloblastom

**Tabelle 1: Genetische und histologische Klassifikation des Medulloblastoms**

Das Medulloblastom wird nach der WHO-Klassifikation von 2016 in vier genetische sowie vier histologische Untergruppen unterteilt. Die histologische Tumormorphologie gibt jedoch keine Aufschlüsse über den genetischen Subtyp. Modifiziert nach Rutkowski: Medulloblastom im Kindes- und Jugendalter, S1-Leitlinie 025/009 (13)

Die histologische Klassifikation umfasst das klassische Medulloblastom, das desmoplastisch/noduläre Medulloblastom, das extensiv noduläre Medulloblastom und das großzellig/anaplastische Medulloblastom (13). Die histologische Identifizierung der Tumormorphologie ergibt jedoch keinen Aufschluss über seine Genetik. Allerdings zeigen vor allem TP53-mutierte SHH- und Myc-amplifizierte Gruppe 3 Medulloblastome ein großzelliges oder diffus anaplastisches Bild in der Histologie (8, 14).

Klinische Konsequenz haben diese Einteilungen vor allem in der Diagnostik und Therapie. Bei der Diagnose eines Medulloblastoms sollten nach WHO-Klassifikation sowohl histopathologische als auch molekulargenetische Methoden zur Klassifikation

angewandt werden. Insbesondere bei der Untergruppe der Medulloblastome mit SHH-Aktivierung muss eine Mutation von TP53 diagnostisch ausgeschlossen oder nachgewiesen werden (15). Die TP53-Mutationsanalyse wird an intraoperativ gewonnenem Tumormaterial durchgeführt. Hierfür wird aus Tumorzellen DNA isoliert und durch die Durchführung einer Polymerasekettenreaktion (PCR) kommt es zur einer exponentiellen Zunahme der DNA-Moleküle des TP53-Gens. Nun kann der TP53-Mutationsstatus durch direkte DNA-Sequenzanalyse (z. B. mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese) bewertet werden (16, 17).

### **1.1.2 Prognose und Risikostratifizierung**

#### *1.1.2.1 Ungünstige prognostische Faktoren*

Die 10-Jahres-Überlebensraten unter Berücksichtigung aller Medulloblastompatienten liegen aktuell bei knapp 70 %. Je nach Risikostratifizierung variiert das Langzeitüberleben der Patienten allerdings erheblich von unter 50 % bis zu über 90 % Langzeitüberlebenden (18). Obwohl neuere Therapieansätze durch gezieltere Bestrahlung mit verringerter Strahlendosis und veränderten Chemotherapieprotokollen zu weniger neurokognitiver Morbidität führen (19), ist die Langzeitprognose von Kindern mit einem Medulloblastom nach wie vor schlecht (20). Einer der wichtigsten ungünstigen prognostischen Faktoren eines Medulloblastoms ist das Vorhandensein eines Resttumors nach der Operation sowie eine bereits erfolgte Metastasierung. Weitere prognostisch negative Faktoren sind niedriges Alter bei Erstdiagnose sowie ein unzureichendes Ansprechen auf die adjuvante Chemotherapie (21-23).

Histologische und genetische Faktoren spielen heute eine immer größer werdende Rolle und sind Teil intensiver Forschung (8). Als genetisch ungünstige Faktoren haben der TP53-Mutationsstatus sowie die c-Myc- und N-Myc-Amplifikation des Tumors eine wichtige prognostische Aussagekraft (8, 10, 24-27). N-Myc gehört wie c-Myc zur Myc-Genfamilie und ist essentiell für die schnelle Proliferation von Vorläuferzellen während der Entwicklung des Zentralnervensystems. N-Myc ist ein Protoonkogen und wird sowohl in vielen Tumoren des Nervensystems als auch in einigen nicht-neuronalen Tumoren überexprimiert (28). Es werden aktuell nach der neuen Einteilung des

Medulloblastoms (s. genetische Klassifikation in Tabelle 1) drei Gruppen von Hochrisikopatienten definiert, die eine besonders ungünstige Prognose aufweisen: Medulloblastome mit SHH-Aktivierung, die eine TP53-Mutation aufweisen, Medulloblastome, die nicht-WNT / nicht-SHH aktiviert sind und zusätzlich eine Myc-Genamplifikation besitzen, sowie bereits metastasierte Medulloblastome (13). Als histologisch ungünstiger prognostischer Faktor wurde die schwere Anaplasie identifiziert (26, 29). Obwohl die histologische Tumormorphologie keine Aufschlüsse über den genetischen Subtyp gibt ist die am häufigsten assoziierten molekularen Störungen, die zum Phänotyp der Anaplasie führt, die c- und N-Myc-Amplifikation (14, 30). Ebenfalls mit einer anaplastischen Morphologie assoziiert sind Medulloblastome mit SHH-Aktivierung und TP53 Mutation (8).

#### *1.1.2.2 Risikostratifizierung*

Es wurden 2015 in Heidelberg vier Risikogruppen für Medulloblastome bei Kindern zwischen 3 und 15 Jahren definiert (9). Hierzu wurden Daten aus den Jahren 2010 bis 2015 ausgewertet und im Rahmen der vier genetischen Untergruppen (s. Tabelle 1) und auf Grundlage der derzeitigen Überlebenschancen vier Risikogruppen festgelegt: Patienten mit geringem Risiko (> 90 % Überleben), Standardrisiko (75–90 % Überleben), hohem Risiko (50–75 % Überleben) und sehr hohem Risiko (< 50 % Überleben). Patienten mit einem Medulloblastom mit WNT-Aktivierung oder nicht metastasierendem Gruppe 4 Medulloblastom mit vollständigem Chromosom-11-Verlust werden der Gruppe mit geringem Risiko zugeordnet. In der Standardrisikogruppe finden sich Medulloblastome mit SHH-Aktivierung und einem TP53 Wildtyp sowie nicht metastasierende Gruppe 4 Medulloblastome ohne vollständigen Chromosom-11-Verlust. Patienten, die an einem Medulloblastom mit SHH-Aktivierung (TP53 Wildtyp) leiden, welches bereits metastasiert ist oder eine N-Myc-Amplifikation aufweist, zählen ebenso wie Patienten mit einem metastasierten Gruppe 4 Medulloblastom zur Hochrisikogruppe. In der Gruppe mit sehr hohem Risiko werden Patienten mit einem Gruppe 3 Medulloblastom mit c-Myc-Amplifikation oder einem Medulloblastom mit SHH-Aktivierung und TP53 Mutation geführt (8, 11, 27, 31). Diese Risikostratifizierung ist klinisch in Zukunft besonders relevant für die Therapieplanung bei den Patienten. So könnten Patienten mit niedrigem Risiko einer weniger aggressiven Therapie

zugeführt werden als Patienten mit hohem oder sehr hohem Risiko. Auf diese Weise könnten die unerwünschten Langzeitfolgen der Therapien in diesen Gruppen gesenkt werden. Zudem könnten aufgrund der molekularen Marker (P53-Mutation, c-Myc- oder N-Myc-Amplifikation) neue Therapiestrategien für einzelne Untergruppe zugeschnitten werden und so auch in den Hochrisikogruppen ein besseres Langzeitüberleben erzielt werden.

### **1.1.3 Therapie**

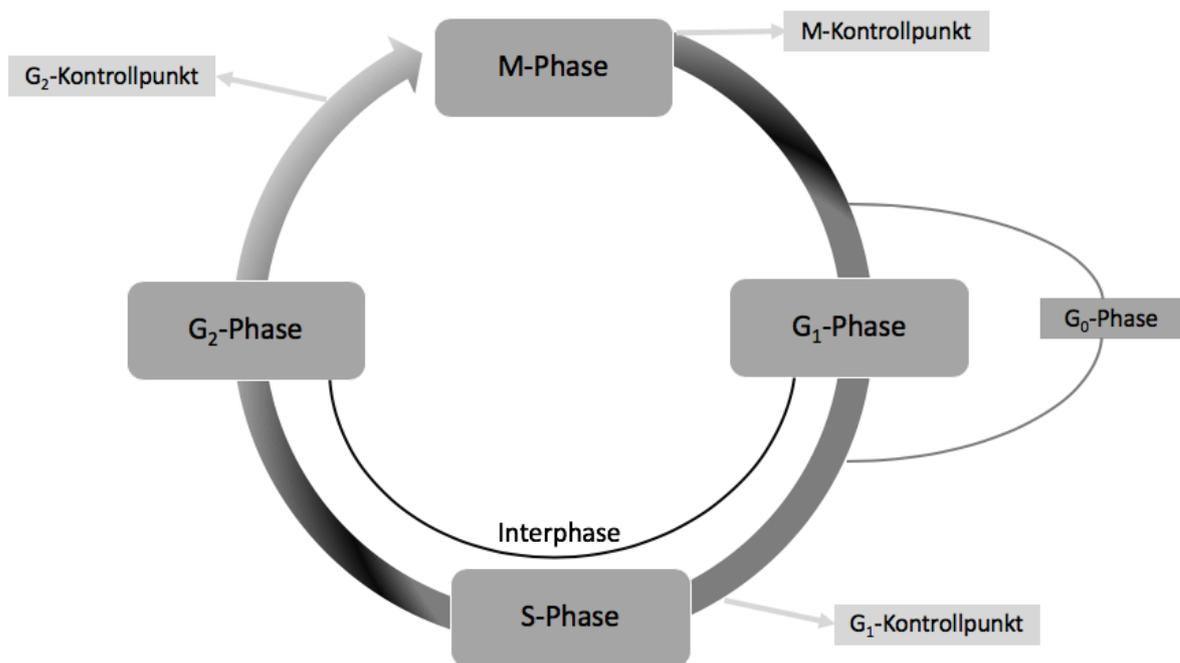
Die Therapieoptionen bestehen aus der primären operativen Tumoresektion sowie einer Radio- und Chemotherapie. Eine komplette Tumoresektion ist aufgrund der Lage des Medulloblastoms oft nicht realisierbar, da lebenswichtige Strukturen wie die Medulla oblongata oder der Kleinhirnbrückenwinkel in direkter Nachbarschaft zum Tumor liegen (32). Eine Resektion des Tumors mit ausreichendem Sicherheitsabstand zum gesunden Gewebe (sogenannte R0-Resektion) ohne Nachweis von Tumorgewebe im Resektionsrand in der histopathologischen Untersuchung ist daher nicht möglich ohne irreversible neurologische Schäden zu hinterlassen. Dennoch wird eine primäre totale Tumoresektion auch ohne Sicherheitsabstand immer angestrebt. Bei Inoperabilität, insbesondere bei Infiltration des Kleinhirnbrückenwinkels, der Medulla oblongata oder des Mittelhirns, muss ein Tumorrest intraoperativ belassen werden (sogenannte R1-Resektion) (13). Nach einer anschließenden Radiochemotherapie wird dann versucht den Tumorrest in einer *Second-Look-Operation* zu entfernen (13). Bei Kindern im Alter über 3 bis 5 Jahren und ohne Metastasierung erfolgt eine kraniospinale Bestrahlung mit lokalem Tumorboost sowie eine anschließende Erhaltungskemotherapie (33). Die Chemotherapie erfolgt als Kombinationschemotherapie. Meistens handelt es sich hierbei um eine Kombination aus einem Platinderivat (Cisplatin), Mitosehemmstoff (Vincristin) sowie einem Nitrosoharnstoffderivat (CCNU, BCNU) (23). Auch eine intraventrikuläre Chemotherapie mit dem Folsäure-Antagonisten Methotrexat kann heute je nach Tumorstaging zum Einsatz kommen (23). Die adjuvante Radiochemotherapie ist in der Regel immer notwendig, da das Medulloblastom aufgrund seines infiltrativen Wachstums und der den Tumor umgebenden Strukturen nicht radikal mit ausreichendem Sicherheitsabstand reseziert werden kann.

Das Medulloblastom neigt zur frühen Metastasenbildung vor allem in den Liquorraum, welche als Abtropfmetastasen bezeichnet werden. Knapp 20 % der Kinder weisen bei Erstdiagnose bereits Metastasen in der Zerebrospinalflüssigkeit auf (34-36). Daher ist bei jedem Patienten von einer okkulten Metastasierung in den Liquorraum auszugehen (13) und es wird meist eine kraniospinale Bestrahlung des gesamten Liquorraums in Kombination mit einer Chemotherapie nötig (13, 22). Die Dosierung der Bestrahlung liegt üblicherweise zwischen 24 und 36 Gy. Zudem erfolgt eine Aufsättigung der hinteren Schädelgrube mit bis zu 54 bis 60 Gy (13). Die Intensität der postoperative Bestrahlung hängt zudem von der Risikostratifizierung der Patienten ab. So erhalten Patienten mit Standardrisiko (s. 1.1.2.2) eine reduzierte Strahlentherapie mit lokalisierter Verstärkung der Bestrahlung in der hinteren Schädelgrube. Die Zugabe einer adjuvanten Chemotherapie erlaubt die Dosis der Bestrahlung weiter zu reduzieren ohne eine signifikante Abnahme des Überlebens zu riskieren, wodurch ein besserer Erhalt der neurokognitiven Funktion gewährleistet werden kann (37-39). Die Therapie für Hochrisikopatienten (s. 1.1.2.2) ist dagegen deutlich aggressiver und geht dementsprechend mit mehr Nebenwirkungen einher. Die genauen Konzentrationen müssen immer dem aktuellen, individuellen Therapieprotokoll entnommen werden. Da die Radiotherapie vor allem bei Kleinkindern am unreifen Gehirn weitreichende irreversible Nebenwirkungen verursacht (38, 40), stellt sie in der Altersgruppe unter 3 Jahren keine Behandlungsalternative dar. Hier ist eine alleinige, intensiverte, postoperative Chemotherapie, die zum Teil intraventrikulär eingesetzt werden kann, die einzig mögliche weitere Behandlungsstrategie (41). Bei bereits metastasierten Tumoren oder Risikopatienten wird eine intensivere Radio-Chemotherapie angestrebt (13). Jeder Patient sollte eine individuelle Therapie je nach Untergruppe, Histologie und Mutationsstatus erhalten, die anhand von molekularen und histologischen Gesichtspunkten genau geplant und durch eine entsprechende Studiengruppe betreut wird (8). Neue Therapieansätze ergeben sich durch die Bestimmung von genetischen Faktoren im Tumorgewebe wie einer Amplifikation des Protoonkogens c-Myc oder einer Mutation des Tumorsuppressorproteins P53. Beispielsweise wurde entdeckt, dass Zellen, die eine hohe c-Myc-Expression aufweisen, besonders empfindlich auf Replication-Stress-Response-Inhibitoren (RSR-Inhibitoren) wie Checkpointkinase 1-

Inhibitoren (Chk1-Inhibitoren) oder ATR-Inhibitoren reagieren (12, 42, 43). Zudem wird der ATR-Chk1-Signalweg, der an der Zellzyklusregulation beteiligt ist, bei einer P53-Mutation häufiger genutzt. Dieser Signalweg ist für die Lebensfähigkeit der Krebszellen mit P53-Mutation erforderlich (s. 1.2.1.1) (44). Dies macht ATR und Chk1 als Target für die gezielte Therapie von Medulloblastomen sehr interessant.

## 1.2 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus beschreibt den zyklischen Ablauf von vier verschiedenen Phasen in einer sich teilenden eukaryontischen Zelle. Am Ende des Zellzyklus steht die identische Verdopplung in zwei Tochterzellen. Er wird in vier Stadien unterteilt, wobei die  $G_1$ -, S- und  $G_2$ -Phase auch als Interphase zusammengefasst werden. Die G-Phasen, auch *gap*-Phasen (englisch für Lücke), befinden sich dabei zwischen der M- und der S-Phase (9). Damit sich die Zellen nicht unkontrolliert durchgehend teilen und so exponentiell wachsen, sondern immer nur so viele neue Zellen entstehen, wie auch benötigt werden, gibt es Mechanismen, die den Zellzyklus kontrollieren und nicht mehr benötigte Zellen durch Apoptose eliminieren. Es gibt auch Zellen, die sich nach ihrer Differenzierung überhaupt nicht mehr teilen, zum Beispiel die menschlichen Nervenzellen. Diese Zellen befinden sich in der sogenannten  $G_0$ -Phase. Ein hoher Differenzierungsgrad, eine geringe Konzentration von Wachstumsfaktoren oder eine hohe Populationsdichte bewirken den Eintritt in diese Ruhephase, in der ein normaler Stoffwechsel, aber keine Zellteilung stattfindet. Andere Zellen, wie die Hepatozyten, befinden sich nur vorübergehend in der  $G_0$ -Phase. Wachstumsfaktoren und Nährstoffe können die Zelle dazu veranlassen die  $G_0$ -Phase wieder zu verlassen und erneut in den Zellzyklus einzutreten (9). Findet eine kontinuierliche Zellproliferation statt, teilt sich die Zelle in der M-Phase während der Mitose und tritt anschließend in die Interphase ein. Die Interphase beginnt mit der  $G_1$ -Phase. Hier wächst die Zelle und synthetisiert benötigte Proteine und Nucleotide für die DNA-Replikation. Ist eine ausreichende Zellgröße erreicht, sind genug Substrate für die DNA-Synthese vorhanden und liegen keine DNA-Schäden vor, tritt die Zelle als nächstes in die S-Phase ein, in der die DNA repliziert wird. Anschließend folgt die  $G_2$ -Phase, in der auch RNA und Proteine synthetisiert werden und die Zelle auf die Zellteilung vorbereitet wird (9).



**Abb. 1: Die Phasen des Zellzyklus.**

Der Zellzyklus besteht aus der G<sub>1</sub>-, S-, G<sub>2</sub>-Phase, die als Interphase bezeichnet werden, sowie der M-Phase in der die Mitose stattfindet. Dargestellt sind zudem drei wichtige Kontrollpunkte der Zellzykluskontrolle (M-, G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Kontrollpunkt) sowie die G<sub>0</sub>-Phase, in der sich ausdifferenzierte Zellen befinden, die sich nicht mehr teilen. Modifiziert nach Löffler und Petrides (9).

Die Zellkontakte zu den Nachbarzellen werden gelöst, die Zelle nimmt Flüssigkeit auf, vergrößert sich dadurch und rundet sich ab. Am Ende der G<sub>2</sub>-Phase wird noch einmal überprüft, ob die DNA erfolgreich repliziert wurde oder ob DNA-Schäden vorliegen. In diesem Falle findet die Nutzung von Reparaturmechanismen (s. 1.2.1) statt. In der nachfolgenden M-Phase teilt sich das Cytoplasma und die DNA wird auf die mitotischen Spindeln und Tochterchromatiden aufgeteilt. Die Mitose wird wiederum in sechs Phasen unterteilt (Pro-, Prometa- Meta-, Ana-, Telophase und Cytokinese) und am Ende der Mitose sind zwei gleiche Tochterzellen entstanden (9).

**1.2.1 Zellzykluskontrolle**

Die Kontrolle und Regulation des Zellzyklus erfolgt hauptsächlich durch Cycline und cyclinabhängige Kinasen (44). Externe Faktoren wie Wachstumsfaktoren wirken regulierend auf diese ein. Drei besonders wichtige dieser Kontrollpunkte (sog. Checkpoints) findet man in der späten G<sub>1</sub>-Phase, am Ende der G<sub>2</sub>-Phase und nach der

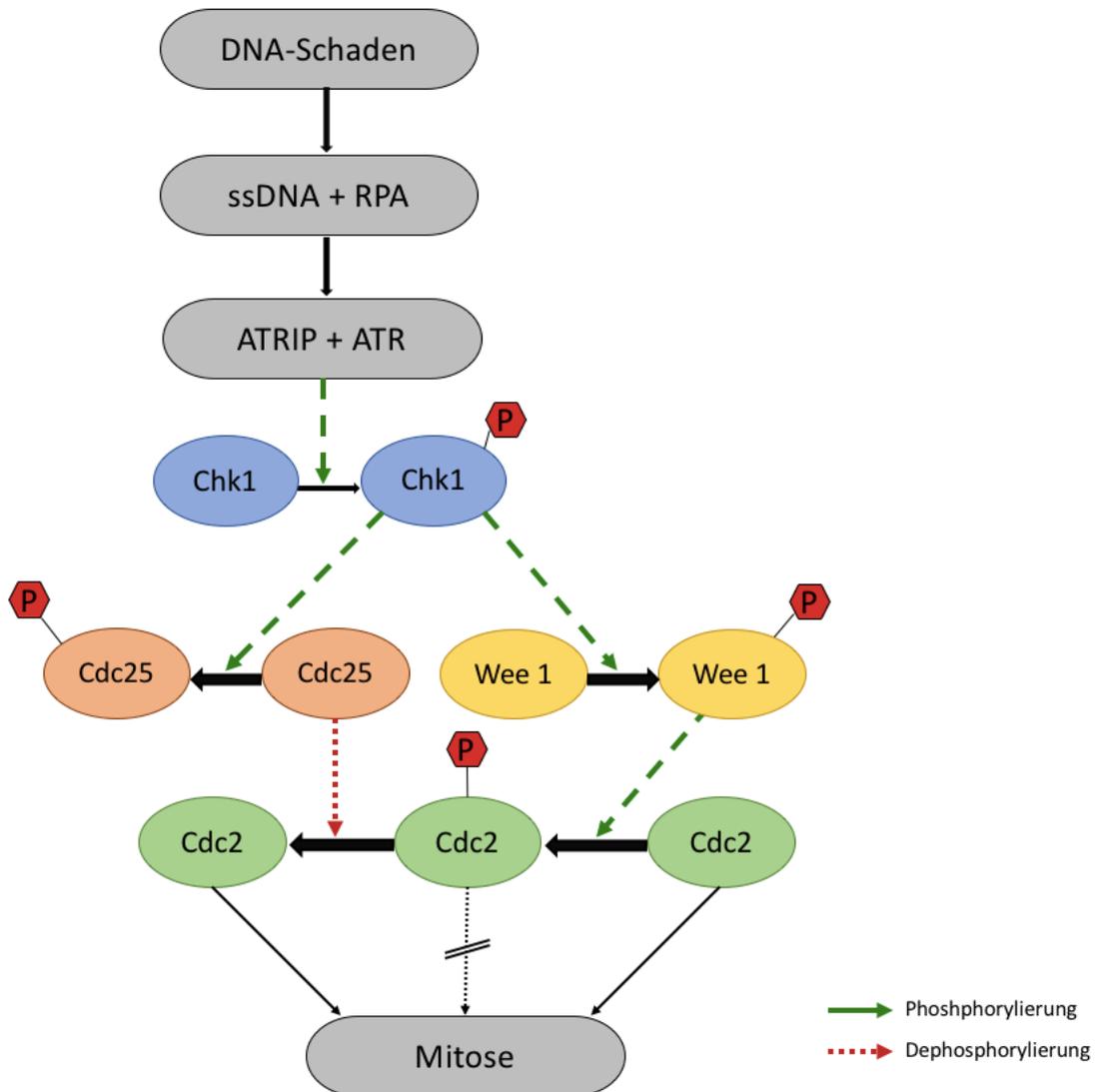
Metaphase der Mitose (s. Abbildung 1) (9). Diese Kontrollpunkte verhindern, dass eine Zelle zu früh in die nächste Phase des Zyklus eintritt. So wird sichergestellt, dass genug Substrate für die nächste Phase produziert wurden und die DNA-Synthese vor der Mitose vollständig abgeschlossen ist. Auch wird die DNA auf Schäden überprüft und bei aufgetretenen Fehlern wird der Zellzyklus angehalten. Dadurch hat die Zelle Zeit die Schäden durch entsprechende DNA-Reparaturmechanismen zu beheben oder bei irreparablen Schäden die Apoptose einzuleiten (9). Man unterscheidet verschiedene DNA-Reparatursysteme. Die DNA kann durch direkte Reparatur, Basenexcisionsreparatur, Nucleotidexcisionsreparatur, Mismatch-Reparatur, *non-homologous end joining* und Rekombinationsreparatur repariert werden (9). Bei der Basenexcisionsreparatur, Nucleotidexcisionsreparatur und Mismatch-Reparatur wird ein DNA-Schaden behoben, indem das geschädigte Nucleotid oder die geschädigte Base, zum Teil zusammen mit benachbarten Nucleotiden, herausgeschnitten wird. Die entstandene Lücke wird durch eine Polymerase aufgefüllt und durch eine Ligase geschlossen (9). DNA-Doppelstrangbrüche können durch *non-homologous end joining* (nicht-homologe Strangverknüpfung; NHEJ) oder Rekombinationsreparatur (homologe Rekombination; HR) beseitigt werden. Bei der Rekombinationsreparatur dient das homologe Chromosom als Matrize für die Reparatur, sodass eine fehlerfreie Reparatur des Doppelstrangbruchs möglich ist. Die homologe Rekombination findet in der späten S- und G2-Phase statt (9). Im Gegensatz dazu werden beim *non-homologous end joining* nur zwei DNA-Fragmente miteinander verknüpft ohne die Möglichkeit der Überprüfung, ob die beiden DNA-Fragmente ursprünglich nebeneinander lokalisiert waren (9). Die Überprüfungen an den Kontrollpunkten sind von größter Wichtigkeit, damit fehlerhafte oder beschädigte Zellen sich nicht exponentiell vermehren können. So tragen Fehler in den beteiligten Enzymen und Proteinen der Checkpoints zur Krebsentstehung bei (9).

#### 1.2.1.1 Chk1 in der DNA-Schadensantwort

Eine Zelle verfügt über eine komplexe DNA-Schadensantwort, damit eine Schädigung der DNA zum Stillstand des Zellzyklus führt und die detektierten Fehler gegebenenfalls repariert werden können. Diese DNA-Schadensantwort reguliert sowohl die Reparatur von DNA-Schäden als auch die Zellzyklusübergänge, sie sorgt für eine Erleichterung der DNA-Replikation und kann bei irreparablen Schäden den programmierten Zelltod

einleiten (Apoptoseinduktion) (45). Eine Schädigung der DNA kann verschiedene Ursachen haben. Intrinsische Ursachen wie die Verkürzung von Telomeren, die Überexpression von Onkogenen oder Replikationsfehler führen genauso wie extrinsische Faktoren, unter anderem Sonnenlicht, ionisierende Strahlung oder Zytostatika zum Zellzyklusarrest (44). Zudem sind einige Bindungen in der DNA instabil. Beispielsweise führen endogen durch den Stoffwechsel gebildete Noxen wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu oxidativem Stress. Hierdurch kann es zu Basenfehlpaarungen während der Replikation kommen wie beispielsweise die durch ROS-bedingte Hydroxylierung von Guanin zu 8-Hydroxyguanin, welches sich bei der Replikation mit Adenin statt Cytosin paart (9). Außerdem kann bereits bei Körpertemperatur eine spontane Depurinierung auftreten, die zur Spaltung der N-glycosidischen Bindung zwischen Purinbasen und Desoxyribosen führt. Die spontane Desaminierung von Cytosin kann ebenfalls zur Basenfehlpaarung führen, da so Uracil entsteht, welches sich anstatt mit Guanin mit Adenin paart und so mutagen wirkt (9). Die entstandenen DNA-Schäden aktivieren Checkpoint-Pfade, deren Ziel es ist, die cyclinabhängigen Kinasen (z.B. Cdc2) in einem inaktiven Zustand zu halten, bis die Läsion entfernt oder die Apoptose eingeleitet ist (44). Einer dieser Pfade wird hauptsächlich über die Checkpointkinase 1 (Chk1) reguliert, eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die durch DNA-Schäden aktiviert wird (s. Abb. 2). Dies geschieht effizienter in der S- und G<sub>2</sub>-Phase als am G<sub>1</sub>-Checkpoint (44). DNA-Doppelstrangbrüche können in der S- und G<sub>2</sub>-Phase durch homologe Rekombination repariert werden, da hier ein homologes Schwesterchromatid für den Reparaturprozess vorliegt. Im Gegensatz dazu werden Doppelstrangbrüche in postmitotische Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase durch NHEJ (nicht-homologe Strangverknüpfung) repariert (s. 1.2.1.) (46). Die aktivierte Checkpointkinase 1 stellt sicher, dass die cyclinabhängige Kinase Cdc2 (auch cyclin-dependent kinase 1; Cdk1) in einem inaktiven Zustand bleibt und so der Zellzyklus angehalten wird, bis die DNA-Reparatur abgeschlossen ist (47). Wenn Cdc2 an Tyrosin 15 (Y15) dephosphoryliert vorliegt, kann die Zelle in die nächste Phase des Zellzyklus eintreten. Cdc2 wird durch die Kinase Wee 1 an Y15 phosphoryliert und führt so durch die inhibitorische Tyrosinphosphorylierung zum Zellzyklusarrest. Die Phosphatase Cdc25 dephosphoryliert Y15 wieder, sobald keine DNA-Schäden mehr

vorliegen und genug Substrate für die nächste Phase vorhanden sind, sodass die Zelle den Checkpoint passieren kann (48, 49).



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Chk1-Aktivierung und Wirkung.**

Die Checkpointkinase 1 (Chk1) wird nach einem DNA-Schaden durch eine Phosphorylierung von ATR aktiviert und phosphoryliert anschließend Cdc25 sowie Wee 1. Dies führt zu einer erhöhten Wee1-Stabilität und einer verringerten Cdc25-Aktivität. Dadurch wird der mitotische Eintritt über die Y15-Phosphorylierung von Cdc2 blockiert und die Zelle kann den G2-Checkpoint nicht passieren.

Chk1 phosphoryliert sowohl die Kinase Wee 1 als auch die Phosphatase Cdc25, was auf der einen Seite zur Stabilisierung von Wee 1 und auf der anderen Seite zu einer verringerten Aktivität von Cdc25 führt. Beides bewirkt somit eine Phosphorylierung an Y15 bzw. eine verminderte Dephosphorylierung und lässt die Zelle den Checkpoint nicht passieren (47, 48, 50). Chk1 wiederum wird durch die Kinase ATR phosphoryliert

und somit aktiviert. Kommt es zu einer Läsion in der DNA führt dies dazu, dass die DNA in einen Einzelstrang (ssDNA; *single-stranded DNA*) überführt wird und dieser vom ssDNA bindenden Protein RPA (Replikations Protein A) erkannt wird. Dies ermöglicht die Bindung von ATRIP (*ATR-interacting protein*) und der ATR-Proteinkinase (51) an die DNA. Anschließend wird Chk1 von ATR phosphoryliert. Die Phosphorylierung erfolgt an der C-terminalen regulatorischen Domäne von Chk1 an Serin 345 und Serin 317 (52). Darauffolgend kommt es zu einer Interaktion zwischen der phosphorylierten und somit aktivierten Checkpointkinase 1 und Cdc25, was schließlich den Zellzyklusarrest einleitet. Ist der Schaden an der DNA wieder behoben, erfolgt die Inaktivierung von Chk1. Dies geschieht unter anderem durch eine Dephosphorylierung durch die Proteinphosphatase 1 (PP1) und der Zellzyklusarrest wird wieder aufgehoben (53).

Ein weiterer Weg der DNA-Schadensantwort erfolgt über das Tumorsuppressorprotein P53. P53 weist eine molekulare Masse von 53 kDa auf und liegt als Tetramer mit der Ubiquitinligase Mdm2 (*mouse double minute 2 protein*) assoziiert vor (9). P53 ist unter physiologischen Bedingungen instabil, seine zelluläre Konzentration wird durch Ubiquitinierung und proteasomalen Abbau gering gehalten. In seiner phosphorylierten Form kann P53 jedoch nicht mehr abgebaut werden (9). Wird die DNA durch endogene oder exogene Faktoren geschädigt (s.o.), wird der entstandene DNA-Schaden durch den MRN-Proteinkomplex bestehend aus der Exonuclease Mre11, der ATPase Rad50 und dem Gerüstprotein Nbs1, erkannt (9). MRN aktiviert anschließend ATM und ATR, welche P53 phosphorylieren. Durch die Phosphorylierung von P53 kommt es zur Dissoziation von Mdm2, was dazu führt, dass die Proteolyse von P53 ausbleibt (9). Der erhöhte P53-Spiegel stimuliert die Transkription des P21-Gens (9). P21 wiederum ist ein Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks) der S-Phase. Durch die Transkription von P21 wird der Zellzyklus angehalten und entstandene DNA-Schäden können behoben werden (9). Liegen irreparable DNA-Schäden vor, führen sehr hohe P53-Konzentrationen zur Expression von Genen, die die Apoptose auslösen, wie zum Beispiel die Proteine der BCL2 (*B-cell lymphoma 2*)-Familie (z. B. *BCL2-associated X protein*) (9, 44, 54, 55). Kommt es zu einem Verlust von P53, was einen häufigen genetischen Defekt in Krebszellen darstellt, wird der Chk1-Signalweg verstärkt genutzt. Dieser Signalweg ist in Krebszellen daher oft hochreguliert und für die Lebensfähigkeit

vieler Krebszellen erforderlich (44), was Chk1 als Target für die gezielte Therapie von bösartigen Tumoren in der Klinik sehr interessant macht.

#### *1.2.1.2 C-Myc in der DNA-Schadensantwort*

C-Myc ist ein Gen welches auf Chromosom 8 liegt und für den gleichnamigen Transkriptionsfaktor kodiert. Dieser induziert vor allem die Transkription von proliferationsfördernden Genen und führt so zu Zellwachstum, Differenzierung und Proliferation der Zelle und gilt als Protoonkogen (12). C-Myc reguliert die Expression von etwa 15 % aller menschlichen Gene und wird unter anderem durch den WNT-, SHH- und MAPK/ERK-Signalweg aktiviert (56). Zudem reguliert c-Myc teilweise die DNA-Replikation, indem es die Expression von Genen kontrolliert, die am Eintritt der S-Phase beteiligt sind. Dazu gehören beispielsweise cyclinabhängige Kinasen (CDKs), Cycline und CDK-Inhibitoren (43, 56). C-Myc reguliert außerdem wichtige zelluläre Prozesse wie ribosomale RNA (rRNA), ribosomale Proteine, Upstream-Bindungsfaktor 1 (UBF), Transfer-RNA (tRNA), den eukaryotischen Translations-Initiationsfaktor 2A und 4E (eIF2A, eIF4E), die Proteine P15, P21, P27, P32, Cyclin D, Cyclin E, BCL2-assoziiertes X Protein (BAX), NOXA-Protein, Bcl-2-ähnliches Protein 11 (BIM), Hexokinase 2 (HK2), Lactatdehydrogenase A (LDHA), Alanin-Serin-Cystein-Transporter 2 (ASCT2), Transkriptionsfaktor A, Serin-Hydroxymethyltransferase (SHMT), Ribonukleosid-Diphosphat-Reduktase-Untereinheit M2 (RRM2), Amidophosphoribosyltransferase (PPAT) und Protein-Arginin-N-Methyltransferase 5 (PRMT5) (57). Eine Überexpression von c-Myc findet sich in vielen malignen Tumoren. Die Überexpression von c-Myc verursacht unabhängig von seiner Rolle als Transkriptionsfaktor Replikationsstress durch einen signifikanten Anstieg der Anzahl von DNA-Syntheseherden. Dies führt zu einer übermäßigen Stimulation der Replikationsaktivität und anschließender DNA-Schädigung (58, 59). Die durch c-Myc entstehende erhöhte Anzahl aktiver Replikationsursprünge und die gesteigerte DNA-Syntheserate erhöhen das Ausmaß der während der DNA-Synthese physiologisch akkumulierenden DNA-Schäden. Durch die Induktion dieser DNA-Schäden sowie durch ein unangemessenes Fortschreiten des Zellzyklus und Beeinträchtigung der DNA-Reparatur führt c-Myc zur Checkpoint-Aktivierung (60). Dies geschieht, da durch den induzierten replikativen Stress das Vorhandensein von einzelsträngiger DNA (ssDNA) zunimmt, die mit dem ssDNA

bindenen Protein RPA beschichtet ist, wodurch ATR und die nachgeschaltete Kinase Chk1 aktiviert werden (s. Abbildung 2) (61). Die Chk1-Aktivierung führt dazu, dass Replikationsgabeln stabilisiert und blockierte Gabeln aufgelöst werden, um den Abschluss der Replikation sicherzustellen. So werden schädliche genetische Instabilitäten vermieden und eine effiziente Proliferation wird gewährleistet. C-Myc führt also einerseits zu starkem replikativem Stress, andererseits kann c-Myc selbst über die Aktivierung des ATR-Chk1-Signalwegs das Ausmaß von replikativem Stress begrenzen und so schädliche genetische Instabilitäten vermeiden (12, 42, 43, 56, 62, 63), wodurch das Überleben von potenziellen Krebszellen geschützt wird. Daher lässt sich vermuten, dass man das Targeting von ATR und Chk1 für c-Myc-abhängige Tumoren therapeutisch nutzen könnte. Niedrige ATR-Spiegel verhinderten beispielsweise die Entwicklung von durch c-Myc ausgelösten B-Zell-Lymphomen in Mäusen (42). Zudem reagierten Zellen, die eine hohe c-Myc-Expression aufweisen besonders empfindlich auf Replication-Stress-Response-Inhibitoren (RSR-) Inhibitoren wie den Chk1-Inhibitor (12, 42, 43). Da Medulloblastome der Gruppe 3 häufig eine c-Myc-Überexpression aufweisen und zudem eine schlechteste Prognose haben (s. 1.1.3.), ist das therapeutische Targeting von Chk1 für diese Patientengruppe besonders interessant und vielversprechend.

### **1.3 Cisplatin**

Platinverbindungen stellen Verbindungen des chemischen Elementes Platin dar. Sie sind als Zytostatika wichtiger Bestandteil der Behandlung einer Vielzahl von malignen Tumoren. Seit der Zulassung des bekanntesten Vertreters Cisplatin wurden 23 andere Medikamente auf Platinbasis in klinische Studien aufgenommen (64). Die bekanntesten drei Vertreter Cisplatin, Oxaliplatin und Carboplatin haben die weltweite Zulassung zur Behandlung bösartiger Erkrankungen erhalten. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Nebenwirkungen, Pharmakokinetik sowie ihrer Indikation und werden je nach Entwicklungszeitpunkt unterschiedlichen Generationen zugeordnet. Nur drei weitere Platinverbindungen (Nedaplatin, Lobaplatin, Heptaplatin) haben die Marktzulassung in einzelnen Ländern erhalten (64, 65). Cisplatin (cis-Diammindichloridoplatin (II)) ist der bekannteste Vertreter der Platinverbindungen und wurde zum ersten Mal 1844 in Italien von Peyrone synthetisiert (66). Seine hemmende

Wirkung auf die Zellteilung wurde jedoch erst wesentlich später zufällig von Barnett Rosenberg erkannt (67). 1978 erteilte die FDA (US Food and Drug Administration) nach vielen weiteren Studien die Zulassung für Cisplatin zur klinischen Verwendung für Patienten mit Ovarial- und Hodenkrebs. Bis heute spielt Cisplatin in der Therapie von vielen bösartigen Tumoren eine bedeutende Rolle, mittlerweile jedoch oft in Kombination mit anderen Zytostatika als Kombinationschemotherapie. So wird Cisplatin regelhaft in der Therapie von metastasierenden Hoden- und Ovarialtumoren, Blasen- und soliden Tumoren im Kopf-Hals-Bereich, der Zervix, des Endometriums sowie der Lunge eingesetzt (68). Auch in der Therapie des Medulloblastoms ist Cisplatin heute noch immer ein Teil der Standardbehandlung (69).

### **1.3.1 Aufbau und Wirkung**

Cisplatin besteht aus einem quadratisch planaren Komplex mit zweiwertigem Platin als Zentralatom. An das Platinatom sind cis-ständig zwei einfach negativ geladene Chloridliganden gebunden sowie gegenüberstehend zwei kovalent gebundene Ammoniumgruppen (70-72). Da Cisplatin schlecht wasserlöslich ist, wird es dem Patienten intravenös als Infusion verabreicht und gelangt anschließend durch Diffusion oder verschiedene Transportproteine (z. B. durch den Kationentransporter OCT2 oder den Kupfertransporter CTR1) in die Zelle (70-72). Da im Gegensatz zum Extrazellularraum intrazellulär eine deutlich niedrigere Chloridkonzentration herrscht, kommt es zur Hydrolyse des Komplexes, wobei einer oder beide der Chloridliganden durch Wassermoleküle ersetzt werden. So entsteht ein Monoaqua- oder Diaquakomplex ( $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^{2+}$ ), der leichter mit zellulären Bestandteilen, wie RNA, Proteinen, Membranphospholipiden und auch der DNA reagieren kann (72). Der so entstandene Diaquakomplex diffundiert weiter in den Zellkern und interagiert mit den Stickstoffatomen der Nukleinsäuren und führt so zu Änderungen der DNA-Struktur. Cisplatin bindet bevorzugt an das N7-Atom der Purinbase Guanin und kann somit die DNA schädigen, die Zellteilung blockieren und zum apoptotischen Zelltod führen (73, 74). Es kommt primär zur Ausbildung von DNA-Monoaddukten, die wiederum zum Großteil sekundär durch Vernetzungen innerhalb eines DNA-Stranges (Intrastrangverknüpfung) oder zwischen benachbarten DNA-Strängen (Interstrangverknüpfung) bivalente Verknüpfungen ausbilden. Fast alle diese

Querverbindungen stellen Intrastrangverknüpfungen dar. Die meisten der Intrastrangverknüpfungen bestehen aus zwei benachbarten Guaninen innerhalb eines DNA-Strangs (1,2-d(GpG)-Addukte) (75, 76). Die gebildeten Addukte begünstigen die Entstehung von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen und blockieren sowohl die Replikation als auch die Transkription (77, 78). Die entstandenen DNA-Schäden führen unter anderem durch den ATR-Chk1-Signalweg (s. Abbildung 2) zur Aktivierung der DNA-Schadensantwort, wodurch ein Zellzyklusarrest sowie unterschiedliche DNA-Reparaturmechanismen induziert werden (s. 1.2.1). Wird die Reparaturkapazität der Zelle durch einen zu ausgeprägten DNA-Schaden überschritten, kommt es zum Zelltod durch Apoptose (79, 80).

### **1.3.2 Nebenwirkungen**

Die Platinderivate Cisplatin, Oxaliplatin und Carboplatin unterscheiden sich unter anderem im Hinblick auf Ihre unerwünschten Nebenwirkungen. Wie die meisten Zytostatika wirken Platinderivate insbesondere auf sich schnell teilende Zellen. So schädigt eine Therapie nicht nur Tumorzellen, sondern auch gesundes Gewebe. Die bekanntesten Nebenwirkungen von Cisplatin sind seine Ototoxizität, Übelkeit und Erbrechen, Myelosuppression sowie die Nephro- und Neurotoxizität (s. u.) (81-84). Unter Behandlung mit Cisplatin können Krebszellen eine Resistenz gegenüber dem Zytostatikum entwickeln. Hieran sind viele Mechanismen beteiligt wie zum Beispiel Veränderungen im Transport und Metabolismus, veränderte DNA-Reparatur und Checkpoint-Signalisierung, Umgehung der Apoptose sowie genomische Veränderungen der Krebszelle, die durch die Cisplatinexposition hervorgerufen werden (85). Carboplatin (cis-Diammin(1,1-Cyclobutandicarboxylato)platin(II)) stellt das Platinmedikament der zweiten Generation dar und wurde entwickelt, um die dosislimitierende Toxizität von Cisplatin zu verringern (65). Carboplatin weist aufgrund seines zweizähligen Cyclobutandicarboxylatliganden eine verringerte Reaktivität auf. Dadurch sind die Neurotoxizität und Ototoxizität nach Carboplatinabgabe im Vergleich zu Cisplatin weniger ausgeprägt. Die dosislimitierende Nebenwirkung von Carboplatin stellt die Myelosuppression dar, die sich hauptsächlich in einer Thrombozytopenie, aber auch in einer Granulozytopenie und Anämie äußert (64, 65, 86). Die Myelosuppression kann schnell lebensbedrohliche Ausmaße annehmen, ist bei

korrekter Behandlung jedoch meist vollständig reversibel (87). So lässt sich eine Chemotherapie-induzierte Anämie und Thrombozytopenie durch Transfusion von Erythrozytenkonzentraten und Thrombozytenkonzentraten ausgleichen oder die Eigenproduktion von Erythrozyten wird durch Gabe von rekombinantem humanen Erythropoetin angeregt. Patienten mit symptomatischer, fieberhafter Leukozytopenie erhalten eine antibiotische und antimykotische Therapie. Außerdem können hämatopoetische Wachstumsfaktoren wie G-CSF (*Granulocytes-Colony stimulating Factor*, granulozytenkoloniestimulierender Faktor) und GM-CSF (*Granulocytes-Macrophages-Colony stimulating Factor*, Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor) substituiert werden, um die Proliferation, Ausreifung und Freisetzung von neutrophilen Granulozyten zu steigern (88). Das Platinderivat der dritten Generation Oxaliplatin ist ein Platinkomplex mit 1,2-Diaminocyclohexan (DACH)-Ligand und Oxalat als Abgangsgruppe und war das erste zugelassene Platinderivat, das die Cisplatinresistenz überwinden konnte (64). Das zweizählige Oxalat in Oxaliplatin reduziert seine Reaktivität und begrenzt dadurch seine toxischen Nebenwirkungen. Als dosislimitierend wurde die periphere sensorische Neuropathie beschrieben, die in zwei verschiedenen Ausprägungen auftritt (65). Zum einen kann bereits während oder innerhalb von Stunden (h) nach der Oxaliplatingabe eine akute Neurotoxizität auftreten, die vor allem durch kälteinduzierte Dysästhesien gekennzeichnet und schnell reversibel ist. Zum anderen ist eine periphere sensorische Neuropathie im Zusammenhang mit der kumulativen Dosis beschrieben, welche nur moderat und langsam reversibel ist (86, 89). Bei sehr stark ausgeprägten Nebenwirkungen ist wegen der beträchtlichen Verminderung der Lebensqualität der Patienten eine Dosisreduktion erforderlich. Diese beeinträchtigt den Therapieerfolg und kann zur Entstehung von Resistenzen beitragen.

#### *1.3.2.1 Nephrotoxizität*

Die Nephrotoxizität stellt in der Behandlung mit Cisplatin die hauptsächlich dosislimitierende Nebenwirkung dar. 20 % der Patienten, die eine hochdosierte Cisplatintherapie erhalten, erleiden eine schwere Nierenfunktionsstörung (90). In der Regel wirken Zytostatika vor allem auf sich schnell teilende Zellen toxisch. Die Niere reichert Cisplatin jedoch deutlich stärker an als andere Organe und stellt auch den Hauptausscheidungsweg von Cisplatin dar (90). Die Schädigung der Niere erfolgt

hauptsächlich am S3-Segment des proximalen Tubulus, da die Cisplatin-Konzentrationen in proximalen tubulären Epithelzellen um den Faktor fünf höher liegen als die Plasmakonzentrationen von Cisplatin (91). Dies ist unter anderem auf den humanen organischen Kationentransporter (hOCT 2) zurückzuführen (90, 92). Es gibt unterschiedliche Isoformen des Kationentransporters. So findet sich die Isoform hOCT 1 vor allem in der Leber, transportiert jedoch kein Cisplatin. Die Isoform hOCT 2 findet sich vor allem in den Zellen der proximalen Nierentubuli und befördert Cisplatin hier in die Zelle (92). Dies verursacht eine organspezifische Schädigung der Niere durch die Akkumulation von Cisplatin in den proximalen Tubuli. Auch ein verminderter Export aus den tubulären Epithelzellen kann eine Mehranreicherung von Cisplatin zur Folge haben. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass Entzündungen, oxidativer Stress und Apoptose einen Teil der Nephrotoxizität von Cisplatin ausmachen (90). Morphologisch zeigt sich die Toxizität von Cisplatin in der Niere durch tubuläre Nekrosen, Verlust von Mikrovilli, Veränderungen von Anzahl und Größe der Lysosomen und mitochondrialer Vakuolisierung (91). Klinisch äußert sich dies in einem akuten Nierenversagen, chronisch interstitieller Nephritis, nephrotischem Syndrom oder dem De-Toni-Debré-Fanconi-Syndrom (83). In der Klinik wird die Verschlechterung der Nierenfunktion durch erhöhten Serumharnstoff und Kreatininwert sowie einer Verminderung der errechneten glomerulären Filtrationsrate (GFR) nachgewiesen (93). Die Gefahr der akuten und chronischen Niereninsuffizienz besteht zum einen in der Hyperhydratation mit Hypertonus, Ödembildung oder Lungenödem, zum anderen im Anstieg harnpflichtiger Substanzen im Plasma (Urämie), was zu Hämolyse, Pleuritis, Perikarditis, Polyneuropathie oder Enzephalopathie mit Krampfanfällen bis zum Koma führen kann. Zudem entsteht ein Ungleichgewicht im Säure-Base-Haushalt. Diese Imbalance bewirkt eine metabolische Azidose durch pH-Änderungen sowie Elektrolytstörungen, in deren Folge Herzrhythmusstörungen auftreten können. Auch die endokrine Funktion der Niere kann gestört sein, was eine renale Anämie oder renale Osteopathie zur Folge haben kann. Eine Möglichkeit die Nephrotoxizität zu verringern ist die intensive parenterale Hydratation und eine Mannit-induzierte Diurese (94). Bei fortschreitendem Nierenversagen stellt das Absetzen der Therapie die einzige Option dar um die oben genannten Folgen und einen eventuell drohenden letalen Ausgang zu vermeiden (91). Durch den

Therapieabbruch kann eine für den Therapieerfolg ausreichend hohe Konzentration des Zytostatikums im Tumor nicht mehr erreicht werden und es kann zur Resistenzbildung der Tumorzellen gegenüber Cisplatin kommen.

### *1.3.2.2 Neurotoxizität*

Die Neurotoxizität von Cisplatin wirkt sich vor allem auf die Lebensqualität der Patienten aus, weniger auf die Lebenserwartung. Platininduzierte neurologische Ausfälle sind nicht oder nur teilweise rückbildungsfähig und mindern so die Lebensqualität der Patienten langfristig (87). Cisplatin-induzierte Neurotoxizität kann in vielen unterschiedlichen Formen auftreten, zum Beispiel als Chemotherapie-induzierte Neuropathie (CIPN), autonome Dysfunktion, Hörverlust oder Tinnitus (87). Der Hörverlust kann sowohl durch die Schädigung des Nervus cochlearis selbst als auch durch Schädigung der äußeren Haarzellen der Cochlea bedingt sein. Die Schädigung der äußeren Haarzellen entsteht durch die Cisplatin-induzierte Bildung von hochreaktiven Sauerstoffradikalen oder den Abbau von Glutathion (86). Die Chemotherapie-induzierte Neuropathie stellt eine dosislimitierende Nebenwirkung mehrerer First-Line-Chemotherapeutika dar (z. B. von Platinverbindungen (Cisplatin, Oxaliplatin), Vinca-Alkaloiden (Vincristin), Taxanen (Paclitaxel) und Proteasom-Inhibitoren (Bortezomib)) (95), wobei Verbindungen auf Platinbasis im Vergleich zu anderen Chemotherapeutika zu länger anhaltenden neuropathischen Symptomen führen (96). Die CIPN kann akut während einer Chemotherapie (z. B. bei Oxaliplatin) oder erst nach Abschluss der Behandlung auftreten (95) und umfasst Symptome wie Taubheitsgefühl, Kribbeln und Parästhesien der Extremitäten, verminderte Reflexe, spontane oder anhaltende Schmerzen sowie Beinschwäche mit Gangstörungen (86). Man unterscheidet eine zentrale von einer peripheren Neurotoxizität. Letztere tritt bei bis zu 50 % der Patienten unter Cisplatintherapie auf (97). Die Neurotoxizität kann durch die kumulative Dosis (Cisplatin-induzierte periphere Neuropathie) oder durch sehr hohe Spitzenkonzentrationen (Cisplatin-induzierter Hörverlust) des Zytostatikums induziert sein (98, 99). Das heutige Wissen über die genaue Pathophysiologie der Cisplatin-induzierten Neurotoxizität ist limitiert. Cisplatin scheint als Kalziumkanalblocker zu wirken und so die intrazelluläre Kalziumhomöostase zu verändern. Dies führt zur Apoptose exponierter Neuronen, zu denen die Neuronen in den Spinalganglien des Rückenmarks gehören, was eine sensorische Neuropathie

verursacht (86). Präventive Strategien zur Neuroprotektion sind bisher unzureichend und können die Toxizität des Zytostatikums nicht ausreichend verhindern (96, 100, 101). Die rein symptomatische Behandlung der peripheren Neurotoxizität beschränkt sich derzeit auf Duloxetin, welches in einer einzelnen randomisierten Phase-III-Interventionsstudie mit einer signifikanten Verringerung der neuropathischen Schmerzen einherging. Duloxetin ist ein Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SSNRI; Selektiver Serotonin-Noradrenalin-Reuptake-Hemmer), dessen analgetische Wirkung auf der Blockierung von Serotonin- und Noradrenalintransportern sowie der Blockierung von Natriumkanalströmen beruht (96). Bei stark ausgeprägten neurotoxischen Nebenwirkungen stellt das Absetzen der Therapie jedoch die einzige Möglichkeit dar Langzeitschäden zu vermeiden.

Bei Medulloblastompatienten wird häufig zusätzlich zur Chemotherapie eine Bestrahlung von Gehirn oder Rückenmark nötig. Diese führt alleine und besonders in Kombination mit anderen neurotoxischen Medikamenten wie Cisplatin oder dem ebenfalls in der Therapie des Medulloblastoms eingesetzten Mitosehemmstoff Vincristin zu neurologischen Ausfällen und bei Kindern zu Wachstumsverzögerungen und langfristig zur Intelligenzminderung (20, 102). Vincristin gehört zu den am häufigsten verwendeten Chemotherapeutika zur Behandlung von Krebserkrankungen im Kindesalter (103). Es hemmt das Tumorstadium durch Interferenz mit den Mikrotubuli der mitotischen Spindel. Die dosislimitierende Nebenwirkung von Vincristin stellt die periphere Neuropathie dar. Diese macht sich meist als symmetrische sensorisch-motorische Neuropathie bemerkbar. Außerdem kann es zu einer autonomen Polyneuropathie kommen, die sich durch Obstipation oder orthostatische Hypotonie äußern kann. Die Symptome entwickeln sich häufig bereits nach wenigen Vincristin-Gaben und sind oft einige Monate nach Absetzen der Therapie vollständig reversibel. Jedoch können auch Langzeitfolgen wie der dauerhafte Verlust tiefer Sehnenreflexe oder dauerhaft verminderte motorische Funktionen auftreten (103). Die Kombinations-Chemotherapie aus mehreren neurotoxisch wirkenden Zytostatika wie Cisplatin und Vincristin wird oft im palliativen Rahmen zur Lebensverlängerung und Linderung von durch Tumoren induzierten Symptomen, wie beispielsweise Schmerzen, eingesetzt. In dieser Situation muss genau abgewogen

werden, ob die Lebensqualität der Patienten durch die Therapie zu sehr in Mitleidenschaft gezogen wird, obwohl eine Heilung ausgeschlossen scheint. So muss die Therapie abgebrochen werden, um das Risiko signifikanter neurotoxischer Ereignisse zu minimieren. Ein Ziel zur Verbesserung der Medulloblastom-Therapie ist daher die Erforschung neuartiger Behandlungsansätze um die Dosis neurotoxischer Zytostatika (wie Cisplatin oder Vincristin) reduzieren zu können und trotzdem einen langfristig kurativen Effekt zu erzielen. Eine Möglichkeit die Cisplatinosis zu reduzieren wäre die Aufhebung des G<sub>2</sub>- und M-Checkpoints durch eine Chk1-Inhibition. Die durch Zytostatika erzeugten DNA-Schäden führen zum Zelltod oder zur Aktivierung der DNA-Schadensantwort durch den ATR-Chk1-Signalweg (s. 1.2.1). Zellzyklusstillstand und DNA-Reparaturmechanismen schützen die Integrität von humanen Zellen, können jedoch auch die Wirksamkeit der Zytostatikatherapie verringern, indem erzeugte DNA-Schäden behoben werden oder die Resistenzentwicklung in Tumorzellen erleichtert wird (104). Daher könnte die Inhibition des ATR-Chk1-Signalwegs durch Aufhebung des G<sub>2</sub>- und M-Checkpoints einen therapeutischen Weg bieten, um Tumorzellen selektiv für eine Chemotherapie zu sensibilisieren und durch eine Dosisreduktion der Zytostatika adverse Langzeiteffekte zu reduzieren. Ein weiterer Ansatz für die Erforschung neuer Therapiestrategien könnten Onkogen-bezogene Targeting-Ansätze sein, zum Beispiel in c-Myc-Onkogen-abhängigen Tumoren. Eine C-Myc-Überexpression führt zu starkem replikativem Stress (12, 42, 43, 56, 62, 63), den die Zelle durch den ATR-Chk1-Signalweg reduziert und so DNA-Schäden und schädlichen genetischen Instabilitäten entgegen wirkt (s. 1.2.1.2). Dies steht in Einklang mit der Beobachtung, dass Zellen, die eine hohe c-Myc-Expression aufweisen, besonders empfindlich auf Replication-Stress-Response-Inhibitoren (RSR-Inhibitoren) wie Chk1-Inhibitoren oder ATR-Inhibitoren reagieren (12, 42, 43). Dies macht Chk1 als Angriffspunkt in c-Myc-exprimierenden Medulloblastomzellen zur Sensibilisierung der Tumorzellen für eine Zytostatikatherapie besonders interessant. Des Weiteren wird der ATR-Chk1-Signalweg bei einer P53-Mutation häufiger genutzt und ist für die Lebensfähigkeit der Krebszellen erforderlich (s. 1.2.1.1 ) (44). Daher sind ATR und Chk1 auch für Tumorzellen mit P53-Mutation als Target für die gezielte Therapie sehr interessant.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Bis heute haben Patienten mit einem Hochrisiko-Medulloblastom eine schlechte Prognose (20). Vor allem Patienten mit Hochrisiko-Medulloblastomen erhalten eine intensive Radio- und Chemotherapie. Ein Teil der Standardbehandlung des Medulloblastoms ist das Zytostatikum Cisplatin (69). Die bekanntesten Nebenwirkungen von Cisplatin sind seine Ototoxizität, Übelkeit und Erbrechen, Myelosuppression sowie die Nephro- und Neurotoxizität (81-84). Die Neurotoxizität von Cisplatin wirkt sich vor allem auf die Lebensqualität der Patienten aus. Platininduzierte neurologische Ausfälle sind nicht oder nur teilweise rückbildungsfähig und mindern so die Lebensqualität der Patienten langfristig (87). Präventive Strategien zur Neuroprotektion von Cisplatin sind bisher unzureichend und können die Toxizität des Zytostatikums nicht ausreichend verhindern (96, 100, 101). Bei stark ausgeprägten neurotoxischen Nebenwirkungen stellt das Absetzen der Therapie die einzige Möglichkeit dar Langzeitschäden zu vermeiden. Der Therapieabbruch führt zur Resistenzentwicklung der Tumorzellen gegenüber Cisplatin und verschlechtert die Prognose der Patienten weiter. Daher ist es wichtig, alternative Therapien zu entwickeln, vorzugsweise durch Onkogen-bezogene Targeting-Ansätze, die insbesondere bei Hochrisiko-Medulloblastomen die Prognose verbessern und adverse Effekte mindern.

In dieser Arbeit soll die molekulare Wirkung von Cisplatin im Hinblick auf die Zytotoxizität sowie die resultierende DNA-Schadensantwort an humanen Medulloblastomzellen mit und ohne c-Myc-Amplifikation untersucht werden. Hierzu wurden die beiden Medulloblastomzelllinien HD-MB03 sowie UW228-2 ausgewählt. UW228-2-Zellen gehören zu den Medulloblastomzellen mit SHH-Aktivierung und weisen eine niedrige c-Myc-Expression auf. HD-MB03-Zellen werden zu den Gruppe 3 Medulloblastomzellen gezählt und weisen eine c-Myc-Amplifikation auf. Die c-Myc-Amplifikation führt zu replikativem Stress in Zellen, der wiederum über den Chk1-Signalweg reduziert wird (42). C-Myc-überexprimierende Zellen, wie HD-MB03-Zellen, reagierten in Studien bereits besonders empfindlich auf Replication-Stress-Response-Inhibitoren (RSR-Inhibitoren) wie Chk1-Inhibitoren (42). Dies stellt einen möglichen Ansatzpunkt für den Einsatz von Chk1-Inhibitoren dar. Daher soll in dieser Arbeit ebenfalls die molekulare Wirkung des Chk1-Inhibitor AZD-7762 auf

Medulloblastomzellen mit (HD-MB03-Zellen) und ohne (UW228-2-Zellen) c-Myc-Amplifikation untersucht werden. Auf diese Weise soll analysiert werden, ob eine c-Myc-Überexpression zu Unterschieden in der antitumorigenen Wirkung von AZD-7762 in Medulloblastomzellen führt. Ein weiteres Ziel ist es durch das Eingreifen in den Zellzyklus mittels Chk1-Inhibition die Cisplatin-Sensitivität zu erhöhen um die Therapie des Medulloblastoms effektiver und nebenwirkungsärmer gestalten zu können. Daher soll untersucht werden, ob subtoxische Konzentrationen des Chk1-Inhibitors die schädigende Wirkung von Cisplatin in den beiden Medulloblastomzellen potenzieren kann. Darüber hinaus sollen ungünstige Effekte von Cisplatin und AZD-7762 auf primäres Gewebe untersucht werden, um mögliche adverse Effekte der beiden Substanzen durch eine *in vitro*-Untersuchung besser einschätzen zu können. Da die Patienten unter der herkömmlichen Therapie langfristig besonders unter neurologischen Ausfällen leiden (20, 102), sollten für die Untersuchungen Neurone und Gliazellen hinsichtlich ihrer Sensitivität auf die Substanzen untersucht werden. Ziel dieser Arbeit ist es somit zu überprüfen, ob der Chk1-Inhibitor AZD-7762 *in vitro* Medulloblastomzellen für eine Cisplatintherapie sensibilisieren kann ohne eine gravierende Wirkung auf primäres Gewebe auszuüben und so die therapeutische Breite von Cisplatin erweitern kann. Ein wichtiger Aspekt hierbei ist, dass die Chk1-Inhibition auch Hochrisiko-Medulloblastome (wie c-Myc-amplifizierten Gruppe 3 Medulloblastome) für den Cisplatin-induzierten Viabilitätsverlust sensibilisiert. Damit soll die experimentelle Grundlage zur Entwicklung einer nebenwirkungsärmeren aber ebenso effizienten Therapie geschaffen werden, die die Prognose insbesondere von Patienten mit Hochrisiko-Tumoren verbessern kann.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien

Tabelle 2: Verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Hersteller
UW228-2	Department of Neurological Surgery, University of Washington
HD-MB03	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

#### 2.1.2 Medien und Medienzusätze

Tabelle 3: Medien und Medienzusätze

Bezeichnung	Hersteller
B-27 <sup>®</sup> Supplement (50X)	Thermo Fisher Scientific Inc.
DMEM	Sigma-Aldrich
DMEM ohne Phenolrot	Sigma-Aldrich
DMEM + GlutaMAX <sup>™</sup>	Life Technologies
Fetal calf serum (FCS)	Merck Millipore
Fungizone <sup>®</sup>	Thermo Fisher Scientific Inc.
HBSS (10 x) (-Ca/-Mg)	Thermo Fisher Scientific Inc.
HEPES (1 M)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Horse Serum	Thermo Fisher Scientific Inc.
Natrium-Pyruvat (100 mM)	Life Technologies
Neurobasal <sup>®</sup> Medium	Thermo Fisher Scientific Inc.
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich
RPMI-1640	Sigma-Aldrich
Wasser, steril filtriert	Sigma-Aldrich

#### 2.1.3 Chemikalien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
APS	Merck KGaA
Borax (di-Natriumtetraborat-10-hydrat)	Merck Millipore
Borsäure	Carl Roth GmbH und Co. KG
BSA	Merck Millipore
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich
DMSO	Merck Millipore
EDTA	Sigma-Aldrich

Essigsäure	Carl Roth GmbH und Co. KG
Ethanol	Merck Millipore
Formaldehyd (37 %)	Carl Roth GmbH und Co. KG
Glycin	Carl Roth GmbH und Co. KG
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %)	Sigma-Aldrich
HCl	Carl Roth GmbH und Co. KG
Isopropanol	VWR International GmbH
KCl	Sigma-Aldrich
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Carl Roth GmbH und Co. KG
Luminol	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH und Co. KG
Methanol	VWR International GmbH
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck KGaA
Na-Acetat	Carl Roth GmbH und Co. KG
Na-Citrat	Merck KGaA
Na-Resazurin	Sigma-Aldrich
NaCl	VWR International GmbH
NaOH	Merck KGaA
para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich
Poly-D-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich
Ponceau-S	Sigma-Aldrich
Propidiumiodid	Carl Roth GmbH und Co. KG
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH und Co. KG
SDS	SERVA Electrophoresis GmbH
TEMED	Carl Roth GmbH und Co. KG
Tris-Base	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Tween 20	Merck KGaA

#### 2.1.4 Lösungen und Puffer

Tabelle 5: Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blottingpuffer	192 mM Glycin 20 % Methanol 250 mM Tris-Base

Borat-Puffer	0,95 g Borax 0,62 g Borsäure 200 ml H <sub>2</sub> O pH 8,4; steril filtrieren
DNase-Lösung	100 mg DNase I 10 ml 1x HBSS pH 7,0 – 7,8; steril filtrieren
ECL-Lösung	3 ml Lösung A 30 µl Lösung B 3 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %)
Elektrophoresepuffer alkalisch (pH > 13)	1 mM EDTA 300 mM NaOH
Elektrophoresepuffer neutral (pH 7,5)	90 mM Borsäure 2 mM EDTA 90 mM Tris-Base
Glia-Medium	500 ml DMEM + GlutaMAX 5,75 ml Fungizone (1 %) 57,47 ml Horse Serum (10 %) 5,75 ml Na-Pyruvat (1 %) 5,75 ml Penicillin/Streptomycin (1 %)
1x HBSS + 10 mM HEPES	225 ml H <sub>2</sub> O 25 ml 10x HBSS (-Ca/-Mg) 2,53 ml 1 M HEPES pH 7,3, steril filtrieren
Lösung A	50 mg Luminol in 200 ml 100 mM Tris-HCl pH 8,6
Lösung B	10 ml DMSO 11 mg para-Hydroxycoumarinsäure
NaCl/P <sub>i</sub> -Puffer	154 mM NaCl 3,77 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,06 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
NB/B27	5,26 ml B-27 (2 %) 2,63 ml Fungizone (1 %) 2,63 ml Na-Pyruvat (1 %) 250 ml Neurobasal Medium 2,63 ml Penicillin/Streptomycin (1 %)
NB/FCS	13,7 ml FCS (5 %) 2,79 ml Fungizone (1 %) 2,79 ml Na-Pyruvat (1 %) 250 ml Neurobasal Medium 2,79 ml Penicillin/Streptomycin (1 %)
Neutralisationspuffer	0,4 M Tris-Base pH 7,5

PBS (pH 7,4)	2,7 mM KCl 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 137 mM NaCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
PBS high salt	2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,7 mM KCl 400 mM NaCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
PBST	PBS 0,3 % (v/v) Triton X-100
Ponceau-S-Lösung	5 ml/l Essigsäure 1,5 g/l Ponceau-S
Poly-D-Lysin-Lösung (PDL)	10 ml Borat-Puffer 100 mg Poly-D-Lysin Steril filtrieren
Resazurinlösung	9999 ml NaCl/P <sub>i</sub> -Puffer 1 ml Resazurinstocklösung
Resazurinstocklösung	440 mM Na-Resazurin in Dimethylformamid
Sammelgel (5 %)	1,3 ml Acrylamid 30 % (Rotiphorese® Gel 30) 80 µl APS (100 g/l) 5,5 ml MilliQ-H <sub>2</sub> O 160 µl SDS 10 % 80 µl TEMED 10 % 1 ml 1.5 M Tris-Base pH 6.8
SDS-Laufpuffer	192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS 25 mM Tris-Base
TBS	150 mM NaCl 50 mM Tris-Base pH 7,4
TBST	TBS 0,05 % (v/v) Tween 20
Trenngel (6 %)	4 ml Acrylamid 30 % (Rotiphorese® Gel 30) 200 µl APS (100 g/l) 10,4 ml MilliQ-H <sub>2</sub> O 200 µl SDS 10 % 160 µl TEMED 10 % 5 ml 1,5 M Tris-Base pH 8,8

Trenngel (12 %)	8 ml Acrylamid 30 % (Rotiphorese® Gel 30) 200 µl APS (100 g/l) 6,5 ml Milli-Q-H <sub>2</sub> O 200 µl SDS 10 % 80 µl TEMED 10 % 5 ml 1,5 M Tris-Base pH 8,8
-----------------	--

## 2.1.5 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Bezeichnung	Hersteller
6-Well Platten	Greiner Bio-One International AG
12-Well-Platten	Greiner Bio-One International AG
24-Well-Platten	Greiner Bio-One International AG
96-Well Platten	Greiner Bio-One International AG
Deckgläser 18 x 18 mm	VWR International GmbH
EASYstrainer™ Zellsiebe	Greiner Bio-One International AG
Einfrierröhren Cryo.s™	Greiner Bio-One International AG
Falcon 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One International AG
Filterspitzen 10 µl, 20 µl	Biozym Scientific GmbH
Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co. KG
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Starlab
Reaktionsgefäß 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt
Spritzen Braun Injekt 5 ml, 20 ml	B. Braun Melsungen AG
Sterilfilter 0,2 µM, 0,45 µM	VWR International GmbH
Stepper Tips 20 µl, 100 µl	Eppendorf AG
Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One International AG
Zellkulturschalen Ø: 3,5 cm, 6 cm	Greiner Bio-One International AG

## 2.1.6 Antikörper

### 2.1.6.1 Primärantikörper

**Tabelle 7: Auflistung der Primärantikörper**

Name	Spezies	Bezugsquelle	Verdünnung
53BP1	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1 : 1000
β-Actin	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1 : 1000
Anti-MAP2	Maus	Sigma-Aldrich	1 : 500
ERK2 (C-14)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1 : 1000

GAPDH	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1 : 1000
γH2AX (S139)	Maus	Merck Millipore	1 : 500
PARP-1 (H-250)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1 : 1000
p-ATM (S1981)	Maus	Abcam	1 : 500
p-ATR (S428)	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1 : 500
p-CHK1 (S345)	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1 : 1000
p-CHK2 (pT68)	Kaninchen	Abcam	1 : 1000
p-H3 (S10)	Kaninchen	Thermo Fisher Scientific, Inc.;	1 : 50
		HCS Mitotic Index Kit	
p-KAP1 (S824)	Kaninchen	Bethyl Laboratories	1 : 1000
p-P38 (Thr189/Tyr182)	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1 : 1000
p-P53 (Ser15)	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1 : 1000
p-RPA32 (S4/S8)	Kaninchen	Bethyl Laboratories	1 : 1000
Talin-1	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1 : 1000

### 2.1.6.2 Sekundärantikörper

**Tabelle 8: Auflistung der Sekundärantikörper**

Name	Spezies	Bezugsquelle	Verdünnung
Alexa Fluor® 488	Ziege anti-Maus	Thermo Fisher Scientific, Inc.	1 : 500
Alexa Fluor® 488	Ziege anti-Kaninchen	Thermo Fisher Scientific, Inc.	1 : 500
Alexa Fluor® 546	Ziege anti-Kaninchen	Thermo Fisher Scientific, Inc.	1 : 500
Alexa Fluor® 546	Ziege anti-Maus	Thermo Fisher Scientific, Inc.	1 : 500

### 2.1.7 Enzyme

**Tabelle 9: Verwendete Enzyme**

Bezeichnung	Hersteller
RNase	SERVA Electrophoresis GmbH
DNase-freie RNase	Qiagen
Trypsin-EDTA-Lösung (10 x)	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA-Lösung 0,05 %	Sigma-Aldrich

## 2.1.8 Kits

**Tabelle 10: Verwendete Kits**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
EdU-Click 488	Baseclick GmbH
HCS Mitotic Index Kit	Life Technologies

## 2.1.9 Geräte

**Tabelle 11: Geräte**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Binokulares Mikroskop	Carl Zeiss AG
Blottingsystem Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad
ChemiDoc™ Touch Imaging System	Bio-Rad
CO2-Inkubator Serie CB	Binder GmbH
Dokumentationssystem Fusion	Peqlab Biotechnologie GmbH
Durchflusszytometer BD Accuri™ C6	Becton, Dickinson and Company
Elektrophoresekammer	Peqlab Biotechnologie GmbH
Feinwaage Kern ABS	Kern & Sohn GmbH
Flockeneisbereiter SPR-80	NordCap®
Fluoreszenzmikroskop BX43	Olympus
Gelelektrophoreseapparatur Mini PROTEAN® Tetra Cell System	Bio-Rad
Heizblock Drybath System	Starlab
Heizplatte/Magnetrührer Combimag Ret	IKA-Werke GmbH & Co. KG
Kühlzentrifuge MIKRO 200 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG
Laborschüttler SWIP SM25-C	Edmund Bühler GmbH
Mikroliterpipetten Pipetman classic 10 µl,	Gilson
Mikrotiterplatten-Lesegerät Infinite®	Tecan Group AG
Milli-Q® Advantage A10 System	Merck Millipore
Mini Rocker-Shaker MR-1	Biosan
Mini-Zentrifuge	Neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs
Multipette® plus	Eppendorf AG
Netzgerät PowerPac™ Basic Power	Bio-Rad™
Personal Bio-Vortex V-1 plus	Peqlab Biotechnologie GmbH
Mini-PROTEAN® Tetra Cell Elektrophorese-System	BioRad
Roto-Shake Genie®	Scientific Industries Inc.
Sonifiziergerät EpiShear™ Probe sonicator	Active Motif
Sterilbank Hera Safe	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Thermomixer® compact	Eppendorf AG
Waage 3716MP	Sartorius

Wärme-/Trockenschrank	Memmert GmbH & Co. KG
Wasserbad W22	GK Sondermaschinenbau GmbH
Zählkammer Neubauer-Improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Zentrifuge Heraeus™ Multifuge™ X1	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Zentrifuge Perfect Spin P	Peqlab Biotechnologie GmbH
Zentrifuge Universal 320	Andreas Hettich GmbH & Co.KG

### 2.1.10 Software

**Tabelle 12: Computersoftware**

Bezeichnung	Hersteller
BD Accuri™ C6	Becton, Dickinson and Company
CellSens Dimension	Olympus
Fusion Software Version 15.17	Vilber Lourmat Deutschland GmbH
GraphPad Prism 5.01	GraphPad
Software ImageJ	<a href="https://imagej.nih.gov/ij/">https://imagej.nih.gov/ij/</a>

### 2.1.11 Sonstige Materialien

**Tabelle 13: Weitere verwendete Materialien**

Bezeichnung	Hersteller
Chk-Inhibitor AZD-7762	Sigma Aldrich
Chromatographie-Papier Whatman™	GE Healthcare
Cisplatin	Teva Pharmaceutical Industries Ltd.
Glasflaschen	Schott AG
Glaspipetten 5 ml, 10 ml, 20 ml	Brand GmbH und Co. KG
Isofluran	AbbVie
Nitrozellulosemembran Amersham™	GE Healthcare
Protran™ 0,2 µM	
Öl Immersion Oil Type-F	Olympus
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc.
Roti®-Load-Puffer	Carl Roth GmbH und Co. KG
Vectashield®	Vector Laboratories
Wistar-Ratten	Janvier Labs
Zellschaber	Greiner Bio-One International AG
Zellzähler	Infactory

## 2.1.12 Herstellernachweise

**Tabelle 14: Herstellerhauptsitze**

<b>Hersteller</b>	<b>Sitz</b>
AbbVie	North Chicago, Illinois, USA
Abcam	Cambridge, UK
Active Motif	La Hulpe, Belgien
Andreas Hettich GmbH & Co.KG	Tuttlingen, Deutschland
B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Baseclick GmbH	Tutzing, Deutschland
Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Bethyl Laboratories	Montgomery, USA
Binder GmbH	Tuttlingen, Deutschland
BioRad	Hercules, Kalifornien, USA
Biosan	Riga, Lettland
Biozym Scientific GmbH	Oldendorf, Deutschland
Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Carl Roth GmbH und Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Carl Zeiss AG	Jena, Deutschland
Cell Signaling Technology	Denver, Massachusetts, USA
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	Braunschweig, Deutschland
Edmund Bühler GmbH	Hechingen, Deutschland
Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
GE Healthcare	Little Chalfont, UK
Gilson	Middleton, Wisconsin, USA
GK Sondermaschinenbau GmbH	Arnsdorf, Deutschland
GraphPad	La Jolla, Kalifornien, USA
Greiner Bio-One International AG	Kremsmünster, Österreich
IKA-Werke GmbH & Co. KG	Staufen, Deutschland
Janvier Labs	Le Genest-Saint-Isle, Pays de la Loire, Frankreich
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
Neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs	Heidelberg, Deutschland
NordCap®	Bremen, Deutschland
Olympus	Shinjuku, Japan
Paul Marienfeld GmbH & Co. KG	Lauda-Königshofen, Deutschland
Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen, Deutschland

Qiagen	Hilden, Deutschland
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
Tecan Group AG	Männedorf, Schweiz
Teva Pharmaceutical Industries Ltd.	Petach Tikva, Israel
Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
VWR International GmbH	Radnor, Pennsylvania, USA
Vector Laboratories	Burlingame, Kalifornien, USA
Vilber Lourmat Deutschland GmbH	Eberhardzell, Deutschland

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultivierung

Die beiden humanen Medulloblastomzelllinien UW228-2 (Dr. Marc Remke, Universität Düsseldorf) und HD-MB03 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) wurden bei einer Temperatur von 37 °C in einem Inkubator mit einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % kultiviert. Die c-Myc-amplifizierte Zelllinie HD-MB03 wurde in RPMI-1640 (am *Roswell Park Memorial Institute* entwickelt) und die nicht-c-Myc-amplifizierte Zelllinie UW228-2 in DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium*) in Kultur gehalten, beide jeweils mit 10 % fetalem Kälberserum (*fetal calf serum*; FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin. Bei einer ausreichenden Konfluenz von 80 % bis 90 % wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA abgelöst (UW228-2: 3 min, HD-MB03: 5 min), anschließend vereinzelt und neu ausgesät. Für die Durchführung von Zellexperimenten wurden die Zellen 24 h vor Versuchsbeginn ausgesät. Je nach Experiment wurden die Zellen anschließend mit Cisplatin oder dem Checkpoint-Kinase-Inhibitor AZD-7762 behandelt.

Die primär aus Rattenembryonen gewonnenen Neurone und Gliazellen wurden ebenfalls bei 37 °C und einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Neurone wurden für 24 h in NB/FCS kultiviert, danach wurde das Medium gewechselt und die Neurone für 2 Wochen in NB/B27 in Kultur gehalten, wobei jeweils nach einer Woche ein

Wechsel des Mediums erfolgte. Nach einer weiteren Woche wurden die Neurone dann je nach Versuchsaufbau mit Cisplatin oder dem Chk1-Inhibitor behandelt. Die Gliazellen wurden im Gliamedium kultiviert und es erfolgte alle 2 bis 3 Tage ein Mediumswechsel. Nach zweieinhalb Wochen wurden die Gliazellen mittels Trypsin/EDTA abgelöst (6 min) und in frischem Medium für die Experimente ausgesät. Nach 2 Tagen erfolgte ein erneuter Mediumswechsel der ausgesäten Zellen und 4 Wochen nach Präparation der Gliazellen wurden diese mit Cisplatin oder dem Chk1-Inhibitor behandelt.

## **2.2.2 Präparation primärer Neurone und Gliazellen aus Rattenembryonen**

Für die notwendig werdenden Organentnahmen wurde eine Anzeige zur Organentnahme unter dem Aktenzeichen 015/13 vorgenommen. Eine tragende Wistar-Ratte mit Embryonen im Alter E18 wurde durch 2 ml Isofluran betäubt und anschließend mittels eines Genickbruches getötet. Die Bauchdecke wurde mit 70 %igem Ethanol benetzt und eröffnet, sodass die Embryonen aus Uterus und Fruchtblase entnommen und gezählt werden konnten. Daraufhin wurden die Köpfe der Embryonen abgetrennt, das Gehirn eines jeden Embryos isoliert und diese gemeinsam in eine Petrischale mit HBSS überführt. Unter dem Binokular wurden die Cortices dann vom Hirnstamm und den Meningen getrennt und die Hippocampi herauspräpariert. Anschließend wurden die Cortices und die Hippocampi in getrennte Petrischalen mit HBSS überführt und für die Kultivierung vorbereitet.

### *2.2.2.1 Kultivierung der Gliazellen*

Nachdem die Cortices von den Hippocampi getrennt wurden, wurden Sie in eine Petrischale mit HBSS überführt und mit einem Skalpell zerkleinert. Anschließend wurden Trypsin (10 x) und DNase I (10 x) hinzugegeben, sodass beide durch die Verdünnung mit HBSS einfach vorlagen, um dann die Zellsuspension für den Zellaufschluss für 10 min unter Schütteln im Wasserbad (37 °C) zu inkubieren. Nach mehrfacher Trituration (mehrfaches Auf- und Abpipettieren) mit einer 10 ml Pipette zur weiteren Vereinzelung der Zellen und einer erneuten Inkubation im Wasserbad (5 min, 37 °C) wurden 10 ml Gliamedium zur Suspension hinzugefügt und diese erneut mit einer 5 ml Pipette trituiert. Anschließend wurden die vereinzelteten Zellen mit einer

Pasteurpipette durch ein Zellsieb gegeben und abzentrifugiert (8 min, 0,2 rcf). Nachdem der Überstand abgenommen wurde, konnte man das Zellpellet mit 2 ml Gliamedium resuspendieren, in eine Zellkulturflasche mit Gliamedium aussäen und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultivieren. Jeden zweiten bis dritten Tag wurde ein Mediumswechsel vorgenommen, bis die Zellen konfluent genug waren, um sie in 12-Well-Platten auszusäen (25.000 Zellen / Well). Dafür wurden das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gespült. Nachdem für 5 min mit Trypsin (1 x) im Brutschrank inkubiert wurde, wurden die Gliazellen mit frischem Medium abgelöst und die Zellsuspension abzentrifugiert (200 g, 5 min). Anschließend wurde das Pellett in 12 ml Medium resuspendiert und in die 12-Well-Platten aufgeteilt. Zusätzlich wurde pro Well 1 ml frisches Medium hinzugefügt.

#### *2.2.2.2 Kultivierung der hippocampalen Neurone*

Die Hippocampi wurden, nachdem sie von den Cortices durch Präparation separiert wurden, in eine 0,05 % Trypsin-Lösung überführt und für 10 min in einem 37 °C warmen Wasserbad zum Zellaufschluss inkubiert. Anschließend wurden die Hippocampi mit einer 10 ml Pipette aus der Trypsinlösung entnommen und in 5 ml NB/FCS überführt. Nachdem die Hippocampi abgesunken waren, wurde das Medium vorsichtig abpipettiert, 5 ml frisches Medium zu den Hippocampi gegeben und erneut das Absinken abgewartet. Dieser Vorgang wurde zwei Mal wiederholt und anschließend wurden nur 2 ml NB/FCS hinzugefügt. Nachfolgend wurde die Zellsuspension mit vorher verödeten Pasteurpipetten zur Vereinzelung der Zellen trituiert. Danach wurde die Zellsuspension mit NB/FCS auf 5 ml aufgefüllt und gut gemischt. Zum Zählen der Zellen wurde eine Verdünnung angesetzt (20 µL Trypanblau, 60 µL NB/FCS, 20 µL Zellsuspension). Durch die Verwendung von Trypanblau konnte die Zellviabilität bestimmt werden, da die Substanz von lebenden Zellen nicht aufgenommen wird (105). Anschließend wurde die Zellzahl lebender Neurone unter dem Mikroskop bestimmt und diese in eine 12-Well-Platte ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 2 bis 4 h erfolgte ein Mediumswechsel, indem das alte Medium abpipettiert und NB/B27, das bereits auf 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> vorkonditioniert war, hinzugegeben wurde. Nach einer Woche erfolgte ein erneuter Austausch des Mediums und 2 Wochen nach Präparation wurde mit der Behandlung der Neuronen begonnen.

### **2.2.3 Alamar Blue-Assay**

Mit Hilfe des Alamar Blue-Assays (106) wurde die Zellviabilität behandelter und unbehandelter Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit bestimmt. Der Alamar Blue-Assay spiegelt die mitochondriale Aktivität der Zellen wieder, da lebensfähige Zellen mit einer effektiven mitochondrialen Metabolisierung den nicht fluoreszierenden Farbstoff Resazurin zu fluoreszierendem Resorufin metabolisieren (106). Hierzu wird eine wässrige Resazurinlösung verwendet, welche aus einem blauen, nicht-fluoreszierenden Redox-Farbstoff besteht. Dieser wird bei Reduktion normal arbeitender Zellen allmählich zum rosafarbenen, fluoreszierenden Resorufin umgesetzt. Ist die Zelle durch zytotoxische Stoffe geschädigt, so sinkt ihre metabolische Aktivität und es wird weniger Resazurin zu Resorufin reduziert.

Die jeweiligen Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät, am folgenden Tag mit unterschiedlichen Konzentrationen der zu testenden Substanz behandelt und nach Ablauf von 1 bis 3 Tagen mit der Resazurinlösung inkubiert (90 min, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Bei jedem Versuch wurde eine Kontrollgruppe mitgeführt, bei der während der Behandlung der anderen Zellen lediglich ein Mediumswechsel vorgenommen wurde, sowie ein Blank (mit Zellkulturmedium befüllte Wells ohne Zellen). Die Viabilität in den un- oder vorbehandelten Kontrollen wurde für die Auswertung auf 100 % gesetzt. Die umgesetzte Fluoreszenz wurde mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Lesegerätes Infinite® F200 gemessen (Exzitation: 535 nm; Emission: 590 nm; 5 Blitze; Integrationszeit: 20 µs). Die Hintergrundfluoreszenz (Blank) wurde anschließend subtrahiert.

### **2.2.4 Proteinbiochemische Methoden**

#### *2.2.4.1 Proteinisolation und Western Blot*

Um Gesamtproteine für Western Blot-Analysen zu isolieren wurde eine immergleiche Zellzahl in 6 cm-Zellkulturschalen ausgesät und mit *sodium dodecyl sulfate* (SDS)-haltigem Roti®-Load-Puffer (200 µl Roti®-Load-Puffer in H<sub>2</sub>O) für 5 min bei Raumtemperatur beschichtet, nachdem der Zellrasen vorher 2 mal mit PBS gewaschen wurden. Daraufhin wurden die Zellen abgeschabt und anschließend sonifiziert (EpiShear™; 50 % Amplitude; 1 s Puls; 1 s Pause; 5 Stöße; 2 Durchgänge). Nachfolgend wurde für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert um unlösliche Partikel und

Zelldetritus zu pelletieren. Dann konnte der proteinhaltige Überstand in ein neues Gefäß überführt werden. Das befüllte 0,5 ml Reaktionsgefäß wurde bis zur Versuchsdurchführung bei -80 °C gelagert.

#### *2.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese*

Durch die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mit diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli (1970) (107) wurden die Proteingemische nach der Molekülmasse ihrer enthaltenen Proteine aufgetrennt. Dies geschieht durch die Wanderung der Proteine in einem Spannungsfeld. Durch die Hinzugabe von SDS (Natriumdodecylsulfat), einem negativ geladenen Detergenz, wird die Eigenladung der Proteine überdeckt (an 1 Gramm Protein binden 1,4 g SDS), sodass alle Proteine die gleiche negative Ladung erhalten (108). Während der Elektrophorese wandern die negativ geladenen Proteine zur Anode (107). Durch die Konzentration der Proteine mit Hilfe eines Sammelgels am Übergang zu dem Trenngel treten alle Proteine gleichzeitig in das Trenngel über und verbessern so die Bandenschärfe. Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülmasse wurden Trenngele (6 %ig und 12 %ig) und Sammelgele (5 %ig) angefertigt. Vor der Auftrennung wurden die einzelnen Proben jeweils bei 95 °C für 5 min denaturiert um Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen und anschließend auf Eis abgekühlt. Danach wurden sie erneut kurz abzentrifugiert. Pro Tasche wurden 25 µl der denaturierten Proteine eingesetzt. Eine Tasche pro Gel wurde mit 5 µl des Proteingemischs *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* versehen, der als Größenstandard dient. Falls leere, ungefüllte Taschen übrig blieben, wurden diese mit 25 µl Roti®-Load versehen. Die Elektrophorese wurde mit dem Mini-PROTEAN® Tetra Cell Elektrophorese-System in SDS-Laufpuffer durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 10 mA bis 30 mA pro Gel bis die gewünschte Auftrennung der Proteine erreicht wurde.

#### *2.2.4.3 Western Blot Analyse*

Die aufgetrennten Proteine (s. 2.2.4.2) wurden anschließend mit Hilfe des Mini Trans-Blot® Cell Systems mittels Nasstransfer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dies erfolgte durch Anlegen eines elektrischen Feldes (90 min; 300 mA). Nach erfolgtem Transfer wurden die Proteine auf der Membran mittels Ponceau-S-Lösung angefärbt und der erfolgreiche Transfer so überprüft. Anschließend wurde die

Membran für 2 h in 5 %iger Magermilchpulverlösung in TBST geschwenkt, um unspezifische Antigenbindungsstellen zu blockieren. Danach wurde die Membran mehrfach mit TBST gewaschen und dann über Nacht mit dem jeweiligen Primärantikörper bei 4 °C inkubiert. Die Primärantikörper wurden entweder mit einer 5 %igen Magermilchpulver- oder BSA-Lösung verdünnt (5 ml; 1 : 500 oder 1 : 1000; s. Tabelle 7). Am nächsten Morgen wurden durch mehrmaliges Waschen in TBST überschüssige Antikörper wieder entfernt (3 x 5 min) und die Membran nachfolgend für 2 h mit einem Sekundärantikörper inkubiert. Dieser Sekundärantikörper richtete sich jeweils gegen den zuvor aufgebrauchten Primärantikörper. Der Sekundärantikörper wurde im Verhältnis 1 : 2000 in 5 %iger Magermilchpulverlösung verdünnt. Anschließend wurde die Membran mehrfach in TBST gewaschen (3 x 5 min) und die abgelaufene Antikörper-Bindung wurde mittels ECL(*enhanced chemiluminescence*)-Farbreaktion nachgewiesen (1 min). Das Ergebnis wurde mit Hilfe des *ChemiDoc™ Touch Imaging Systems* sichtbar gemacht und anschließend analysiert.

## **2.2.5 Untersuchungen zur Zellzyklusverteilung**

### *2.2.5.1 Durchflusszytometrie*

Zur Analyse der Zellzyklusverteilung wurde der DNA-Gehalt der Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Dies ist möglich, da sich der DNA-Gehalt einer Zelle in den einzelnen Phasen des Zellzyklus verändert. So weist eine Zelle in der  $G_0/G_1$ -Phase einen einfachen Chromosomensatz auf, während sie in der  $G_2/M$ -Phase einen doppelten Chromosomensatz besitzt (s. 1.2). Die S-Phase, welche sich zwischen den beiden oben genannten Phasen befindet, ist durchflusszytometrisch nicht genau definierbar, da der Chromosomensatz hier einfach bis doppelt vorliegt. Die sogenannte SubG1-Population, in der sich apoptotische Zellen befinden, ist ebenfalls nachweisbar. Dem Tod von Zellen durch Apoptose geht eine Chromatinspaltung durch spezifische Endonukleasen voraus, was zu einer umfassenden Fragmentierung der DNA führt, sodass in diesen Zellen ein inkompletter Chromosomensatz vorliegt (109). Der DNA-Gehalt der Zellen in der SubG1-Population ist daher niedriger als der von Zellen die sich in der  $G_0/G_1$ -Phase befinden.

Für die durchflusszytometrische Untersuchung wurden die Zellen in 6-Well-Platten ausgesät, am nächsten Tag behandelt und nach 24 h oder 72 h Inkubationszeit wurde

der Zellrasen mit PBS gewaschen und mittels Trypsin/EDTA vereinzelt und abgelöst. Damit auch bereits untergegangene, abgelöste Zellen mit analysiert werden konnten (SubG1-Population), wurde das verwendete Medium sowie alle benutzten Lösungen gesammelt und gemeinsam in Falcons überführt. Die gesammelten Lösungen sowie die abgelösten Zellen wurden daraufhin 3 Minuten zentrifugiert (reduzierte Bremse, 800 x g, 4 °C), der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit PBS gewaschen. Nach erneuter dreiminütiger Zentrifugation (reduzierte Bremse, 800 x g, 4 °C) wurden die Zellen in 100 µl PBS resuspendiert und auf dem Vortex 2 ml 80 % Ethanol (-20 °C) hinzugefügt, sodass man die Zellen für maximal 2 Wochen bei -20 °C lagern konnte. Am Tag der Analyse wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (3 min, reduzierte Bremse, 800 x g, 4 °C), der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 133 µl PBS + RNase (1 mg/ml) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Unmittelbar vor der Messung im Durchflusszytometer BD Accuri™ C6 wurden 367 µl Propidiumiodid (50 µg/ml) hinzugegeben. Propidiumiodid interkaliert in die DNA und wirkt als Fluoreszenzfarbstoff (109). Die anschließende Analyse der Zellzyklusverteilung erfolgte nach der Messung mit der BD Accuri™ C6 Software.

#### *2.2.5.2 Immunzytochemie: Bestimmung des mitotischen Index*

Histone sind basische Proteine des Zellkerns in eukaryotischen Zellen. Sie interagieren mit der Nukleinsäure der Chromosomen und sorgen für die Aufspiralisierung der DNA zu Heterochromatin. Man unterscheidet fünf verschiedene Haupt-Histon-Proteine, zu denen unter anderem das Histon H3 zählt (110). H3 wird während der Mitose hauptsächlich an seinem Serin 10 phosphoryliert (p-H3) (110). Das Maximum der H3-Phosphorylierung liegt zwischen der späten Prophase und der Anaphase der Mitose und fällt in der Telophase während der Dekondensation der Chromosomen wieder ab (110, 111). Durch die immunzytochemische Detektion von p-H3 lässt sich erkennen, wie viele Zellen sich zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Mitose befinden. Auf diese Weise kann der Zellteilungsindex ermittelt werden.

Die jeweiligen Zellen wurden zu diesem Zweck auf Deckgläser ausgesät und wuchsen über Nacht an. Nach entsprechender Behandlung und anschließender Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 15 Minuten auf den Deckgläsern mit 4 % Formaldehyd in PBS fixiert. Anschließend wurden sie mindestens 20 Minuten lang mit -20 °C kaltem Methanol permeabilisiert. Vor Inkubation mit dem p-H3 (S10)-spezifischem

Primärantikörper in PBST (1 : 50, über Nacht, 4 °C) erfolgte die Blockade von unspezifischen Antigenbindungsstellen mit 5 % BSA in PBST (60 min, RT). Nach verschiedenen Waschschritten mit PBS (2 x 5 min, RT), PBS high salt (2 min, RT) und PBST (5 min, RT) wurde für 1 h mit den fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern Alexa Fluor® 488 und 546 (s. Tabelle 8) in PBST im Dunkeln inkubiert (1 : 500, RT). Die Deckgläser wurden nochmals mit PBS (3 x 5 min, RT, im Dunkeln) und PBST (1 x 5 min) gewaschen und mit DAPI-haltigem Vectashield® (4',6-Diamidin-2-phenylindol) eingedeckelt, mit Nagellack luftdicht versiegelt und bei 4 °C gelagert. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich an doppelsträngige DNA anlagert. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert DAPI und die Zellkerne werden in blauer Farbe sichtbar. Die mikroskopische Auswertung des prozentualen Anteils der p-H3 positiven Zellen erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop BX43 und der Software CellSens Dimension.

#### *2.2.5.3 EdU-Zellproliferationsassay*

Die EdU-Färbung wurde mit Hilfe des Kits EdU-Click 488 durchgeführt. So konnte der Einfluss der pharmakologischen Behandlung auf die S-Phaseaktivität der Zellen zusätzlich zur Durchflusszytometrie untersucht werden. 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU) ist ein Thymidinanalogon. Es wird während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut und kann durch Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden (112).

Die Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät, am nächsten Tag mit Cisplatin behandelt und anschließend wurde eine EdU Pulsbehandlung (30 min, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) durchgeführt. Nachdem die Zellen mit PBS gewaschen wurden, wurden sie mit 4 % Formaldehyd in PBS fixiert (15 min, RT), erneut mit PBS gewaschen (3 x 5 min, RT) und mindestens 20 Minuten mit -20 °C kaltem Methanol permeabilisiert. Anschließend wurden unspezifische Antigenbindungsstellen mit 5 % BSA in PBST blockiert (60 min, RT) und es erfolgte die Inkubation unter Lichtausschluss mit der Reaktionslösung (1 h, RT). Die Zellen wurden daraufhin mit einem DAPI-haltigem Vectashield® eingedeckelt, luftdicht versiegelt und mit dem Fluoreszenzmikroskop BX43 und der Software CellSens Dimension analysiert.

### 2.2.6 Ko-Lokalisation von $\gamma$ H2AX- und 53BP1-Foci zur Analyse von DNA-Schäden

Um die Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) zu detektieren wurde eine immunzytochemische Färbung von  $\gamma$ H2AX (phosphoryliertes Histon H2AX) und 53BP1 (P53-bindendes Protein 1) durchgeführt. Das Histon H2AX wird nach der Induktion von DSB durch verschiedenen Proteinkinasen (u.a. ATM, ATR) an Ser139 phosphoryliert und dann als  $\gamma$ H2AX bezeichnet. An Doppelstrangbrüchen bilden sich durch Akkumulation der induzierten Proteinvariante subnukleäre Strukturen aus. Diese sind mikroskopisch durch Fluoreszenzfärbung als nukleäre „ $\gamma$ H2AX-Foci“ zu erkennen und somit quantifizierbar (113). 53BP1 ist ein Protein, welches an das Tumorsuppressorprotein P53 bindet (P53-bindendes Protein 1). In Folge eines DSB wird es aus dem Zytoplasma in den Zellkern rekrutiert und bindet in der Nähe des DNA-Schadens an das Chromatin. Durch spezifische Antikörper kann man die gebundenen 53BP1-Moleküle sichtbar machen (114). Die Zahl der  $\gamma$ H2AX- und 53BP1-Foci korreliert mit der Menge der induzierten DSB. Dass es sich bei den Foci tatsächlich um einen DNA-Schaden handelt wird durch die Auswertung kolokalisierter 53BP1- und  $\gamma$ H2AX-Foci sichergestellt (115), sodass es möglich ist durch das Auszählen der Foci die Anzahl der DSB in den Zellen zu ermitteln. Die Auswertung kolokalisierter Foci erhöht zudem die Sensitivität gegenüber der alleinigen Bestimmung von 53BP1- oder  $\gamma$ H2AX-Foci.

Zur Bestimmung von  $\gamma$ H2AX und 53BP1 wurden die Zellen auf Deckgläsern ausgesät, am nächsten Tag behandelt und nach Ablauf der Inkubationszeit wie unter 2.2.5.2 beschrieben gewaschen, fixiert und mit Methanol permeabilisiert. Anschließend wurden unspezifische Antigenbindungsstellen mit 5 % BSA in PBST blockiert (60 min, RT) und daraufhin die Zellen mit dem  $\gamma$ H2AX- beziehungsweise 53BP1-spezifischen Primärantikörper in PBST über Nacht bei 4 °C inkubiert (1 : 500). Nach mehreren Waschschritten zur Entfernung überschüssiger Antikörper (PBS (2 x 5 min), PBS high salt (1 x 2 min) und PBST (1 x 5 min)) wurde mit den fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern Alexa Fluor® 488 und 546 (s. Tabelle 8) in PBST 2 h im Dunkeln inkubiert (1 : 500, RT). Anschließend wurde erneut im Dunkeln mit PBS gewaschen (3 x 5 min) und dann die Deckgläser mit DAPI-haltigem Vectashield® eingedeckelt und luftdicht versiegelt. Die Detektion und Quantifizierung der  $\gamma$ H2AX- und 53BP1-Foci erfolgte mittels des Fluoreszenzmikroskops BX43 und der Software CellSens Dimension.

### **2.2.7 Statistische Auswertung**

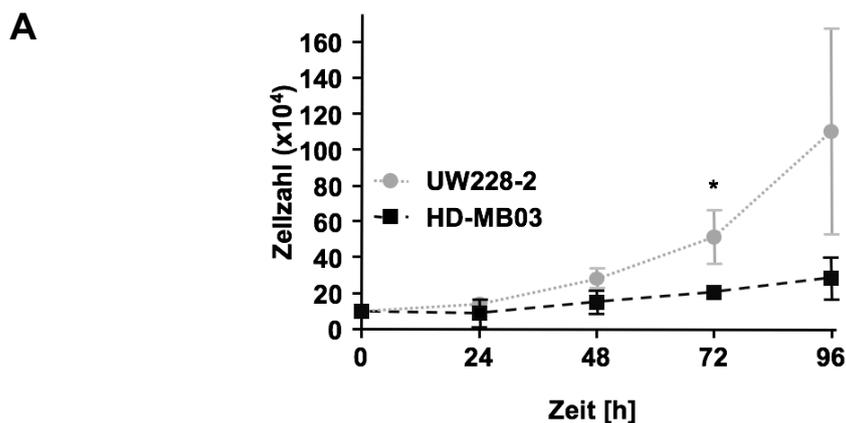
Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism 5.01. Um eine statistische Signifikanz zu ermitteln wurde zum einen der zweiseitig ungepaarte t-Test nach Student (1908) (116), zum anderen eine parametrische einfache Varianzanalyse (one-way ANOVA) mit Bonferronis Posthoc-Test oder Zweiweg-Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit Bonferronis Posthoc-Test angewendet. Als statistisch signifikant wurden p-Werte  $\leq 0,05$  angesehen. Die statistischen Analysen wurden zwischen der behandelten Gruppe und einer entsprechenden unbehandelten Kontrollgruppe oder zwischen verschiedenen Behandlungsgruppen untereinander durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden durch \*, # oder + gekennzeichnet. \*, #, +:  $p \leq 0,05$ ; \*\*, ##, ++:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*, ###, +++:  $p \leq 0,001$ .

## 3 Ergebnisse

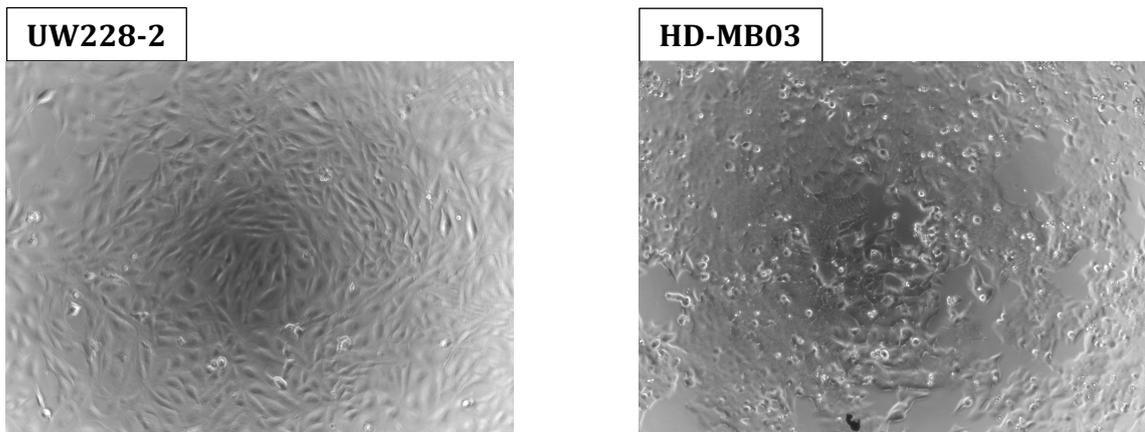
### 3.1 Wachstumsverhalten der beiden Medulloblastomzelllinien

Für diese Arbeit wurden zwei unterschiedliche Medulloblastomzelllinien verwendet. Die Zelllinie UW228-2 gehört in die Gruppe der SHH-Medulloblastome und weist eine niedrige c-Myc-Expression auf. HD-MB03-Zellen hingegen werden zu den Gruppe 3 Medulloblastomen gezählt und weisen eine hohe c-Myc-Expression auf (43, 117). Hochrisiko-therapieresistente Medulloblastome zeichnen sich unter anderem durch eine hohe Expressionsrate des Onkogens c-Myc aus (s. 1.1.3.). Daher verwendeten wir diese beiden Zelllinien um mögliche Variationen im Therapieerfolg durch unterschiedliche c-Myc-Expressionsniveaus erklären zu können. Dazu verglichen wir die Zellantworten der zwei humanen Medulloblastomzelllinien nach der Behandlung mit dem Chk1-Inhibitor AZD-7762 und mit Cisplatin. Darüberhinaus untersuchten wir, ob sich die Zellantworten der jeweiligen Zelllinie auf Cisplatin durch Vorbehandlung mit dem Chk1-Inhibitor AZD-7762 verändern.

Zunächst wurden die Zellen ausgesät und ihr Wachstumsverhalten analysiert. Dafür wurden die Zellen zum Zeitpunkt der Aussaat sowie 24 h, 48 h und 72 h danach unter dem Mikroskop gezählt und inspiziert. Das Wachstumverhalten der beiden Zelllinien unterschied sich deutlich wie in Abbildung 3A zu sehen ist. So teilten sich die UW228-2-Zellen mit einer 24-stündigen Verdopplungszeit doppelt so schnell wie die HD-MB03-Zellen mit einer Verdopplungszeit von 48 h. Die Bestimmung der Zellzahl zu den unterschiedlichen Zeitpunkten war zudem für die nachfolgenden Versuche relevant um für die jeweilige Behandlungsdauer eine angemessene Zellzahl aussäen zu können.



## B



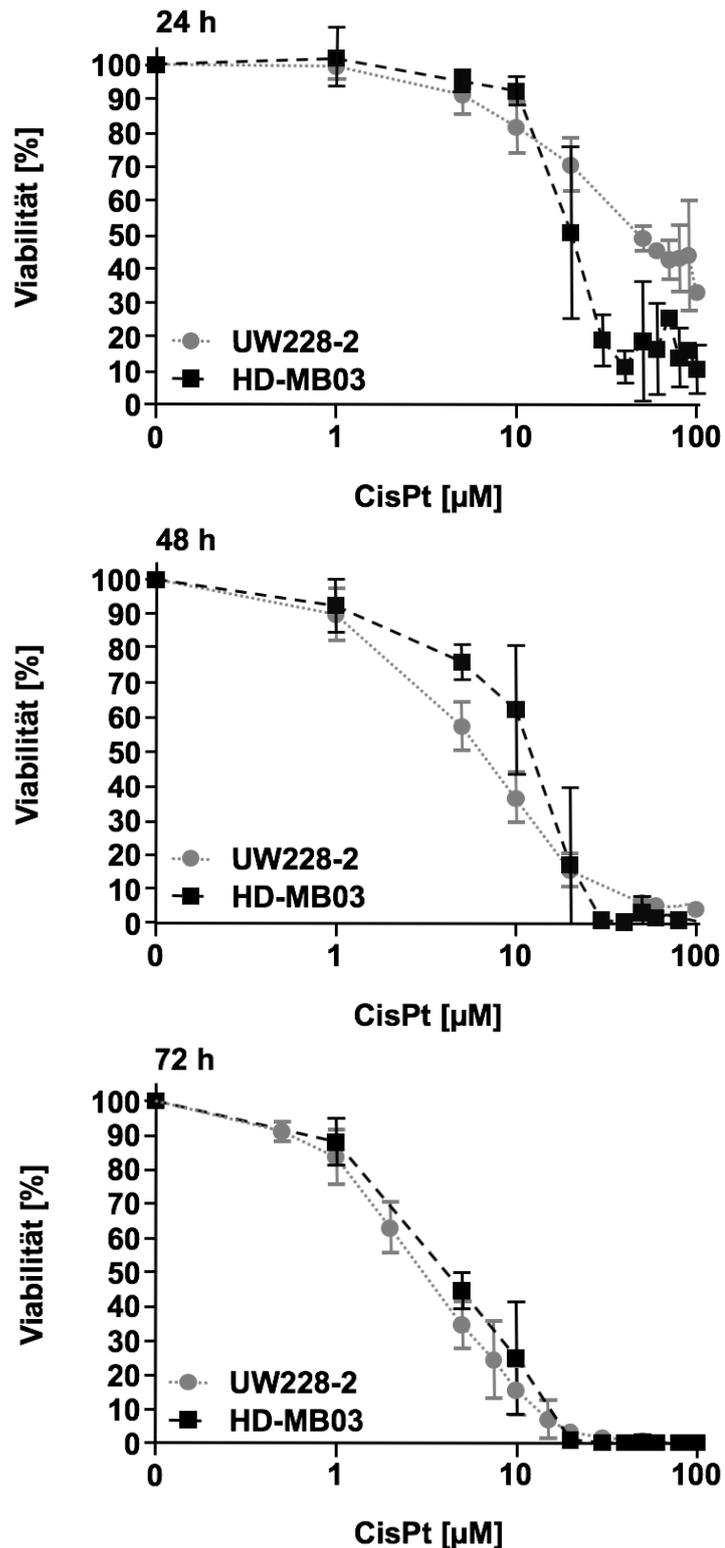
**Abb. 3: Wachstumsverhalten von UW228-2- und HD-MB03-Medulloblastomzellen.**

Die beiden Zelllinien UW228-2 und HD-MB03 wurden ausgesät und zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten ihre Zellzahl bestimmt. A) Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. B) Repräsentative Bilder der beiden Zelllinien bei Konfluenz (10-fache Vergrößerung).

### 3.2 Cisplatin induziert einen dosisabhängigen Viabilitätsverlust in

#### Medulloblastomzellen

Um den zytotoxischen Effekt des Chemotherapeutikums Cisplatin auf die UW228-2- und HD-MB03-Zellen zu evaluieren wurde zunächst die Zellviabilität mittels des Alamar Blue-Assays analysiert. Hierfür wurden die Zellen 24 h nach dem Aussäen mit unterschiedlichen Konzentrationen Cisplatin behandelt. Anschließend wurde die Lebensfähigkeit der Zellen zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach 24 h, 48 h und 72 h Behandlung mit Hilfe des Alamar Blue-Assays bestimmt. Dies erfolgte jeweils im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Die entstandenen Dosiswirkungskurven sind in Abbildung 4 dargestellt. Sie zeigen die Zellviabilität in Prozent der unbehandelten Kontrolle in Abhängigkeit von der Behandlungsdosis. Nach der Behandlung mit Cisplatin als Teil des konventionellen Behandlungsschemas für die Medulloblastomtherapie konnte ein ähnlich toxischer Effekt auf beide Zelllinien beobachtet werden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Viabilität der beiden Zelllinien. Zu allen drei Zeitpunkten ähnelten sich die Dosiswirkungskurven der UW228-2- und HD-MB03-Medulloblastomzellen.



**Abb. 4: Lebensfähigkeit von Medulloblastomzellen nach Behandlung mit Cisplatin.**

UW228-2- und HD-MB03-Zellen wurden 24 h nach dem Aussäen für 24 h, 48 h und 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen Cisplatin (CisPt) behandelt. Anschließend wurde ihre Zellviabilität analysiert. Die gezeigten Ergebnisse sind als lebensfähige Zellen in Prozent der unbehandelten Kontrolle ausgedrückt, die auf 100 % normalisiert wurde. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten (8 Replikate pro Bedingung).

Auch die bei den Versuchen gemessenen *inhibitory concentration* 50 % (IC<sub>50</sub>) und *inhibitory concentration* 80 % (IC<sub>80</sub>), die in Tabelle 15 dargestellt sind, ließen keine großen Unterschiede in der Sensibilität der Zellen gegenüber Cisplatin nach einer längeren Behandlungsdauer erkennen. Lediglich in den ersten 24 h der Platinbehandlung scheinen die HD-MB03-Zellen leicht sensitiver gegenüber dem Zytostatikum zu sein, da hier deutlich niedrigere Konzentrationen notwendig waren um die Vitalität in der Population um die Hälfte bzw. 80 % zu reduzieren. Bereits nach 48 h glichen sich die Werte der beiden Zelllinien aber wieder stark einander an. Die so ermittelten IC<sub>50</sub> und IC<sub>80</sub> wurden für nachfolgende Versuche benötigt, um sinnvolle Konzentrationen zu finden und die richtige Behandlungsdauer mit Cisplatin einschätzen zu können. Für die nachfolgenden Experimente ergaben sich die Behandlungsdosen von 4 µM und 9 µM Cisplatin. Zusammenfassend führte Cisplatin zu einem dosisabhängigen Viabilitätsverlust in Medulloblastomzellen mit und ohne c-Myc-Amplifikation.

CisPt	IC <sub>50</sub>	IC <sub>80</sub>	
24 h	20 µM	30 µM	HD-MB03
	47 µM	> 100 µM	UW228-2
48 h	13 µM	19 µM	HD-MB03
	7 µM	18 µM	UW228-2
72 h	5 µM	12 µM	HD-MB03
	4 µM	9 µM	UW228-2

**Tabelle 15: Einfluss von Cisplatin auf die Viabilität der Medulloblastomzellen**

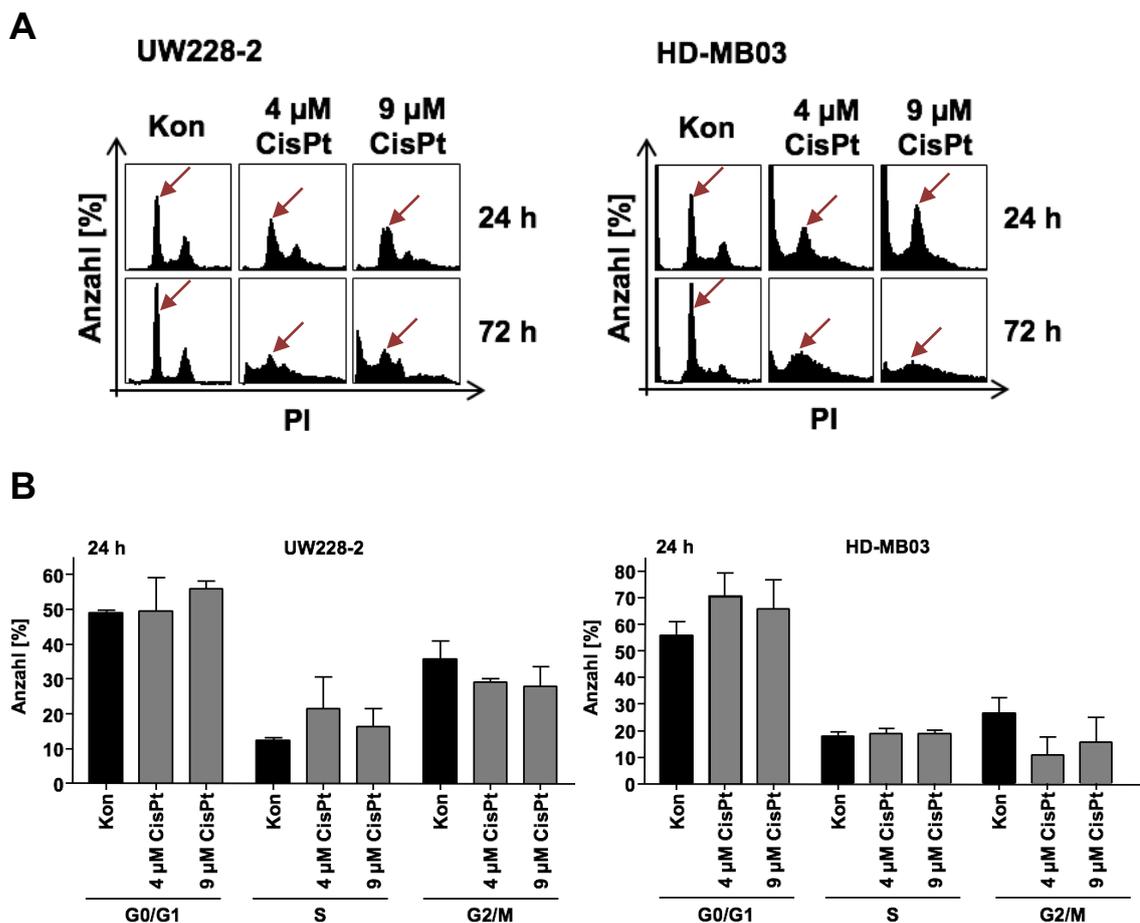
UW228-2- und HD-MB03-Zellen wurden für 24 h, 48 h und 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen Cisplatin (CisPt) behandelt. Anschließend wurde ihre Zellviabilität analysiert (Abbildung 4). Aufgelistet sind die zu allen drei Messzeitpunkten ermittelten *inhibitory concentration* 50 % (IC<sub>50</sub>) und *inhibitory concentration* 80 % (IC<sub>80</sub>).

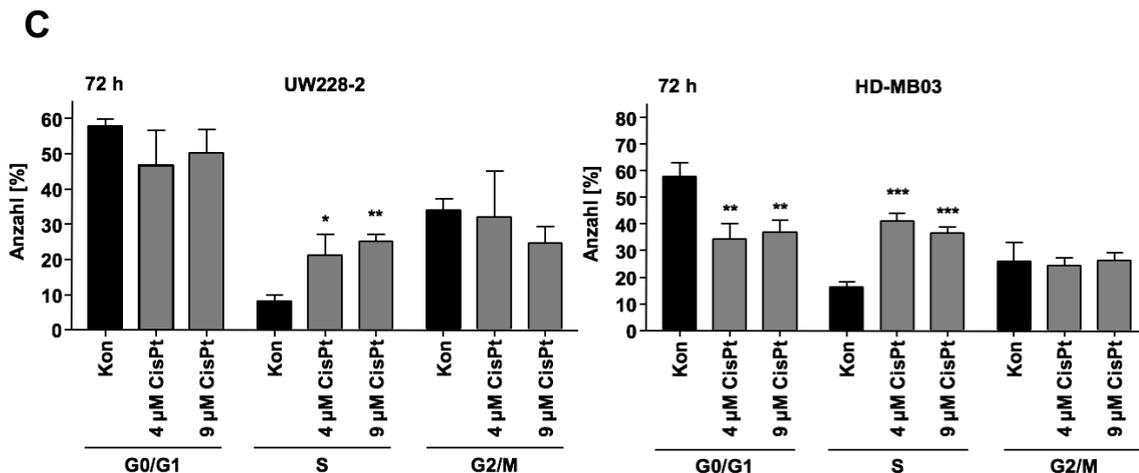
### 3.3 Cisplatin induziert einen S-Phase-Arrest in Medulloblastomzellen

#### 3.3.1 Durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus nach Cisplatinbehandlung

Anschließend wurden die Veränderungen der Zellzyklusverteilung nach Cisplatinbehandlung mittels Durchflusszytometrie analysiert, da eine erniedrigte Viabilität im Alamar Blue-Assay zum einen durch Apoptose, zum anderen aber auch durch einen Zellzyklusarrest und Proliferationshemmung bedingt sein kann. Hierzu

wurden die Zellen 24 h nach ihrer Aussaat mit 4  $\mu$ M und 9  $\mu$ M Cisplatin behandelt. Der Zellzyklus der beiden Medulloblastomzelllinien wurde sowohl nach 24 stündiger als auch nach 72 stündiger Inkubationzeit mit Cisplatin analysiert. Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, ließ sich nach 24 h Behandlung in der Zellzyklusverteilung der beiden Medulloblastomzelllinien zwischen der unbehandelten Kontrolle und den mit Cisplatin behandelten Zellen kein signifikanter Unterschied erkennen. Nach 72 h Behandlung mit Cisplatin war es bei beiden Zelllinien möglich einen signifikanten Anstieg der Anzahl an Zellen in der S-Phase zu beobachten (Abb. 5). Dabei schien die Konzentration von Cisplatin jedoch eine untergeordnete Rolle zu spielen. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den mit der IC<sub>50</sub> und IC<sub>80</sub> von Cisplatin behandelten Medulloblastomzellen detektiert werden. Bei den HD-MB03-Zellen ließ sich zudem eine signifikante Abnahme der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Fraktion nach 72 h Behandlung erkennen, wobei auch hier die Cisplatin-Konzentration keinen signifikanten Einfluss hatte.

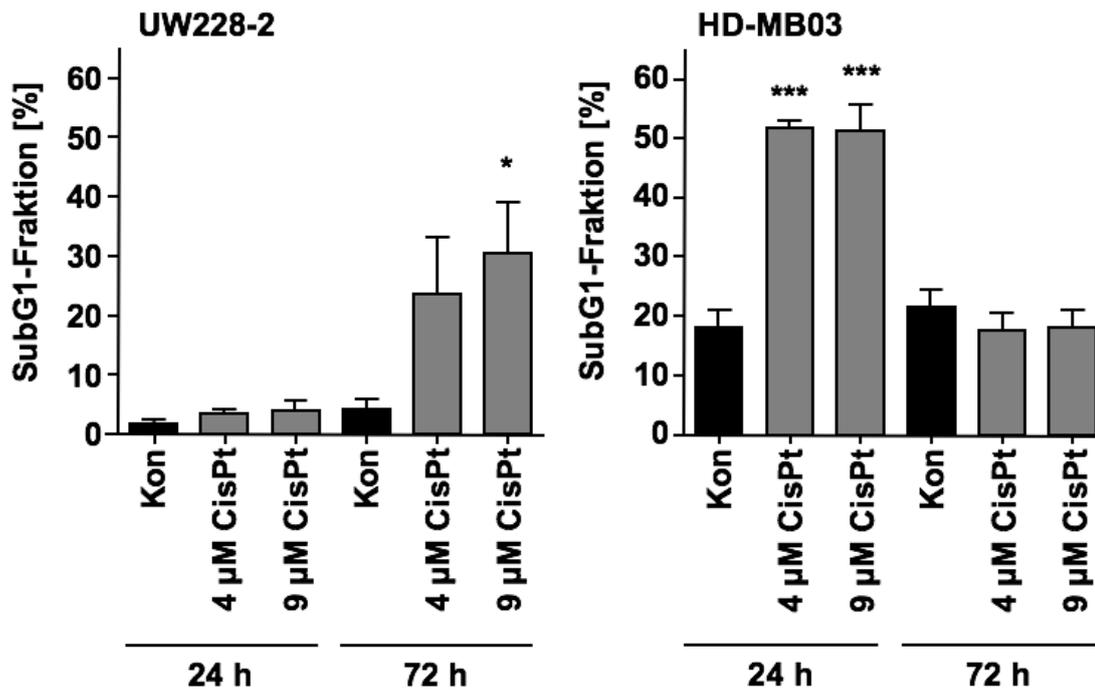




**Abb. 5: Analyse des Zellzyklus von zwei Medulloblastomzelllinien mittels Durchflusszytometrie nach 24 h und 72 h Behandlung mit Cisplatin.**

UW228-2- und HD-MB03-Zellen wurden für 24 h und 72 h mit zwei unterschiedlichen Cisplatin Dosen (CisPt) behandelt und anschließend ihr Zellzyklus mittels Durchflusszytometrie beurteilt. A) Exemplarische Bilder der Zellzyklusverteilung der beiden Zelllinien nach 24 h und 72 h Behandlung mit der  $IC_{50}$  und  $IC_{80}$  von Cisplatin. Die roten Pfeile markieren jeweils die  $G_0/G_1$ -Fraktion. B und C) Auswertung der  $G_0/G_1$ -, S- sowie  $G_2/M$ -Fraktion des Zellzyklus von HD-MB03- sowie UW228-2-Zellen jeweils nach 24 h (B) und 72 h (C) Dauerbehandlung mit zwei unterschiedlichen Cisplatin Konzentrationen jeweils im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Kon). Dargestellt sind der normalisierte Mittelwert + Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (zwei Replikate pro Bedingung;  $n = 3$ ,  $N = 2$ ). Statistik: statistische Signifikanz gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Kon); \*\*\*:  $p \leq 0.001$ ; \*\*:  $p \leq 0.01$ ; \*:  $p \leq 0.05$

Anschließend wurde die SubG1-Fraktion, welche den apoptotischen Zellanteil repräsentiert, nach Behandlung mit Cisplatin genauer betrachtet (Abbildung 6). Da es beim Zelltod durch Apoptose zu einer Chromatinspaltung und einer umfassenden Fragmentierung der DNA kommt, liegt hier ein inkompletter Chromosomensatz vor und der DNA-Gehalt der Zellen ist niedriger als der in der  $G_0/G_1$ -Phase. Um diese nicht mehr am Zellrasen haftende Zellpopulation analysieren zu können wurden alle benutzten Lösungen inklusive des verwendeten Mediums jeweils mitabgenommen und gesammelt. Nach 24 h Behandlung blieb die SubG1-Fraktion bei den Cisplatin behandelten UW228-2-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle unverändert. Nach 72 h konnte man einen deutlichen Anstieg des apoptotischen Zellanteils erkennen. In der HD-MB03-Zellpopulation konnte hier ein Unterschied zu der UW228-2 Zelllinie erkannt werden. Nach 24 h Cisplatinbehandlung waren bereits viele Zellen in Apoptose gegangen, nach 72 h war im Vergleich zur Kontrolle allerdings kein signifikanter Anstieg in der SubG1-Fraktion mehr zu verzeichnen.

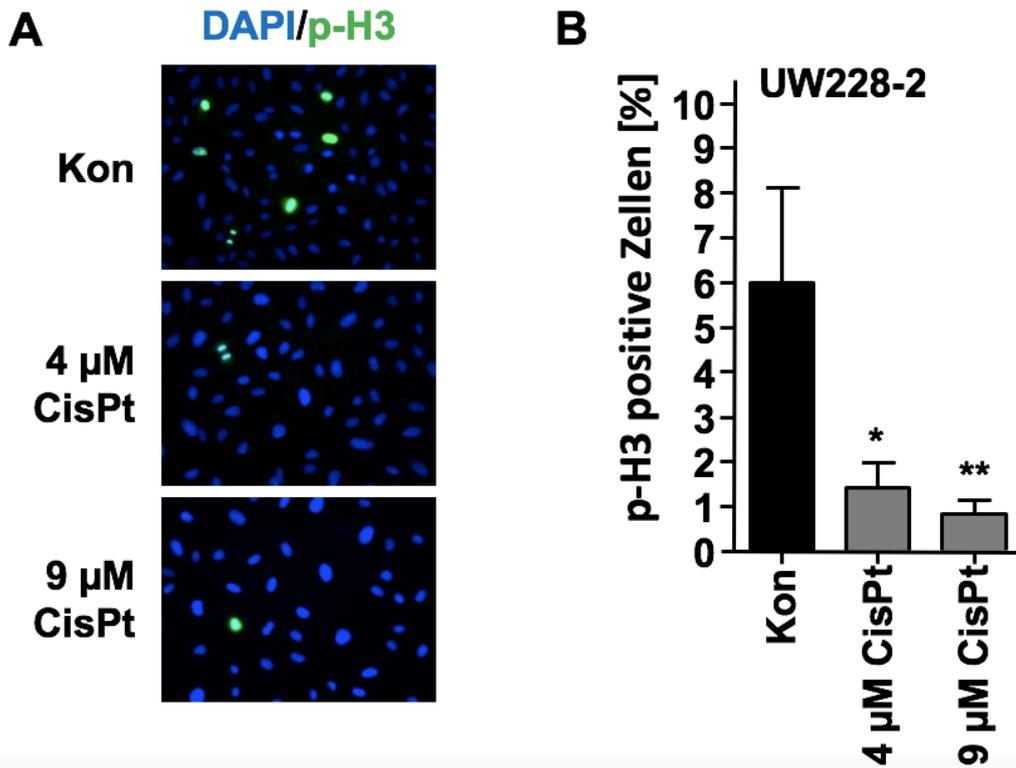


**Abb. 6: Analyse der SubG1-Fraktion von zwei Medulloblastomzelllinien nach 24 h und 72 h Behandlung mit Cisplatin.**

UW228-2- und HD-MB03-Zellen wurden mit 4 µM und 9 µM Cisplatin (CisPt) behandelt. Nach 24 h und 72 h wurde jeweils ihre SubG1-Fraktion durchflusszytometrisch untersucht und mit der jeweiligen unbehandelten Kontrolle (Kon) verglichen. Die SubG1-Fraktion repräsentiert apoptotische Zellen. Dargestellt sind die normalisierten Mittelwerte + Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (zwei Replikate pro Bedingung; n = 3, N = 2). Normalisiert wurden die Ergebnisse auf eine nichtbehandelte Kontrolle. Statistik: statistische Signifikanz gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Kon); \*\*\*: p ≤ 0.001; \*\*: p ≤ 0.01; \*: p ≤ 0.05

### 3.3.2 Immunzytochemische Färbungen zur Bestimmung der mitotischen Aktivität von Medulloblastomzellen nach Behandlung mit Cisplatin

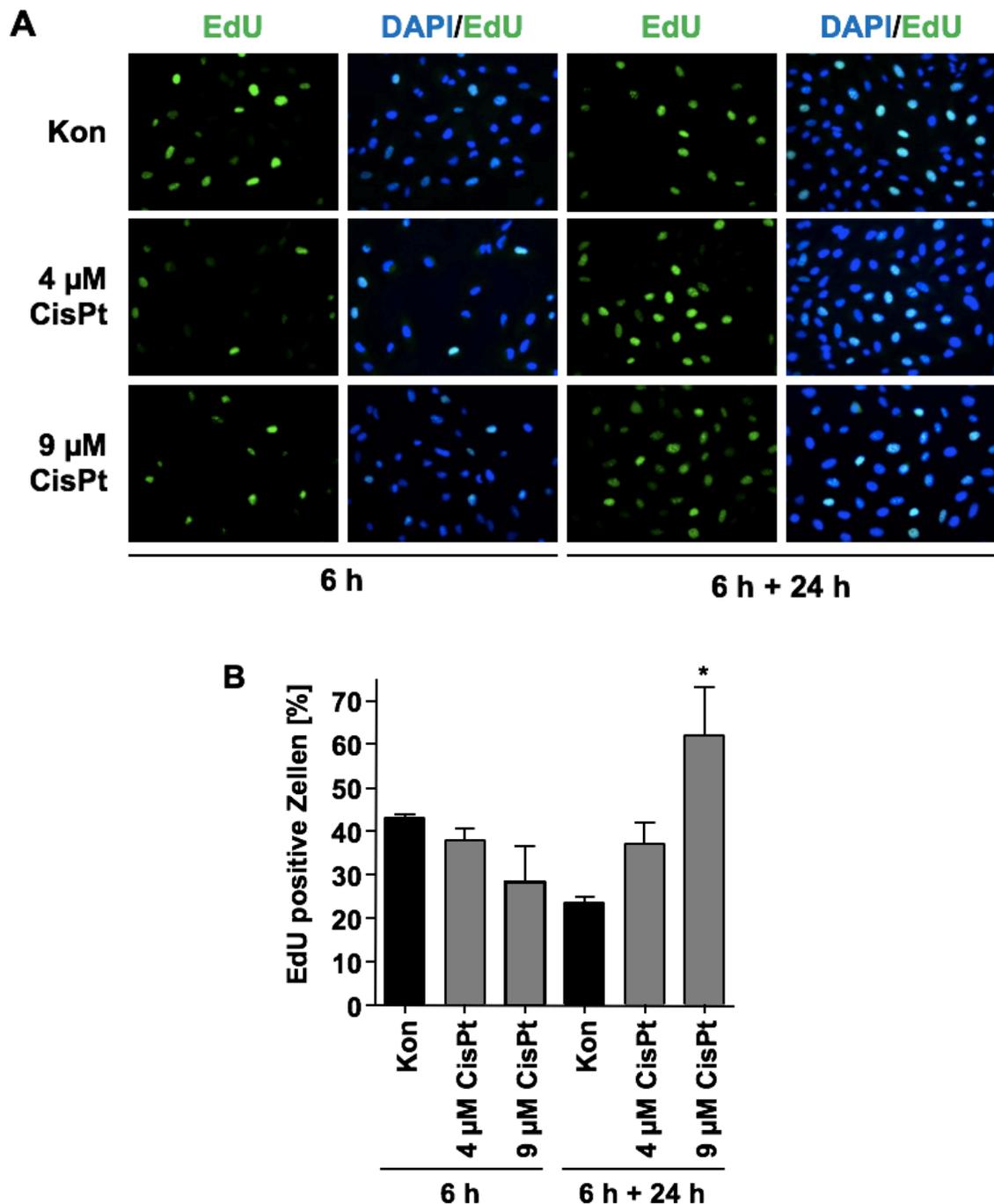
Um den genauen Einfluss von Cisplatin auf den Zellzyklus von Medulloblastomzellen weiter zu untersuchen wurden UW228-2-Zellen immunzytochemischen Färbungen unterzogen. Hierfür wurden die Zellen erneut mit der IC<sub>50</sub> (4 µM) und IC<sub>80</sub> (9 µM) von Cisplatin behandelt. Um den mitotischen Index zu ermitteln, erfolgte die immunzytochemische Detektion von phosphoryliertem Histon 3 (p-H3) nach 24 h Behandlung mit Cisplatin, in Anlehnung an die Durchflusszytometrie. Nach Behandlung mit der IC<sub>50</sub> und IC<sub>80</sub> von Cisplatin befanden sich signifikant weniger Zellen in der Mitose, als in der unbehandelten Kontrollpopulation (Abbildung 7). Die unterschiedlichen Cisplatin Dosen ließen einen geringen Unterschied erkennen. So befanden sich nach Behandlung mit der IC<sub>80</sub> noch weniger Zellen in der Mitose als nach Behandlung mit der IC<sub>50</sub> von Cisplatin, jedoch war der Unterschied nicht signifikant.



**Abb. 7: Mitotische Aktivität von Medulloblastomzellen vor und nach Cisplatingabe.**

UW228-2 Medulloblastomzellen wurden für 24 h mit 4  $\mu\text{M}$  und 9  $\mu\text{M}$  Cisplatin (CisPt) behandelt. Anschließend wurde der mitotische Index ermittelt. Hierzu erfolgte die immunzytochemische Detektion von phosphoryliertem Histon 3 (p-H3). Gezeigt werden in A) repräsentative mikroskopische Bilder der Immunzytochemischen Färbung (20-fache Vergrößerung) sowie in B) der Mittelwert + Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten, jeweils in Duplikaten pro Bedingung ( $n = 3$ ,  $N = 2$ ). Es wurden pro Replikat jeweils mehr als 50 Zellen ausgezählt (pro Experiment  $>100$ ). Für die statistische Analyse wurde eine one-way ANOVA mit Bonferronis multiplem Vergleichstest angewendet. \*: statistische Signifikanz von CisPt vs. Kon; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*:  $p \leq 0,05$ .

Die Zunahme in der S-Phase-Aktivität der Medulloblastomzellen nach Behandlung mit Cisplatin wurde anhand des Einbaus von EdU in die DNA weiter analysiert. EdU (5-Ethynyl-2'-desoxyuridin) ist ein Thymidinanalogon und kann während der S-Phase in die DNA eingebaut und durch einen Fluoreszenzfarbstoff unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden. In Anlehnung an weiter unten beschriebene Versuche wurden die Zellen nach 6 h und 6 h + 24 h Postinkubationszeit analysiert. Hierzu wurden die UW228-2-Zellen für 6 h mit der  $\text{IC}_{50}$  (4  $\mu\text{M}$ ) und  $\text{IC}_{80}$  (9  $\mu\text{M}$ ) von Cisplatin behandelt und anschließend wurde bei der Hälfte von ihnen eine 30 minütige EdU-Pulsbehandlung durchgeführt. Die andere Hälfte erhielt einen Mediumswechsel, womit die Zytostatikabehandlung beendet wurde und die Zellen frisches Medium erhielten. Nach 24 h Regenerationszeit wurde auch bei diesen Zellen eine 30 minütige EdU-Pulsbehandlung durchgeführt.



**Abb. 8: Analyse der S-Phase-Aktivität von Medulloblastomzellen nach 6 h und 6 h + 24 h Behandlung mit Cisplatin.**

UW228-2-Zellen wurden für 6 h einer Behandlung mit der  $IC_{50}$  und  $IC_{80}$  von Cisplatin (CisPt) ausgesetzt. Bei der einen Hälfte wurde direkt im Anschluss die S-Phase-Aktivität beurteilt während die andere Hälfte für weite 24 h ohne Cisplatin inkubiert wurde und erst anschließend mittels einer immunzytochemischen Färbung analysiert wurden. A) Exemplarische Fluoreszenzaufnahmen (20-fache Vergrößerung). B) Mittelwerte + Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten, jeweils zwei Replikate pro Bedingung. Pro Bedingung wurden >150 Zellen ausgezählt (>300 pro Bedingung). Für die statistische Analyse wurde eine einfache Varianzanalyse (one-way ANOVA) mit Bonferronis multiplem Vergleichstest angewendet. \*: statistische Signifikanz von CisPt vs. Kon (unbehandelte Kontrollzellen); \*:  $p \leq 0,05$ .

Wie in Abbildung 8 zu sehen ist, war nach 6 h Zytostatikabehandlung eine leichte Abnahme der S-Phase-Aktivität zu beobachten. Nach weiteren 24 h ohne Cisplatinbehandlung befanden sich deutlich mehr Zellen der behandelten Populationen in der S-Phase als in der entsprechenden Kontrollpopulation (Abb. 8). Die mit 9  $\mu$ M Cisplatin behandelten Zellen zeigten sogar eine signifikante Erhöhung an EdU-positiven Zellen.

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse der Durchflusszytometrie und der immunzytochemischen Färbungen, dass die Medulloblastomzellen nach einer längeren Cisplatinbehandlung in einen S-Phase-Block eintraten und sich vermehrt apoptotische Zellen ansammelten.

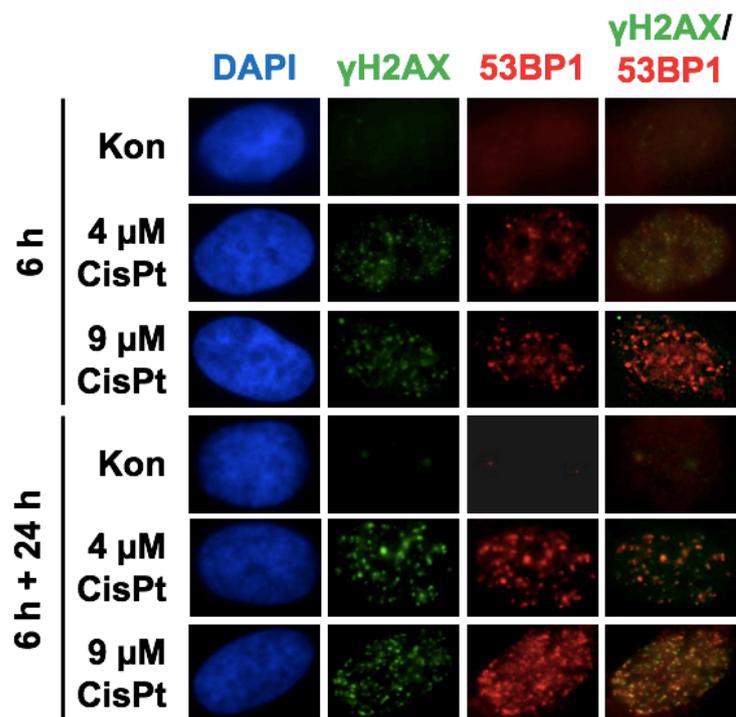
### **3.4 Cisplatin induziert DNA-Doppelstrangbrüche und aktiviert die DNA-Schadensantwort**

Zytostatika induzieren DNA-Doppelstrangbrüche (DSB), welche zur Aktivierung der DNA-Schadensantwort führen. Während der DNA-Schadensantwort kann der Zellzyklusarrest und die Reparatur der DNA-Schäden sowie der programmierte Zelltod eingeleitet werden. Kommt es zu einem DNA-Schaden werden Sensorsysteme aktiv, die ihre Information an Kinasen weiterleiten, welche daraufhin durch Phosphorylierungen Proteine (de)aktivieren, was einen Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur oder die Apoptose zur Folge hat. Eine zentrale Rolle hierbei spielen die Kinasen ATM, ATR, Chk1 und Chk2 (118). ATM und ATR phosphorylieren unter anderem das Histon H2AX (*H2A histone family, member X*) an seinem Serin 139. Das nun entstandene  $\gamma$ H2AX lässt sich mittels eines phosphospezifischen Antikörpers anfärben, sodass DSB indirekt detektiert werden können (113, 119). 53BP1 ist ein Protein, das in der Nähe eines entstandenen DSB an das Chromatin bindet, nachdem es aus dem Zytoplasma rekrutiert wurde (114). Mittels spezifischer Antikörper ist es möglich auch die gebundenen 53BP1-Moleküle sichtbar zu machen. Die Zahl an korrelierenden  $\gamma$ H2AX- und 53BP1-Foci lässt sich quantifizieren und somit auf die Menge an induzierten DSB rückschließen. Durch die Bestimmung von kolokalisierten  $\gamma$ H2AX- und 53BP1-Foci wird sichergestellt, dass es sich tatsächlich um DSB handelt.

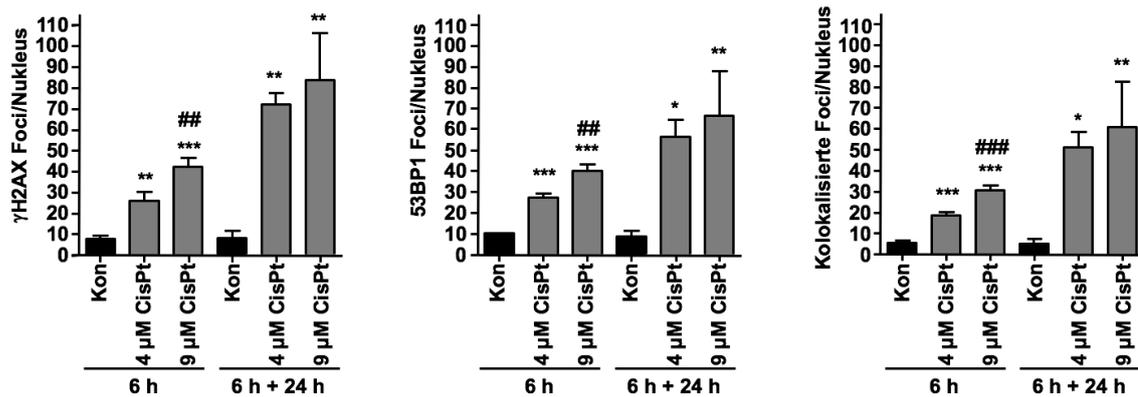
### 3.4.1 Cisplatin induziert DNA-Doppelstrangbrüche in Medulloblastomzellen

Anschließend wurden Cisplatin-induzierten-DSB in UW228-2-Zellen untersucht. Hierzu wurden die UW228-2-Zellen zunächst mit ihrer  $IC_{50}$  und  $IC_{80}$  von Cisplatin behandelt. Die Anzahl der induzierten Doppelstrangbrüche wurde nach 6 h Behandlung mit Cisplatin und 6 h + 24 h (6 h Cisplatinbehandlung und weitere 24 h Postinkubation nach Beendigung der Zytostatikabehandlung) mittels immunzytochemischer Färbung der  $\gamma$ H2AX- und 53BP1-Foci quantifiziert. Hierfür wurden sowohl die induzierten  $\gamma$ H2AX- als auch 53BP1-Foci einzeln sowie ihre Kolo­kalisierung ausgezählt. Wie Abbildung 9 zu entnehmen ist, traten bereits nach 6 h Cisplatinbehandlung signifikant mehr DSB auf als in der Kontrollpopulation. Nach weiteren 24 h Postinkubationszeit ohne weitere Behandlung nahm die Anzahl an DSB weiter zu. Zudem ließ sich eine Dosisabhängigkeit erkennen. Nach Behandlung mit der  $IC_{80}$  (9  $\mu$ M) von Cisplatin ließen sich signifikant mehr DSB auszählen als nach Behandlung mit der  $IC_{50}$  (4  $\mu$ M). Diese Dosisabhängigkeit konnte sowohl nach 6 h als auch nach 6 h + 24 h beobachtet werden. Wie in den gezeigten repräsentativen Bildern und Graphen in Abbildung 9 zu sehen ist, konnten die induzierten Doppelstrangbrüche in allen immunzytochemischen Färbungen beobachtet werden ( $\gamma$ H2AX-, 53BP1- und kolo­kalisierte Foci).

**A**



## B



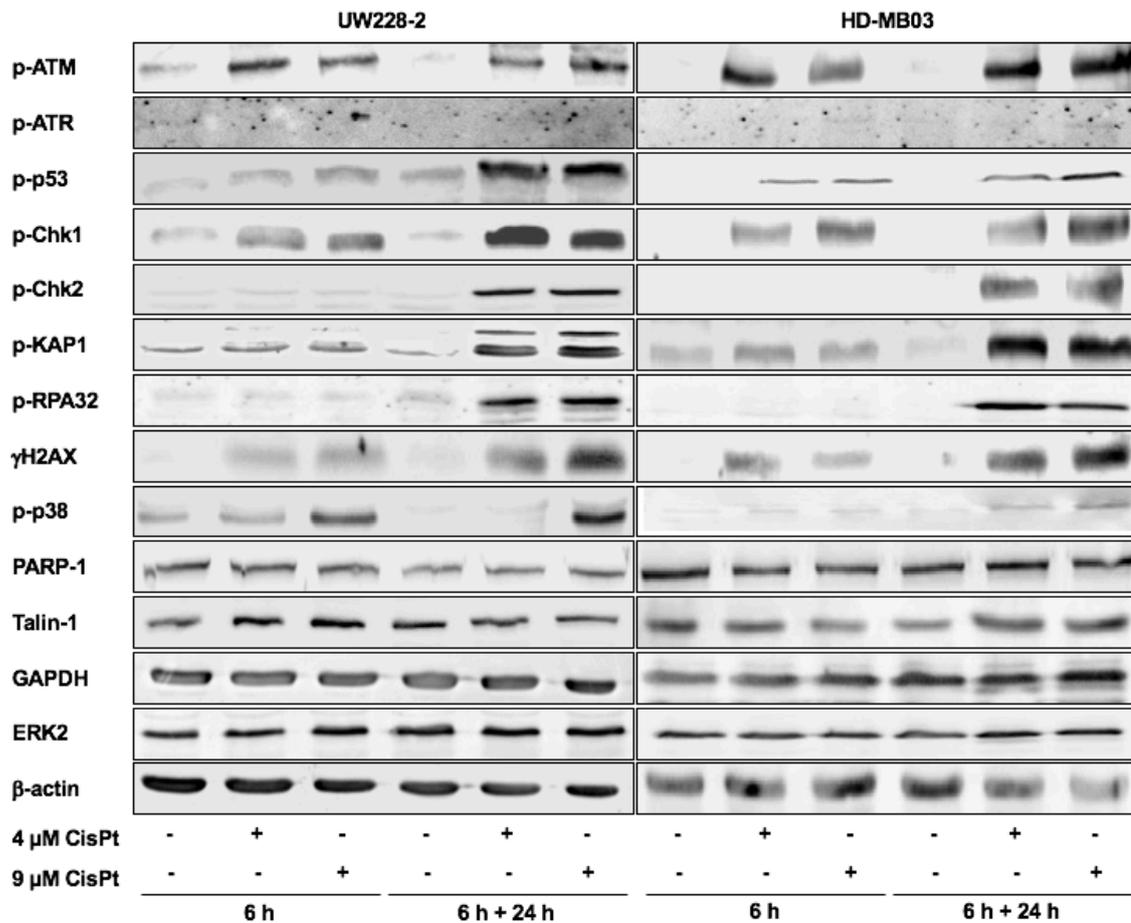
**Abb. 9:  $\gamma$ H2AX- und 53BP1-Foci zeigen die durch Cisplatin induzierten DNA-Doppelstrangbrüche auf.**

UW228-2-Zellen wurden für 6 h mit Cisplatin (CisPt) behandelt und zum Teil anschließend für weitere 24 h ohne Zytostatikum inkubiert (6 h + 24 h). Anschließend wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie induzierte Doppelstrangbrüche durch spezifische Antikörper gegen  $\gamma$ H2AX und 53BP1 sichtbar gemacht und pro Nukleus ausgezählt. Dargestellt sind in A) repräsentative Bilder der Fluoreszenzaufnahmen sowie in B) die ausgezählten  $\gamma$ H2AX- und 53BP1- sowie kolokalisierte Foci pro Zellkern. Die dargestellten Daten zeigen den Mittelwert + Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils als Duplikate durchgeführt wurden. Pro Bedingung und Experiment wurden jeweils mindestens 100 Zellkerne ausgezählt. Statistik: \*: statistische Signifikanz von CisPt vs. Kon (unbehandelte Kontrollpopulation); \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ . #: statistische Signifikanz von 9  $\mu$ M CisPt vs. 4  $\mu$ M CisPt; #:  $p \leq 0,05$ ; ##:  $p \leq 0,01$ ; ###:  $p \leq 0,001$ .

### 3.4.2 Cisplatin induziert die Aktivierung der DNA-Schadensantwort in zwei

#### Medulloblastomzelllinien

Um den Einfluss von Cisplatin auf die DNA-Schadensantwort von Medulloblastomzellen weiter zu analysieren wurden Western Blot-Analysen unter Verwendung verschiedener phosphospezifischer Antikörper durchgeführt. Dazu wurden UW228-2- und HD-MB03-Zellen einer sechsstündigen Cisplatinbehandlung ausgesetzt. Anschließend erfolgte bei einem Teil die direkte Isolierung von Schlüsselproteinen der DNA-Schadensantwort für Western Blot-Analysen wie unter 2.2.3 beschrieben. Ein anderer Teil erhielt einen Mediumswechsel und wurde für weitere 24 h ohne eine Behandlung nachinkubiert. Die anschließend untersuchten Proteine stellen wichtige Bestandteile der DNA-Schadensantwort dar. Die Phosphorylierung der Kinasen ATR und ATM (p-ATR, p-ATM), die durch Einzelstrangbrüche (ATR) bzw. Doppelstrangbrüche (ATM) aktiviert werden, wurden mittels Western Blot-Analysen nachgewiesen.



**Abb. 10: Western Blot-Analysen zeigen die Aktivierung der DNA-Schadensantwort in Medulloblastomzellen nach Cisplatinbehandlung.**

UW228-2- und HD-MB03-Zellen wurden mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen Cisplatin (CisPt) für 6 h behandelt. Ein Teil der Zellen erhielt zudem eine 24-stündige Postinkubationsphase (6 h + 24 h) ohne eine weitere Behandlung. Anschließend wurde mit Hilfe von Western Blot-Analysen der Aktivierungsstatus der DNA-Schadensantwort ermittelt. Die Proteinmenge der Zytoskelettproteine Talin-1 und β-Aktin sowie von ERK2 (extrazellulär regulierte Kinase) und dem Enzym der Glykolyse GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) dienten als Ladekontrolle. Die gezeigten Daten sind jeweils repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Ebenso wurde die Phosphorylierung der in der DNA-Schadensantwort ATM und ATR nachgeschalteten Proteine p-Chk1 (Checkpointkinase 1), p-Chk2 (Checkpointkinase 2), p-RPA32 (die 32 kDa Untereinheit des Replikationsproteins A2), p-Kap1 (KRAB-assoziiertes Protein 1), p-P53 (Tumorsuppressorprotein P53), und des Histons H2AX (γH2AX) untersucht. Zudem wurde die Phosphorylierung der Kinase p38 (p-p38) und das Reparaturprotein Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1), das an der Basenexzisionsreparatur beteiligt ist, mittels Western Blot-Analysen dargestellt. Die Aktivierung der DNA-Schadensantwort ließ sich nach 6 h Cisplatinbehandlung bereits deutlich erkennen. Sowohl in UW228-2- als auch in HD-MB03-Zellen wurde eine Cisplatin-induzierte Phosphorylierung von ATM, Chk1, Kap1, P53 und H2AX

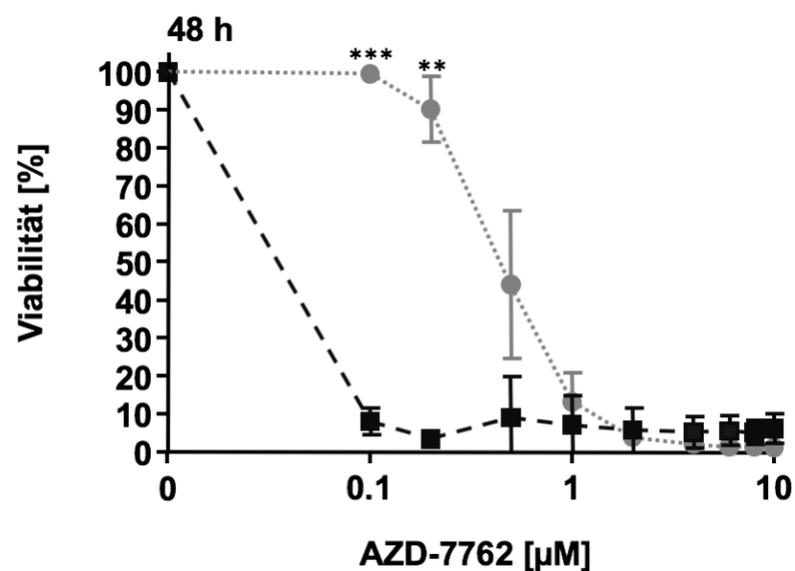
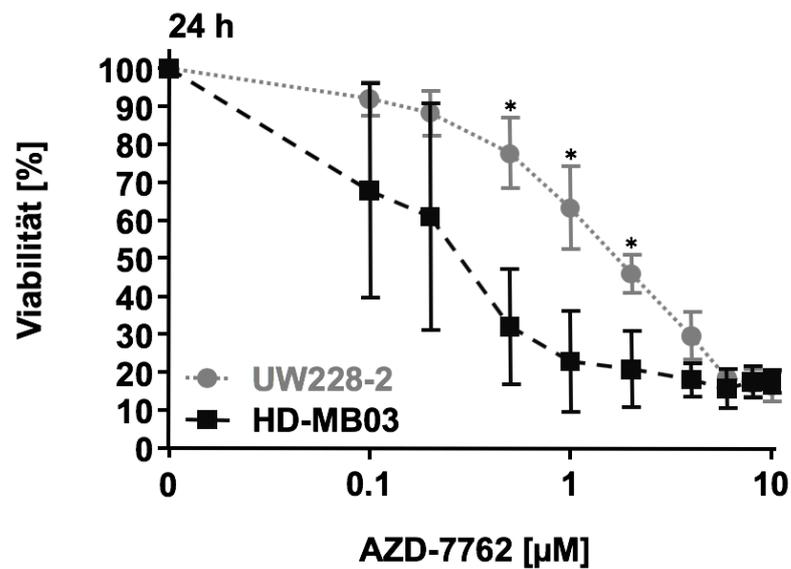
beobachtet. Diese Aktivierung der DNA-Schadensantwort war sowohl nach der Behandlung mit 4  $\mu$ M als auch mit 9  $\mu$ M Cisplatin erkennbar. Eine wesentliche Dosisabhängigkeit konnte hier nicht detektiert werden (Abb. 10). Die Kinase p38 wurde nur in UW228-2-Zellen nach der sechsstündigen Inkubationsphase phosphoryliert. Die Kinase Chk2 und das Protein RPA32 wurden in beiden Zelllinien nach 6 h Cisplatinbehandlung nicht aktiviert. Die 24-stündige Postinkubationsphase führte zu einer deutlichen Zunahme der Phosphorylierung von ATM, P53, Chk1, Kap1 und H2AX in beiden Medulloblastomzelllinien. Auch die Checkpointkinase 2 und das Protein RPA32 zeigten nach 6 h + 24 h Behandlung nun eine starke Phosphorylierung (p-Chk2, p-RPA32). Hier war ebenfalls kein Unterschied zwischen den beiden Zelllinien erkennbar. Das Reparaturprotein Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) zeigte auch in den unbehandelten Kontrollzellen eine starke Expression sowohl nach 6 h als auch nach 6 h + 24 h Cisplatinbehandlung.

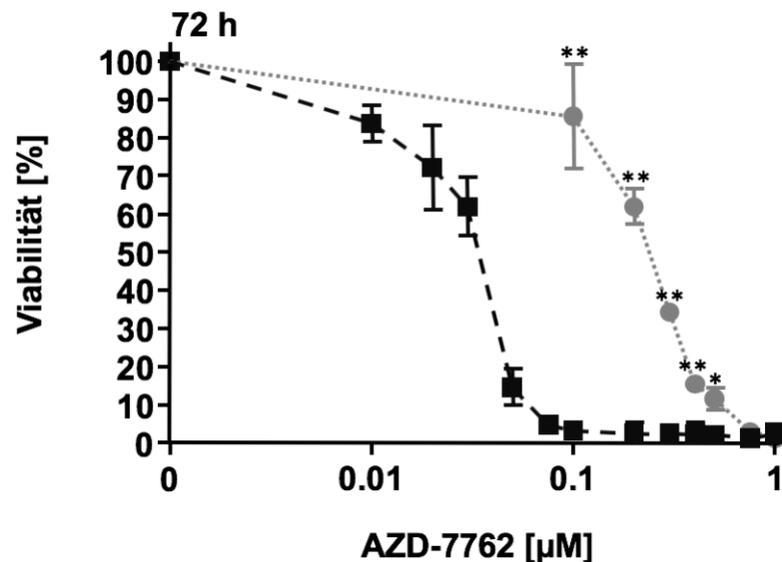
Zusammenfassend zeigte eine Behandlung mit dem Zytostatikum Cisplatin eine eindeutige Aktivierung der DNA-Schadensantwort in beiden Medulloblastomzellen bereits nach 6 h Inkubationszeit. Nach einer 24-stündigen Postinkubationsphase war die Phosphorylierung der Proteine als Zeichen der Aktivierung der DNA-Schadensantwort noch deutlich ausgeprägter vorhanden. Hierbei zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien UW228-2 und HD-MB03. Auch eine Dosisabhängigkeit war nicht klar auszumachen, da die Aktivierung der Proteine bereits von der  $IC_{50}$  von Cisplatin induziert werden konnte.

### **3.5 Chk1-Inhibition induziert einen dosisabhängigen Viabilitätsverlust in Medulloblastomzellen**

Als nächstes sollte der Einfluss einer Chk1-Inhibition auf die Tumorzellen analysiert werden. Dafür wurde erneut eine Viabilitätsmessung der Medulloblastomzellen mit Hilfe des Alamar Blue-Assays durchgeführt. Hierfür wurden sowohl die UW228-2- als auch die HD-MB03-Zellen 24 h nach ihrer Aussaat mit unterschiedlichen Dosen AZD-7762 inkubiert. Nach drei verschiedenen Inkubationszeiten (24 h, 48 h und 72 h Dauerbehandlung) wurde die Lebensfähigkeit der Zellen durch den Alamar Blue-Assay bestimmt und die Zellviabilität in Prozent der unbehandelten Kontrolle für jede Konzentration in einen Graphen aufgetragen. Die entstandenen Dosiswirkungskurven

sind in Abbildung 11 zu sehen. Die beiden Medulloblastomzelllinien zeigten deutliche Unterschiede in ihrer Viabilität nach Behandlung mit dem Chk1-Inhibitor AZD-7762 zu allen drei Behandlungszeitpunkten. Die HD-MB03 Zelllinie, die Medulloblastomzellen der Gruppe 3 mit einer hohen Expression von c-Myc entspricht, zeigte zu allen drei Messzeiten eine signifikant höhere Empfindlichkeit gegenüber AZD-7762 im Vergleich zur UW228-2 Zelllinie, die eine niedrige Myc Expression aufweist.





**Abb. 11: Einfluss der Chk1-Inhibition auf die Viabilität von Medulloblastomzellen.**

UW228-2- und HD-MB03-Zellen wurden für 24 h, 48 h und 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen AZD-7762 behandelt. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels des Alamar Blue-Assays analysiert. Die gezeigten Ergebnisse in den Graphen sind als lebensfähige Zellen in Prozent der unbehandelten Kontrolle ausgedrückt, die auf 100 % normalisiert wurden. Dargestellt ist der Mittelwert ± die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten (8 Replikate pro Bedingung). Für die statistische Analyse wurde ein Student's T-Test angewendet. \*: statistische Signifikanz von UW228-2 vs. HD-MB03. \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*:  $p \leq 0,05$ .

Die hohe Sensitivität der HD-MB03-Zellen gegenüber einer Chk1-Hemmung wurde auch in den anschließend gemessenen  $IC_{50}$  und  $IC_{80}$  für beide Zelllinien deutlich, welche in Tabelle 16 zusammengefasst wurden. Die so ermittelten Daten ermöglichten es sinnvolle Konzentrationen für nachfolgende Versuche zu identifizieren. So ergaben sich für weitere Experimente Behandlungsdosen von 0,05  $\mu$ M und 0,2  $\mu$ M AZD-7762 für die HD-MB03-Zellen und eine jeweils zehnfach höhere Konzentration (0,5  $\mu$ M und 2  $\mu$ M) für die UW228-2-Zellen.

AZD-7762	$IC_{50}$	$IC_{80}$	
24 h	0,2 $\mu$ M	3 $\mu$ M	HD-MB03
	2 $\mu$ M	6 $\mu$ M	UW228-2
48 h	0,05 $\mu$ M	0,09 $\mu$ M	HD-MB03
	0,45 $\mu$ M	0,9 $\mu$ M	UW228-2
72 h	0,03 $\mu$ M	0,05 $\mu$ M	HD-MB03
	0,3 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	UW228-2

**Tabelle 16: Einfluss einer Chk1-Inhibition auf die Zellviabilität von Medulloblastomzellen mit und ohne c-Myc-Amplifikation**

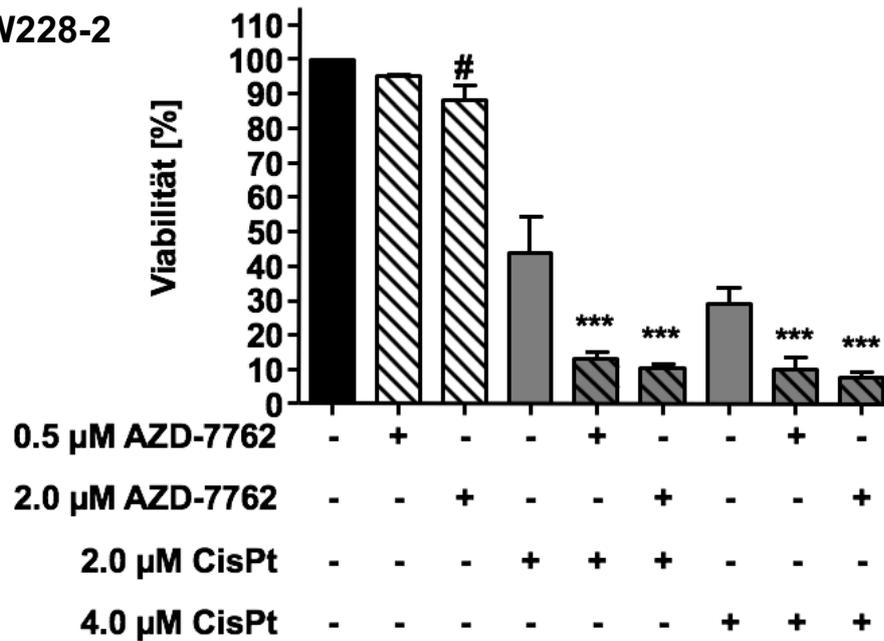
UW228-2- und HD-MB03-Medulloblastomzellen wurden für 24 h, 48 h und 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen AZD-7762 behandelt. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels des Alamar Blue-Assays analysiert (Abbildung 11). Aufgelistet sind die zu allen drei Messzeitpunkten ermittelten *inhibitory concentration* 50 % ( $IC_{50}$ ) und *inhibitory concentration* 80 % ( $IC_{80}$ ).

## **3.6 Chk1-Inhibition sensibilisiert Medulloblastomzellen gegenüber einer Cisplatinbehandlung**

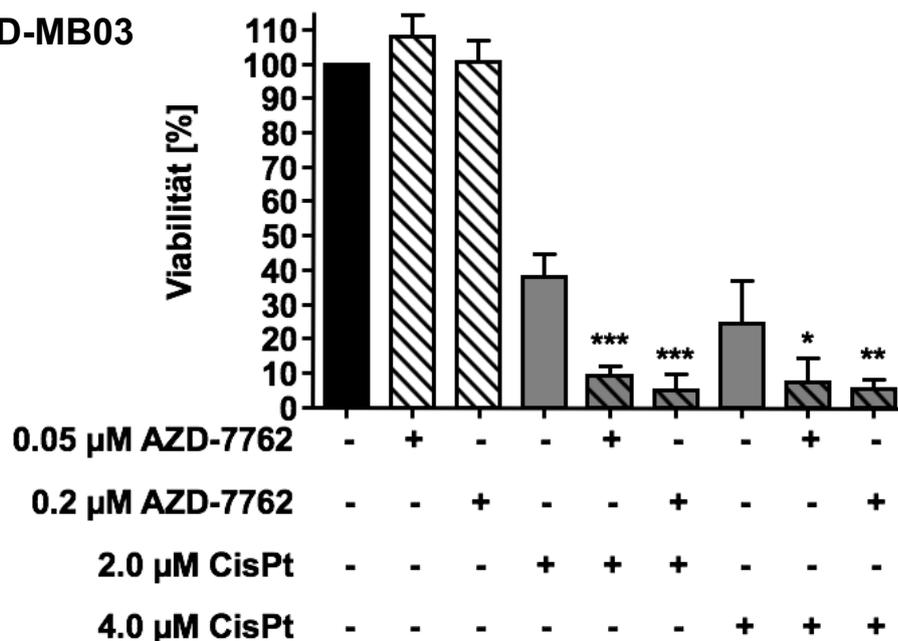
### **3.6.1 Chk1-Hemmung sensibilisiert Medulloblastomzellen für den Cisplatin-induzierten Viabilitätsverlust**

Um zu überprüfen, ob der Chk1-Inhibitor AZD-7762 die Medulloblastomzellen gegenüber einer Behandlung mit Cisplatin sensibilisieren kann, wurden UW228-2- und HD-MB03-Zellen in Anwesenheit und Abwesenheit des Chk1-Inhibitors einer Behandlung mit Cisplatin unterzogen. Hierzu wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen Cisplatin und AZD-7762 inkubiert und darauffolgend die Zellviabilität mittels des Alamar Blue-Assays analysiert. Die erste Behandlungsgruppe der ausgesäten UW228-2- und HD-MB03-Zellen wurde für 2 h mit zwei verschiedenen Konzentrationen AZD-7762 behandelt und anschließend für 72 h ohne eine weitere Behandlung nachinkubiert (Abbildung 12, weiße Balken, straffiert). Eine zweite Gruppe wurde für 72 h einer Cisplatinbehandlung mit 2  $\mu\text{M}$  oder 4  $\mu\text{M}$  Cisplatin ausgesetzt (Abbildung 12, graue Balken, nicht straffiert). Eine dritte Zellgruppe wurde für 2 h mit dem Chk1-Inhibitor AZD-7762 vorbehandelt (UW228-2-Zellen: 0,5  $\mu\text{M}$  und 2  $\mu\text{M}$ ; HD-MB03-Zellen: 0,05  $\mu\text{M}$  und 0,2  $\mu\text{M}$ ) und erhielt anschließend eine 72-stündige Dauerbehandlung mit Cisplatin (2  $\mu\text{M}$  und 4  $\mu\text{M}$ ) (Abbildung 12, graue Balken, straffiert). Gleichzeitig wurde pro Experiment eine unbehandelte Kontrollgruppe mitgeführt, die weder mit Cisplatin noch mit AZD-7762 behandelt wurde (Abbildung 12, schwarze Balken). Die Zellviabilität wurde nachfolgend mittels Alamar Blue-Assay bestimmt und die unbehandelte Kontrollgruppe für die Auswertung auf 100 % gesetzt. Die UW228-2-Zellen wurden mit deutlich höheren Konzentrationen AZD-7762 behandelt als die HD-MB03-Zellen (0,5  $\mu\text{M}$  vs. 0,05  $\mu\text{M}$  und 2,0  $\mu\text{M}$  vs. 0,2  $\mu\text{M}$ ), in Anlehnung an die oben beschriebenen unterschiedlichen Sensitivitäten beider Zelllinien gegenüber diesem Chk1-Inhibitor (s. 3.5). Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, sensibilisierte eine Chk1-Inhibition sowohl UW228-2- als auch HD-MB03-Medulloblastomzellen für eine Behandlung mit Cisplatin hoch signifikant. Nach alleiniger 72-stündiger Behandlung mit der höheren Konzentration Cisplatin lag die Zellviabilität bei 30 % in der UW228-2-Population und bei 25 % in der HD-MB03-Population.

### A) UW228-2



### B) HD-MB03



**Abb. 12: Der Chk1-Inhibitor AZD-7762 sensibilisiert Medulloblastomzellen gegenüber einem Cisplatin-induzierten Viabilitätsverlust.**

A) UW228-2- und B) HD-MB03-Zellen wurden entweder für 2 h mit unterschiedlichen Konzentrationen AZD-7762 vorbehandelt (UW228-2: 0,5  $\mu\text{M}$  und 2,0  $\mu\text{M}$ ; HD-MB03: 0,05  $\mu\text{M}$  und 0,2  $\mu\text{M}$ ) oder nicht vorbehandelt. Anschließend wurde die Hälfte der vorbehandelten und unvorbehandelten Zellen für 72 h mit 2  $\mu\text{M}$  oder 4  $\mu\text{M}$  Cisplatin (CisPt) behandelt ohne eine weitere Checkpointkinase 1 (Chk1)-Inhibierung. Der Anteil an lebenden Zellen wurde mittels Alamar Blue-Assay gemessen. Die gezeigten Ergebnisse sind als lebensfähige Zellen in Prozent der unbehandelten Kontrolle ausgedrückt, die auf 100 % normalisiert wurde. Dargestellt sind der Mittelwert + die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten (jeweils 8 Replikate pro Bedingung). Für die statistische Analyse wurde ein 2-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest angewendet. #: statistische Signifikanz von AZD-7762 vs. der unbehandelten Kontrolle; #:  $p \leq 0,05$ . \*: statistische Signifikanz von AZD-7762 + CisPt vs. CisPt. \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*:  $p \leq 0,05$ .

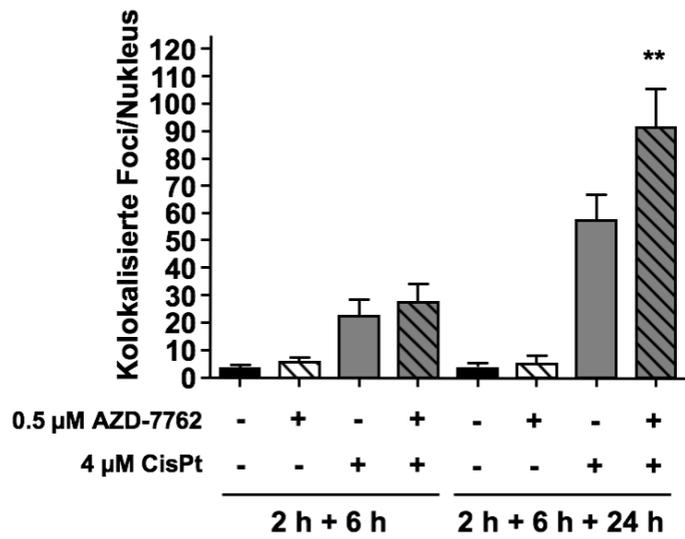
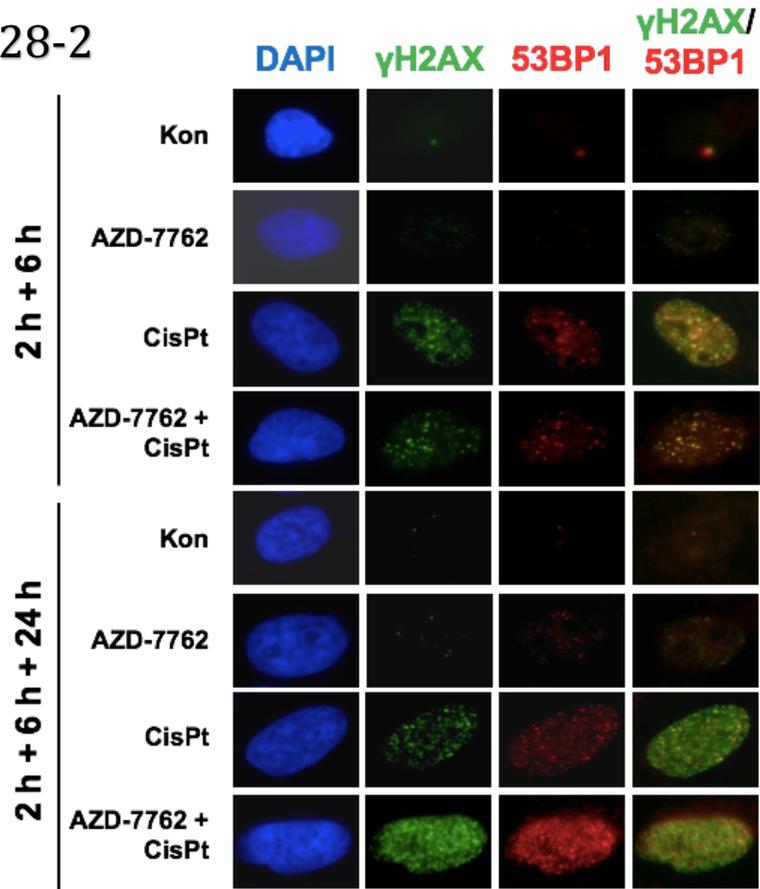
Bei einer Vorbehandlung mit AZD-7762 lag die Zellviabilität in beiden Populationen nur noch bei 5 bis 10 %. Eine Dosisabhängigkeit konnte hierbei nicht beobachtet werden. Eine höhere Dosierung sowohl des Chk1-Inhibitors als auch von Cisplatin führte bei der Cobehandlung nicht zu signifikant höheren Viabilitätsverlusten in den beiden Zelllinien. Die alleinige Chk1-Inhibierung führte des Weiteren nur in den UW228-2-Zellen und nur bei einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  zu einer geringen, aber statistisch signifikanten Abnahme der Lebensfähigkeit im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. In den HD-MB03-Zellen konnte kein Viabilitätsverlust durch eine zweistündige Chk1-Inhibierung detektiert werden, weder bei einer Konzentration von 0,05  $\mu\text{M}$  noch bei 0,2  $\mu\text{M}$ . Zusammenfassend zeigte sich eine Zunahme des Cisplatin-induzierten Viabilitätsverlustes durch Vorbehandlung mit noch nicht toxisch wirkenden Konzentrationen des Chk1-Inhibitors in beiden Medulloblastomzelllinien. Eine statistisch hoch signifikante Zunahme des Viabilitätsverlustes konnte bereits bei Nachbehandlung mit der  $\text{IC}_{50}$  von Cisplatin erzielt werden und zeigte sich durch höhere Cisplatindosen nicht wesentlich progredient.

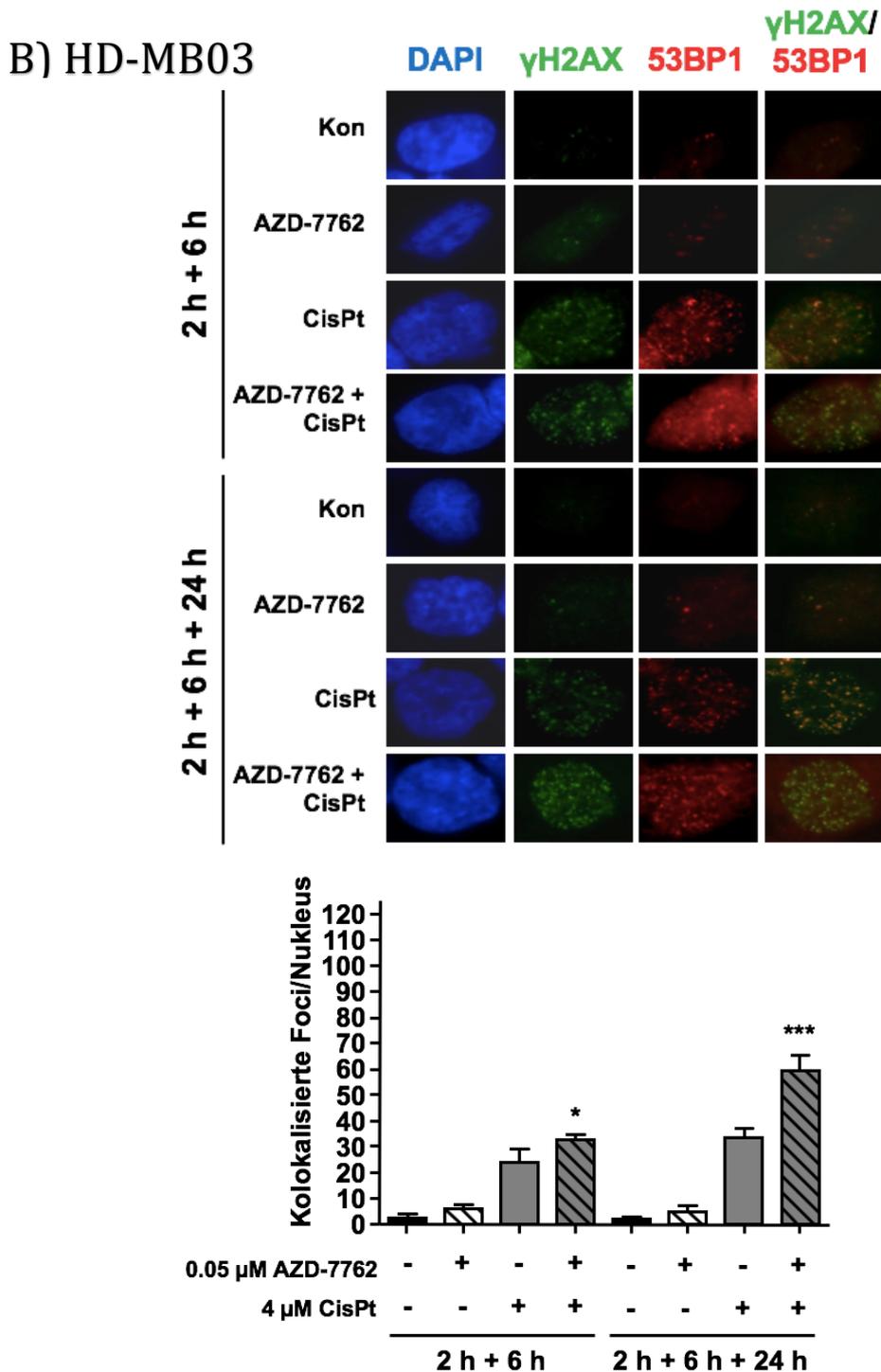
### **3.6.2 Chk1-Inhibierung verstärkt die durch Cisplatin-induzierte Bildung von Doppelstrangbrüchen in Medulloblastomzellen**

Um die Auswirkungen der Chk1-Inhibierung als Vorbehandlung für eine Cisplatinbehandlung weiter zu untersuchen, wurden immunzytochemische Färbungen durchgeführt. Hierfür wurde jeweils eine Gruppe der beiden Medulloblastomzellen mit dem Chk1-Inhibitor für 2 h behandelt (UW228-2: 0,5  $\mu\text{M}$ ; HD-MB03: 0,05  $\mu\text{M}$  AZD-7762) und anschließend für 6 h ohne weitere Behandlung nachinkubiert (Abbildung 13, weiße Balken, straffiert). Eine andere Gruppe wurde einer alleinigen sechsständigen Cisplatinpulsbehandlung mit 4  $\mu\text{M}$  Cisplatin unterzogen (Abbildung 13, graue Balken, nicht straffiert) und eine dritte Gruppe erhielt eine zweistündige Vorbehandlung mit AZD-7762 sowie eine sechsständige Nachbehandlung mit Cisplatin (Abbildung 13, graue Balken, straffiert). Anschließend wurde die Hälfte der Zellen mittels immunzytochemischer Färbungen aufgearbeitet (2 h + 6 h). Jeweils die andere Hälfte der oben genannten drei Behandlungsgruppen wurde erst nach einer anschließenden 24-stündigen Postinkubationszeit ohne weitere Behandlung analysiert (2 h + 6 h + 24 h). Zudem wurde pro Experiment eine Kontrollgruppe, die weder eine Cisplatin-

noch eine AZD-7762-Behandlung erhielt, mitgeführt (Abbildung 13, schwarze Balken). Die Anzahl der induzierten Doppelstrangbrüche wurde durch den Nachweis von  $\gamma$ H2AX- und 53BP1-Foci sowie durch die kolokalisierten Foci pro Zellkern bestimmt. In Abbildung 13 sind zum einen repräsentative fluoreszenzmikroskopische Bilder beider Zelllinien aus der Versuchsreihe sowie die kolokalisierten  $\gamma$ H2AX- und 53BP1-Foci pro Zellkern in Graphen dargestellt. Wie im Alamar Blue-Assay bereits gesehen werden konnte, war auch hier die Sensibilisierung der Medulloblastomzellen für eine Cisplatinbehandlung durch eine Chk1-Inhibierung deutlich erkennbar. Sowohl in den HD-MB03- als auch in den UW228-2-Zellen kam es nach 2 h + 6 h + 24 h Behandlung zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl an induzierten Doppelstrangbrüchen durch die Vorbehandlung mit AZD-7762 und anschließender Cisplatinbehandlung im Gegensatz zur alleinigen Cisplatingabe. Die HD-MB03-Zellen wiesen bereits nach 2 h + 6 h Behandlung durch die Vorinkubation mit dem Chk1-Inhibitor und anschließender Cisplatingabe signifikant mehr Doppelstrangbrüche im Gegensatz zur alleinigen Cisplatinbehandlung auf. Die UW228-2-Zelllinie hingegen zeigte nach 2 h + 6 h Inkubationszeit keine statistisch signifikanten Unterschiede. In beiden Zelllinien wurden durch die Kobehandlung nach 2 h + 6 h zwischen 28 und 32 kolokalisierte Foci pro Zellkern induziert. Zudem kam es bei beiden Zelllinien zu einem weiteren Anstieg der Anzahl an kolokalisierten  $\gamma$ H2AX- und 53BP1-Foci nach der 24-stündigen Postinkubationsphase ohne eine weitere Behandlung (UW228-2: 91-Foci/Zellkern; HD-MB03: 60-Foci/Zellkern). Nach 2 h + 6 h + 24 h zeigten beide Zelllinien einen signifikanten Anstieg an Doppelstrangbrüchen nach Sensibilisierung durch die Chk1-Inhibierung im Vergleich zur alleinigen Cisplatinbehandlung. Zudem führte die alleinige zweistündige Behandlung mit AZD-7762 nicht zur Induktion von signifikant mehr Doppelstrangbrüchen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollpopulation in beiden Zelllinien. Auch nach der 24-stündigen Postinkubationsphase ließ sich durch die Chk1-Inhibierung bei beiden Medulloblastomzellen kein Anstieg in der Anzahl an induzierten Doppelstrangbrüchen verzeichnen.

A) UW228-2





**Abb. 13: Die Vorbehandlung von Medulloblastomzellen mit einem Chk1-Inhibitor führt zu mehr Cisplatin-induzierten Doppelstrangbrüchen.**

Eine Hälfte der UW228-2- und HD-MB03-Zellen wurden für 2 h mit dem Chk1-Inhibitor AZD-7762 vorbehandelt (UW228-2: 0,5  $\mu$ M; HD-MB03: 0,05  $\mu$ M). Anschließend wurden sowohl vorbehandelte als auch nicht vorbehandelte Zellen für 6 h einer Cisplatinbehandlung (CisPt) ausgesetzt. Es erfolgte nachfolgend eine direkte immunzytochemische Aufarbeitung der Zellen. Des Weiteren wurden nach einer erneuten 24-stündigen Postinkubationszeit ohne weitere Behandlung die induzierten Doppelstrangbrüche analysiert. A) UW228-2- und B) HD-MB03-Zellen. Oben werden jeweils repräsentative mikroskopische Bilder zu unterschiedlichen Zeitpunkten und Bedingungen gezeigt. Unten sind die kolokalisierten  $\gamma$ H2AX- und 53BP1-Foci als Mittelwerte + Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikate mit  $\geq 50$  analysierten Zellkernen ( $\geq 100$  Zellkerne pro Bedingung) durchgeführt wurden, aufgetragen. Für die statistische Analyse wurde ein Two-way-ANOVA mit Bonferronis Post-Test angewendet. \*: statistische Signifikanz von AZD-7762 + CisPt vs. CisPt. \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*:  $p \leq 0,05$ .

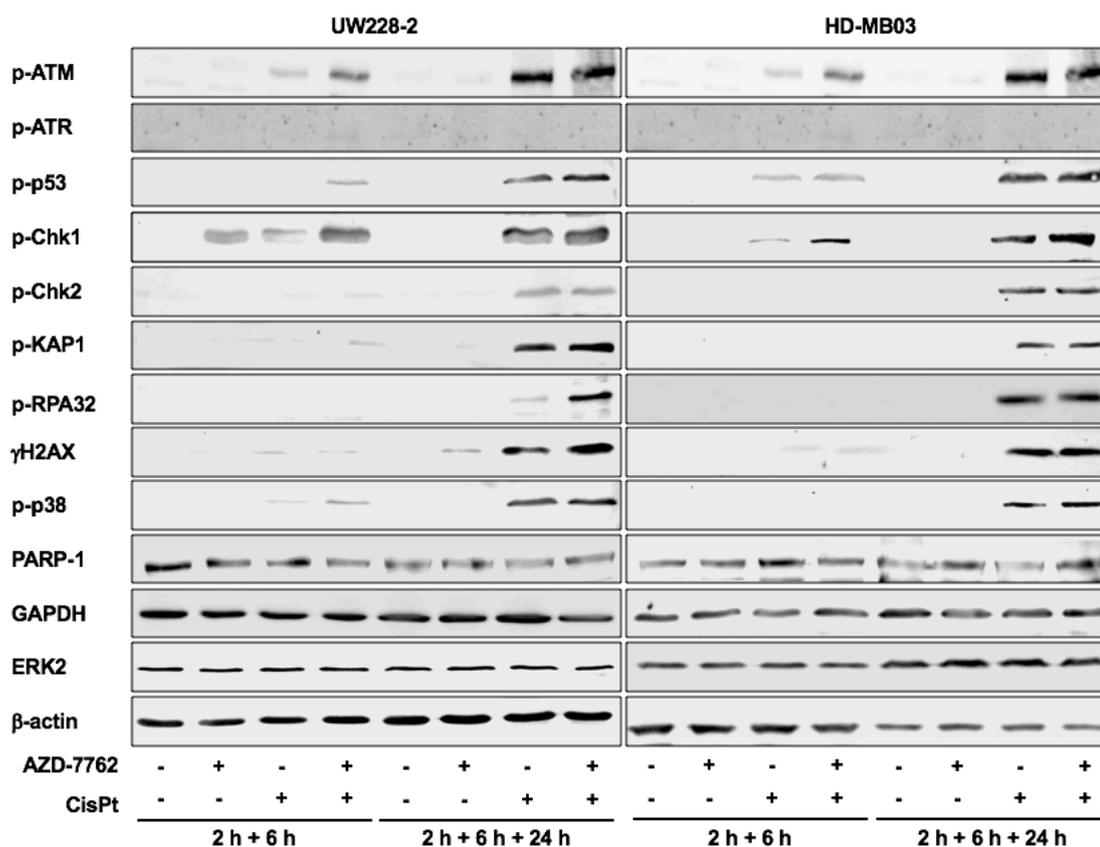
Somit führten nicht toxische Dosen des Chk1-Inhibitors in beiden Medulloblastomzelllinien zu einer signifikanten Zunahme der Cisplatin-induzierten Doppelstrangbrüchen im Gegensatz zu einer alleinigen Cisplatinbehandlung.

Zusammenfassend zeigte sich eine Sensibilisierung der beiden Medulloblastomzelllinien durch eine Chk1-Inhibierung sowohl für den Cisplatin-induzierten Viabilitätsverlust als auch für die Anzahl an Cisplatin-induzierten Doppelstrangbrüchen. Hierbei konnten deutliche Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien erkannt werden. Die HD-MB03-Zellen mit hochreguliertem c-Myc-Status benötigten nur ein Zehntel der AZD-7762-Konzentration um für den gleichen Cisplatin-induzierten Viabilitätsverlust und Cisplatin-induzierte Doppelstrangbrüche zu sensibilisieren wie die UW228-2-Zellen ohne hochregulierten c-Myc-Status.

### **3.6.3 Chk1-Inhibition verstärkt die Cisplatin-induzierte Aktivierung der DNA-Schadensantwort in Medulloblastomzellen**

Um den Einfluss einer Chk1-Inhibierung auf die Cisplatin-induzierte Aktivierung der DNA-Schadensantwort in Medulloblastomzellen genauer zu untersuchen wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden UW228-2-Zellen mit 0,5  $\mu$ M und HD-MB03-Zellen mit 0,05  $\mu$ M AZD-7762 für 2 h vorbehandelt und anschließend einem sechsständigen Cisplatinpuls mit 4  $\mu$ M Cisplatin ausgesetzt. Zudem wurde eine weitere Zellgruppe für 6 h mit Cisplatin behandelt und eine dritte Behandlungsgruppe für 2 h mit AZD-7762 inkubiert und anschließend für 6 h ohne weitere Behandlung nachinkubiert. Direkt im Anschluss (2 h + 6 h) oder nach einer jeweils weiteren 24-stündigen Postinkubationszeit ohne eine weitere Behandlung (2 h + 6 h + 24 h) wurden Western Blot-Analysen durchgeführt.

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse der Western Blot-Analysen dargestellt. Nach 2 h + 6 h Behandlung erhöhte eine Chk1-Inhibierung sowohl in UW228-2- als auch in HD-MB03-Zellen die Cisplatin-stimulierte Phosphorylierung von ATM, P53 und Chk1. Ebenfalls war eine geringe Expression an phosphoryliertem H2AX in beiden Zelllinien durch die Behandlung mit Cisplatin und Cisplatin plus AZD-7762 erkennbar ( $\gamma$ H2AX). Die Phosphorylierung von p38 war nur in UW228-2-Zellen nach 2 h + 6 h Behandlung mit Cisplatin sichtbar und wurde durch die Vorbehandlung mit AZD-7762 verstärkt.



**Abb. 14: Untersuchung des Einflusses einer Chk1-Inhibition auf die Cisplatin-induzierte Aktivierung der DNA-Schadensantwort in Medulloblastomzellen.**

Eine Hälfte der UW228-2- und HD-MB03-Zellen wurden für 2 h einer Checkpointkinase 1 (Chk1)-Inhibition mit AZD-7762 ausgesetzt. Anschließend erhielt die Hälfte der vorbehandelten und nicht vorbehandelten Zellen eine 6-stündige Cisplatinbehandlung (CisPt) (2 h + 6 h). Darauf folgend oder nach einer Postinkubationsphase von 24 h ohne weitere Behandlung (2 h + 6 h + 24 h) wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Es wurden jeweils zwei unabhängige Experimente durchgeführt. GAPDH, ERK2 und β-Actin dienten als Ladungskontrollen.

Ebenfalls ließ sich nach diesem Zeitintervall eine geringe Phosphorylierung von Chk2 und Kap1 nach AZD-7762 Vorbehandlung und Cisplatin Nachbehandlung nur in den UW228-2-Zellen erkennen. Nach der 24-stündigen Postinkubationsphase kam es mit und ohne Vorbehandlung mit AZD-7762 durch die Behandlung mit Cisplatin zur Phosphorylierung und somit Aktivierung von ATM, P53, Chk1, Chk2, Kap1, RPA32, H2AX und p38 in beiden Zelllinien. Das Reparaturprotein PARP-1 zeigte in beiden Zelllinien in allen Bedingungen eine hohe Expression. Die Phosphorylierung der Kinase ATR konnte zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden. Eine Verstärkung der Cisplatin-induzierten Expression von p-ATM und p-Chk1 konnte durch die Vorbehandlung mit dem Chk1-Inhibitor in beiden Zelllinien induziert werden. Zudem konnte die Inkubation mit AZD-7762 in UW228-2-Zellen die Cisplatin-induzierte Phosphorylierung von RPA (p-

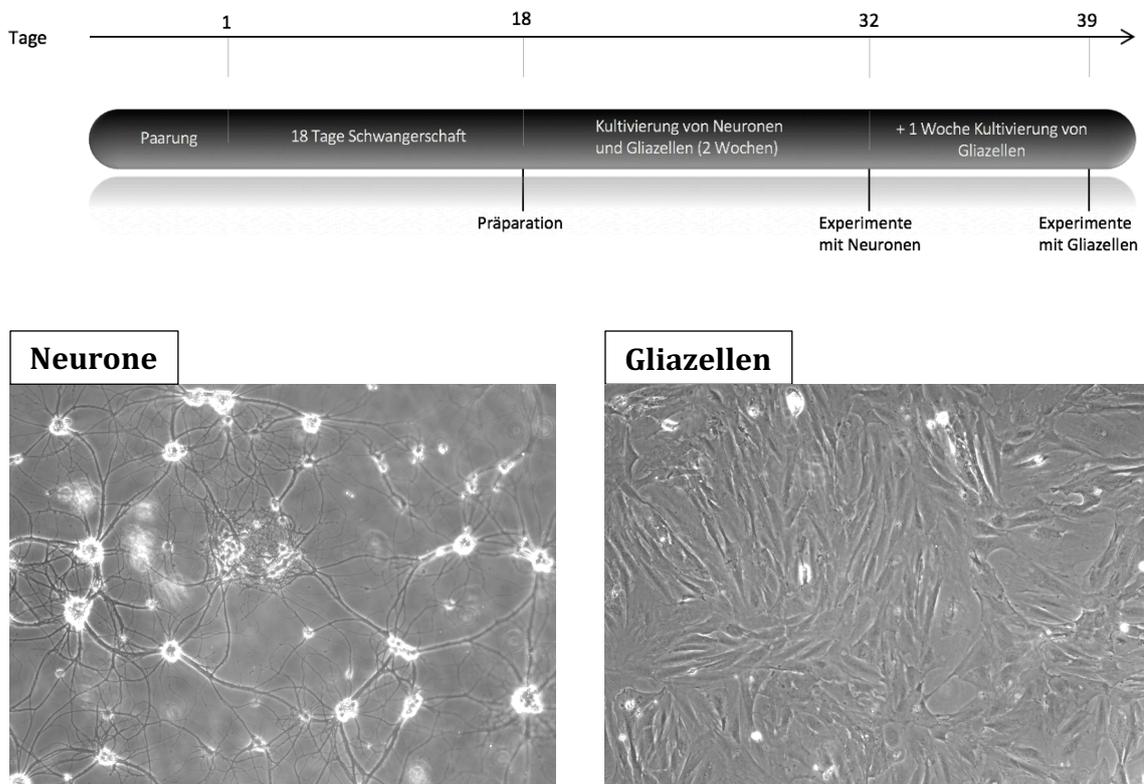
RPA) und H2AX ( $\gamma$ H2AX) verstärken. Die alleinige 2-stündige AZD-7762-Behandlung führte nur nach 2 h + 6 h und nur in UW228-2-Zellen (0,5  $\mu$ M AZD-7762) zu einer Phosphorylierung von Chk1. Nach 2 h + 6 h + 24 h war diese nicht mehr nachweisbar und alle anderen analysierten Proteine wurden durch die alleinige Chk1-Inhibierung nicht aktiviert. Diese Daten unterstützten die bereits gewonnenen Ergebnisse und zeigen, dass eine Chk1-Inhibierung zu einer stärkeren Cisplatin-induzierte Aktivierung der DNA-Schadensantwort in Medulloblastomzellen führte. Zusammenfassend zeigen die erhobenen Daten, dass eine Chk1-Inhibition Medulloblastomzellen sowohl für einen Cisplatin-induzierten Viabilitätsverlust sensibilisierte als auch mehr Cisplatin-induzierte Doppelstrangbrüche verursachte sowie eine starke DNA-Schadensantwort auslöste. Die zytotoxische Wirkung von Cisplatin wurde durch AZD-7762 potenziert. Um diese Effekte in ähnlicher Weise in beiden Medulloblastomzelllinien auszulösen waren zehnfach niedrigere Chk1-Inhibitor Konzentrationen für die c-Myc-amplifizierte Zelllinie ausreichend.

### **3.7 Einfluss von Cisplatin und AZD-7762 auf hippocampale Neurone und Gliazellen**

Da in der Therapie des Medulloblastoms viele Zytostatika mit neurotoxischen Nebenwirkungen Anwendung finden und die Neurotoxizität eine der dosislimitierenden Nebenwirkungen in der Therapie darstellt, sollten die Auswirkungen von Cisplatin und AZD-7762 auf primäre nicht maligne Neurone und Gliazellen genauer untersucht werden. Chk1 spielt in der Zellzyklusregulation eine entscheidende Rolle (s. 1.2.1.1). Chk1 hält bevorzugt in der S- und G2-Phase den Zellzyklus an, bis entstandene DNA-Schäden repariert wurden. Die meisten Neurone hingegen sind terminal entdifferenziert und befinden sich demnach in einer nicht teilenden, nicht replizierenden G0-Phase (s. Abbildung 1) (120). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Chk1-Inhibition keine großen Auswirkungen auf die sich in der G0-Phase befindlichen Neurone hat, wohl aber auf sich schnell teilende Tumorzellen.

### 3.7.1 Isolation von primären Neuronen und Gliazellen aus Rattenembryonen und fluoreszenzmikroskopische Identifizierung der hippocampalen Neurone

Die oben beschriebenen Daten zeigen, dass eine pharmakologische Inhibierung von Chk1 bevorzugt zytotoxische Signalwege in Medulloblastomzellen mit hoher c-Myc-Expression auslöst und dadurch Medulloblastomzellen für eine Cisplatinbehandlung sensibilisiert werden können. Um den Einfluss der Zytostatikabehandlung auf primäres Gewebe zu untersuchen wurden sowohl Gliazellen als auch hippocampale Neurone aus Rattenembryonen im Alter E18 isoliert und getrennt kultiviert.

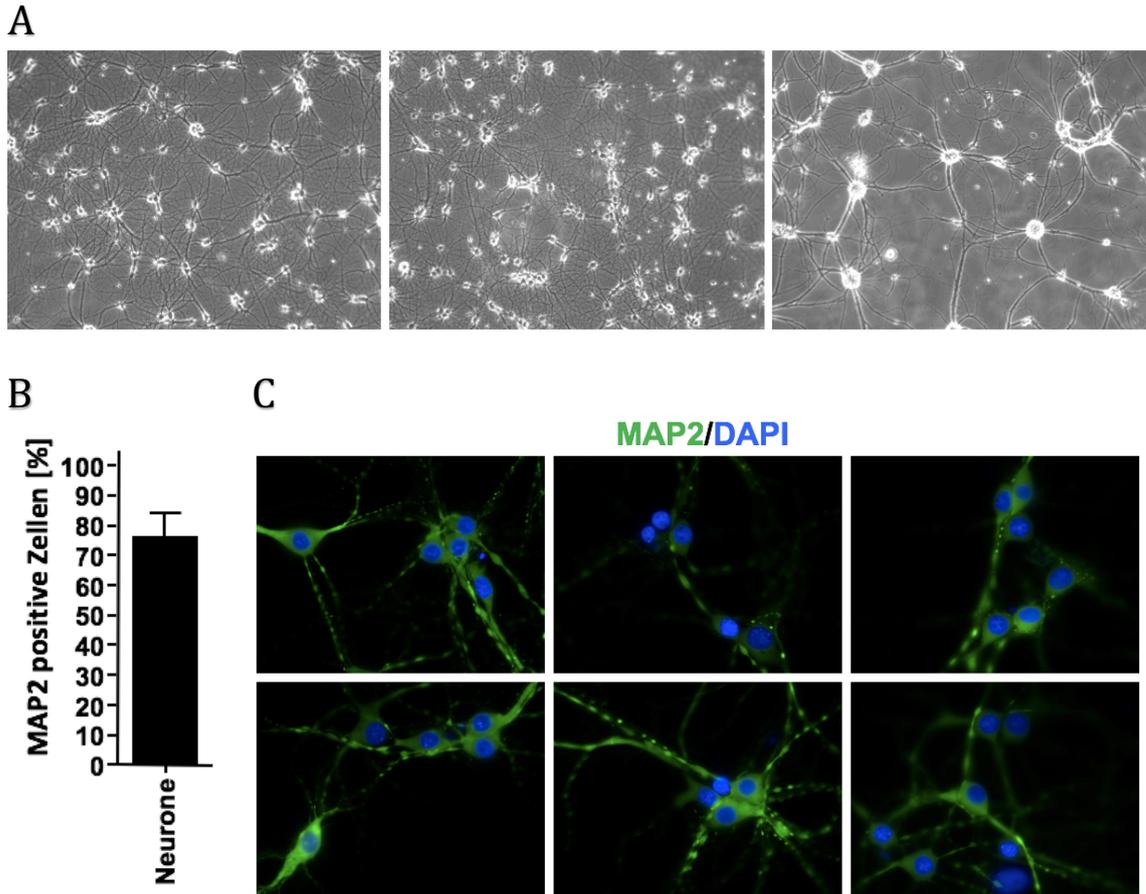


**Abb. 15: Kultivierung hippocampaler Neuronen und Gliazellen von 18 Tage alten Rattenembryonen.**

Aus einer tragende Ratte wurden 18 Tage nach der Paarung Embryonen isoliert. Anschließend wurden Neurone aus dem Hippocampus isoliert und getrennt von den Gliazellen, die ebenfalls präpariert wurden, kultiviert. Nach einer zweiwöchigen Inkubationszeit wurden die Neurone für die jeweiligen Versuche vorbereitet. Die Gliazellen wurden noch eine weitere Woche inkubiert bis sie konfluent waren und nach insgesamt 3 Wochen des Wachstums ebenfalls Experimenten unterzogen. Dargestellt ist oben ein schematischer Zeitverlauf von der Paarung bis zur Durchführung der Experimente. Unten sind repräsentative lichtmikroskopische Bilder (10-fache Vergrößerung) der Neurone nach 2-wöchiger sowie der Gliazellen nach 3-wöchiger Wachstumsphase dargestellt.

Bei Gliazellen handelt es sich um das Stützgewebe der Neurone. Sie bilden die Gewebearchitektur und Myelinscheiden der Neurone, sind an wichtigen Stoffwechsel- und Transportprozessen beteiligt und leisten einen entscheidenden Beitrag zu Abwehrfunktionen des zentralen Nervensystems durch den Aufbau der Blut-Hirn-Schranke (121).

Um Versuche mit den Neuronen und Gliazellen durchzuführen, wurden die Neurone nach der Präparation 2 Wochen lang kultiviert und anschließend für unterschiedliche Versuche vorbereitet. Die Gliazellen zeigten erst eine Woche später eine ausreichende Konfluenz und wurden daher erst nach einer dreiwöchigen Wachstumsphase den Experimenten unterzogen (s. Abbildung 15). Bei der Kultivierung der Neurone war es unmöglich eine reine neuronale Kultur anzuzüchten, da bei der Präparation die Neurone von Stützgewebe, unter anderem bestehend aus Gliazellen, umgeben sind. Das Stützgewebe konnten bei der Isolierung und Kultivierung nicht komplett von den Neuronen getrennt werden. Um zu untersuchen, ob sich in den Kulturen der hippocampalen Neurone tatsächlich überwiegend Neurone befanden, wurde zunächst eine immunzytochemische Färbung durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen der hippocampalen Kultur mit dem monoklonalen Antikörper Anti-MAP2 inkubiert und mit einem Sekundärantikörper unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. MAP2 (Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2) ist ein neuronales Protein und gehört zur MAP2 / Tau-Familie. Es befindet sich bevorzugt auf dem Zellkörper und in den Dendriten von Neuronen und fungiert als neuronenspezifischer Marker (122). Zudem wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop die Zellkerne durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI, der sich an doppelsträngige DNA anlagert und bei Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert, sichtbar gemacht, ausgezählt und die MAP2-positiven Zellen ins Verhältnis zu den MAP2-negativen Zellen gesetzt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass 75 % der Zellkerne Map2-positiv waren und somit Neuronen entsprachen (Abb. 16). Die Färbung wurde identisch an den Zellen der Gliazellkulturen durchgeführt, wobei nur die Zellkerne im Mikroskop sichtbar wurden und kein einziges Neuron durch die Map2-Färbung dargestellt werden konnte.



**Abb. 16: Kultivierung und fluoreszenzmikroskopische Darstellung von hippocampalen Rattenneuronen durch den neuronalen Marker Anti-MAP2.**

Hippocampale Neurone wurden aus 18-Tage alten Embryonen einer Ratte isoliert und nach 2 Wochen Wachstum mit dem monoklonalen Antikörper Anti-MAP2 inkubiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. A) Exemplarische lichtmikroskopische Bilder von einer zwei Wochen alten neuronalen Kultur (10- und 20-fache Vergrößerung). B) Gemittelter prozentualer Anteil an Anti-MAP2-positiven Zellen aus insgesamt 7 Versuchen im Verhältnis zu allen sichtbaren Zellkernen. Die gezeigten Daten setzten sich aus sieben unabhängigen neuronalen Kulturen (Neurone aus Embryonen von sieben unterschiedlichen Ratten) + Standardabweichung zusammen. Ausgezählt wurden pro Kultur über 200 Zellkerne. C) Exemplarische Bilder der Fluoreszenzmikroskopaufnahmen (20-fache Vergrößerung).

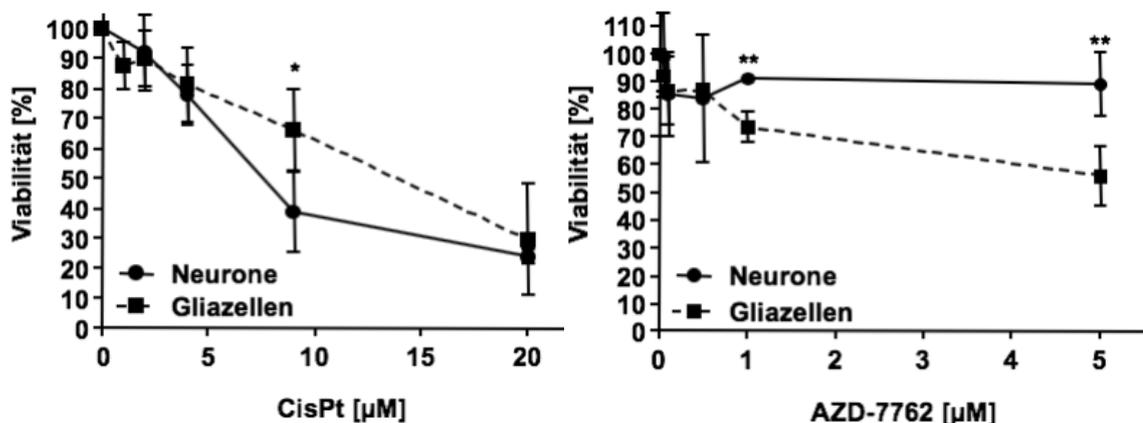
Durch die Map2-Färbung wurde nachgewiesen, dass es sich in den Kulturen zum großen Teil um Neuronen handelte und dass nur die Neurone durch den Fluoreszenzfarbstoff angefärbt wurden. So war es bei weiteren immunzytochemischen Färbungen möglich gezielt nur die Veränderungen in den Neuronen zu analysieren.

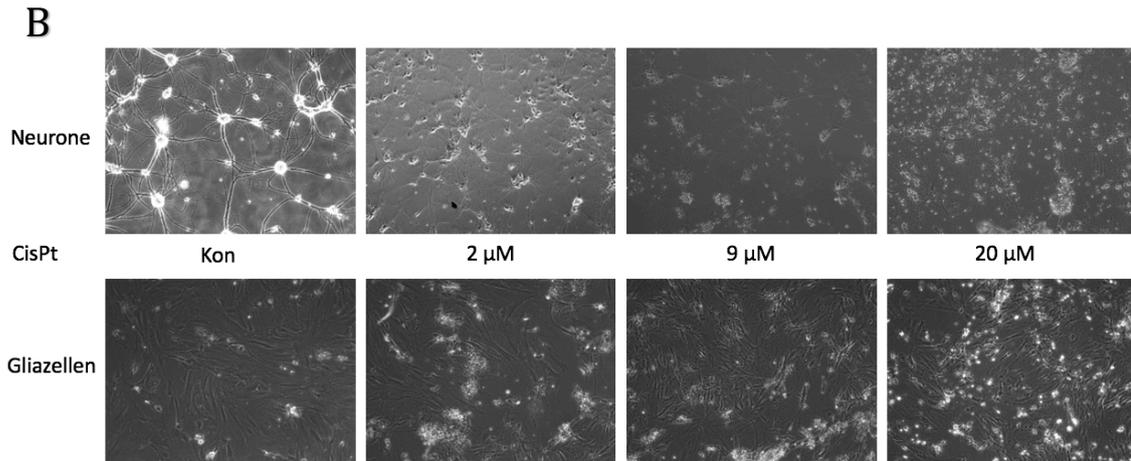
### **3.7.2 Cisplatin führt im Gegensatz zur Chk1-Inhibition zu einem dosisabhängigen Viabilitätsverlust in primären Neuronen und Gliazellen**

Um den Einfluss von Cisplatin und AZD-7762 auf nicht-malignes Gewebe zu untersuchen wurde zunächst die Zellviabilität von primären Neuronen und Gliazellen

nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen der vorgenannten Substanzen bestimmt. Zudem wurde pro Experiment eine Kontrollgruppe aus jeweils unbehandelten Neuronen und Gliazellen, die weder eine Cisplatin- noch eine AZD-7762-Behandlung erhielten, mitgeführt. In dieser Kontrollgruppe wurde lediglich ein Mediumwechsel vorgenommen und die Zellen wurden später zur Normierung genutzt. Nach 72 h Dauerbehandlung mit Cisplatin oder AZD-7762 wurde die Lebensfähigkeit der Zellen mit Hilfe des Alamar Blue-Assays bestimmt. Die unbehandelten Kontrollzellen wurden hierfür auf 100 % gesetzt. Wie erwartet reduzierte Cisplatin die Lebensfähigkeit der Zellen dosisabhängig. Dabei wurden die jeweiligen  $IC_{50}$  für beide Zellarten ermittelt. Bei Behandlung mit Cisplatin ergab sich für die Neurone eine  $IC_{50}$  von 7,5  $\mu\text{M}$  und für die Gliazellen von 14  $\mu\text{M}$  Cisplatin. Nur bei einer Konzentration von 9  $\mu\text{M}$  Cisplatin konnte ein signifikanter Unterschied in der Zellviabilität von Neuronen und Gliazellen ermittelt werden. Zwar war die berechnete  $IC_{50}$  für Gliazellen fast doppelt so hoch wie für Neurone, bei einer hohen Dosis von 20  $\mu\text{M}$  Cisplatin zeigten beide Zellen aber wieder einen ähnlichen Viabilitätsverlust. Eine Cisplatinbehandlung mit den unter 3.1 ermittelten  $IC_{50}$  (4  $\mu\text{M}$ ) und  $IC_{80}$  (9  $\mu\text{M}$ ) der Medulloblastomzellen schädigte primäre Zellen ebenfalls in einem hohen Ausmaß. Die primären Zellen zeigten im Vergleich zu den Medulloblastomzellen eine niedrigere Sensibilität gegenüber Cisplatin. Ein erheblicher Viabilitätsverlust von bis zu 75 % war jedoch nachweisbar. Der Viabilitätsverlust war bei den Neuronen stärker ausgeprägt als bei den Gliazellen. Eine Chk1-Inhibierung reduzierte die Lebensfähigkeit der primären Zellen in einem deutlich geringeren Ausmaß als die Cisplatinbehandlung.

A





**Abb. 17: Viabilitätsmessung von Neuronen und Gliazellen aus Rattenembryonen nach 72-stündiger Dauerbehandlung mit Cisplatin oder dem Chk1-Inhibitor AZD-7762.**

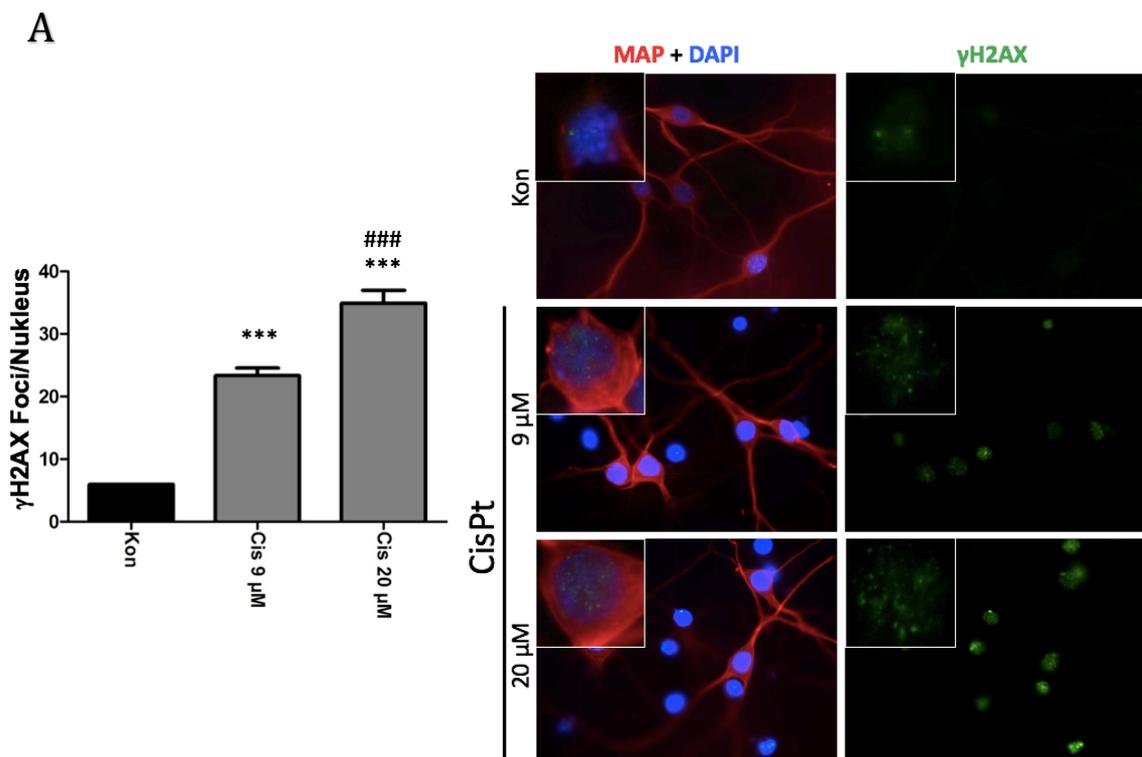
Primäre Rattenneurone und Gliazellen wurden für 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen Cisplatin (CisPt) und dem Chk1-Inhibitor AZD-7762 behandelt. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels des Alamar Blue-Assays gemessen. A) Zu sehen sind die Ergebnisse als lebensfähige Zellen in Prozent der unbehandelten Kontrolle, die auf 100 % normalisiert wurde. Dabei sind jeweils die Ergebnisse der Neuronen und Gliazellen in einem Graphen aufgetragen; links nach Behandlung mit Cisplatin und rechts mit AZD-7762. B) Lichtmikroskopische Aufnahmen aus der Cisplatinversuchsreihe (10-fache Vergrößerung). Die gezeigten Daten sind der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils als Duplikate durchgeführt wurden. Für die statistische Analyse wurde ein Student's T-Test angewendet. \*: statistische Signifikanz von Neuronen vs. Gliazellen. \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*:  $p \leq 0,05$ .

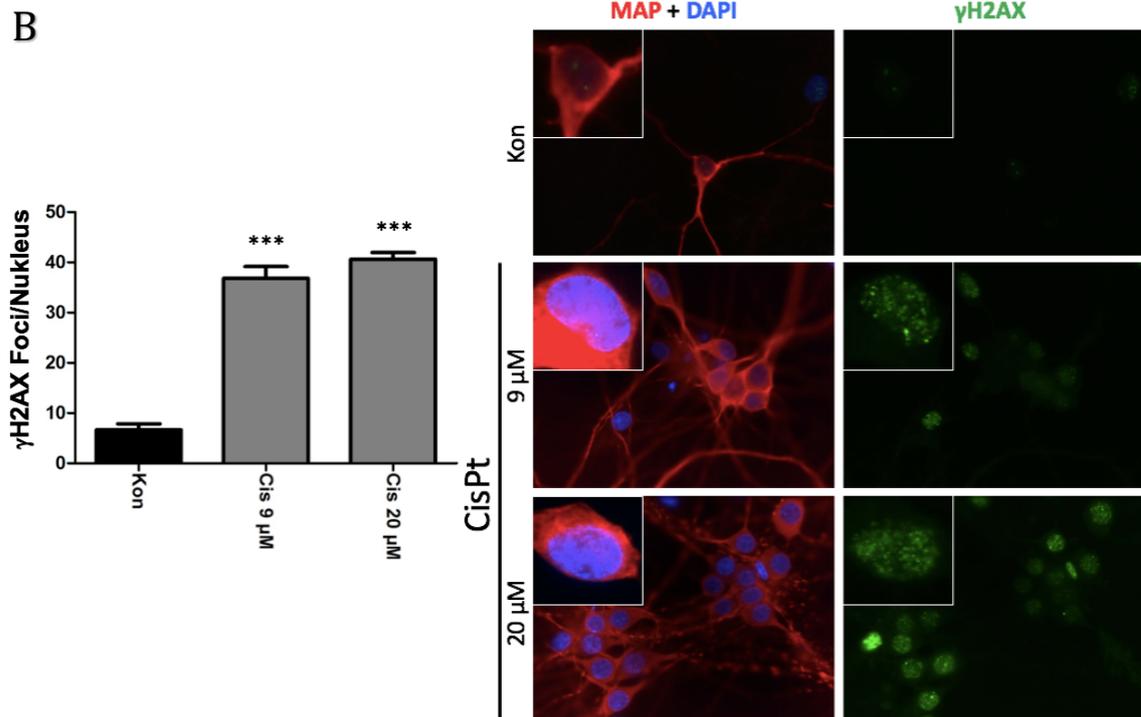
Die isolierten primären Rattenneurone zeigten nach 72-stündiger Dauerbehandlung mit AZD-7762-Konzentrationen von bis zu 5  $\mu$ M keine wesentliche toxische Reaktion (maximal 15 % Viabilitätsverlust). Hier war kein dosisabhängiger Viabilitätsverlust zu verzeichnen. Es kam stattdessen zu einem Sättigungseffekt ab 0,3  $\mu$ M AZD-7762. Eine Dosissteigerung führte zu keiner signifikanten Zunahme des Viabilitätsverlustes in den Neuronen. Die behandelten Gliazellen zeigten jedoch bei der höchsten Konzentration von AZD-7762 einen bis zu 45-prozentigen Viabilitätsverlust. Hier war eine Dosisabhängigkeit in höheren Behandlungsdosen sichtbar. Die Lebensfähigkeit der Zellen sank jedoch nicht unter 50 % der unbehandelten Kontrollzellen. Ein signifikanter Unterschied zwischen Neuronen und Gliazellen war bei Behandlung mit 1  $\mu$ M und 5  $\mu$ M AZD-7762 nachzuweisen. Es ist zu beachten, dass die Medulloblastomzellen mit bedeutend geringeren Konzentrationen AZD-7762 behandelt wurden. Vor allem die Medulloblastomzellen der Gruppe 3 mit c-Myc-Amplifikation zeigten eine deutliche Sensibilität gegenüber der Chk1-Inhibierung. Die  $IC_{80}$  der HD-MB03-

Medulloblastomzelllinie lag bei nur 0,05  $\mu\text{M}$  AZD-7762 (s. Tabelle 16). Diese Dosis bewirkte in den primären Neuronen und Gliazellen keinen zytotoxischen Effekt.

### 3.7.3 Cisplatin induziert Doppelstrangbrüche in primären Neuronen

Nachdem der Einfluss von Cisplatin auf die Viabilität der Rattenneurone untersucht wurde, sollte anschließend überprüft werden, ob Cisplatin Doppelstrangbrüche in der DNA der Rattenneurone induziert. Dafür wurden hippocampale Rattenneurone 2 Wochen nach ihrer Präparation für 6 h mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen der Platinverbindung (9  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  Cisplatin) behandelt. Anschließend erfolgte die immunzytochemische Aufarbeitung für die Hälfte der Neurone (6 h). Die andere Hälfte erhielt einen Mediumswechsel und wurde für 24 h ohne weitere Behandlung nachinkubiert (6 h + 24 h). Pro Experiment wurde eine unbehandelte Kontrollgruppe mitgeführt. Diese wurde nur einem Mediumswechsel unterzogen. Nachfolgend wurden die Zellen immunzytochemisch gefärbt und die  $\gamma\text{H2AX}$ -Foci pro Zellkern ausgezählt. Gleichzeitig wurde eine MAP2-Färbung der Zellen wie unter 3.7.1 beschrieben durchgeführt, um sicher zu stellen, dass nur Zellkerne aus Neuronen ausgezählt wurden.





**Abb. 18: Cisplatin induziert Doppelstrangbrüche in primären Rattenneuronen.**

Hippocampale Neurone wurden aus Rattenembryonen gewonnen und nach zweiwöchiger Kultivierung für 6 h mit 9 µM und 20 µM Cisplatin (Cis) behandelt. Ein Teil wurde anschließend direkt immunzytochemisch aufgearbeitet, ein andere Teil erst nach einer 24-stündigen Postinkubationsphase ohne eine weitere Behandlung. Die Zellen wurden sowohl mit einem Antikörper gegen γH2AX als auch gegen MAP2 angefärbt. So war es möglich die induzierten Foci nur in den Neuronen zu zählen. Abgebildet sind links die Mittelwerte + Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten (Neurone aus den Embryonen von 3 verschiedenen tragenden Ratten); daneben sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Bilder aus der Versuchsreihe dargestellt. A) Ergebnisse nach 6-stündiger Inkubationszeit mit Cisplatin. B) Ergebnisse nach 6 h + 24 h Behandlung mit Cisplatin. Pro Bedingungen wurden jeweils mehr als 50 Zellkerne ausgezählt. Statistik: \*: statistische Signifikanz von CisPt vs. Kon; \*\*\*:  $p \leq 0,001$  \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*:  $p \leq 0,05$ . #: statistische Signifikanz von CisPt 9 µM vs. 20 µM. ###:  $p \leq 0,001$ .

Da eine Kultur nie zu 100 % aus neuronalen Zellen bestand, konnten die Neurone auf diese Weise sicher identifiziert und die induzierten γH2AX-Foci korrekt analysiert werden. Die immunzytochemische Färbung bestätigte die Ergebnisse des Alamar Blue-Assays. Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Prozentsatzes an γH2AX-Foci in Neuronen nach der sechsstündigen Cisplatinbehandlung. Auch war nach der sechsstündigen Behandlung eine deutliche Dosisabhängigkeit zu beobachten. So entstanden nach der Behandlung mit 9 µM Cisplatin 24 γH2AX-Foci pro Zellkern, durch 20 µM Cisplatin sogar 35 Foci pro Zellkern. Nach weiteren 24 h ohne Behandlung erhöhte sich die Zahl der γH2AX-Foci sogar noch weiter auf bis zu 42 Foci pro Zellkern, wobei hier die Cisplatindosis eine geringere Rolle

spielte. Es bestand noch ein kleiner, jedoch nicht mehr signifikanter Unterschied zwischen den beiden Cisplatin-Dosierungen (37 Foci/Zellkern vs. 42 Foci/Zellkern). Zusammenfassend minderte Cisplatin dosisabhängig die Viabilität in den primären Neuronen und Gliazellen. Zudem induzierte eine sechsstündige Cisplatinbehandlung dosisabhängig Doppelstrangbrüche in primären Neuronen. Eine Chk1-Inhibierung hatte im Gegensatz dazu keinen gravierenden Einfluss auf die Lebensfähigkeit von Neuronen und Gliazellen. Insbesondere auf Medulloblastomzellen toxisch wirkende AZD-7762-Konzentrationen führten zu keinem signifikanten Viabilitätsverlust in den primären Neuronen und Gliazellen. Diese Ergebnisse im Zusammenhang mit den oben beschriebenen Daten der Medulloblastomzellen sprechen für ein sinnvolles therapeutisches Fenster von Chk-Inhibitoren in Kombination mit Cisplatin in der Medulloblastomtherapie bezogen auf die Neurotoxizität.

## 4 Diskussion

Cisplatin ist ein herkömmliches Zytostatikum in der Therapie des Medulloblastoms. Die Therapie mit Cisplatin ist zwar mit einer guten Wirksamkeit, allerdings auch mit vielen Therapie- bzw. Dosis-limitierenden Nebenwirkungen verbunden. Insbesondere Patienten mit Hochrisiko-Medulloblastomen benötigen eine aggressive Therapie, die trotz weitreichender unerwünschter Nebenwirkungen nur ein schlechtes Langzeitüberleben von weniger als 50 % aufweisen (4). Langfristig kann die Lebensqualität der Patienten unter Cisplatintherapie unter anderem durch die Neurotoxizität vermindert werden (87). Besonders in Kombination mit einer häufig notwendig werdenden Bestrahlung kommt es oft zu kognitiven Beeinträchtigungen und bei Kindern zu Wachstumsverzögerungen (123). Trotz vieler Bemühungen neue Therapieansätze zu finden, die die Cisplatin-induzierte Neurotoxizität verhindern oder minimieren könnten, gibt es bis heute keine ausreichend wirksame Strategie für das Management zur Prävention oder Therapie (101). So stellt das Absetzen der Cisplatintherapie häufig die einzige Option dar um die vielen, bei einer weiteren Gabe teilweise tödlich endenden Nebenwirkungen abzuwenden (91). Die Reduktion der Cisplatin-Dosis bzw. der Therapieabbruch verhindern, dass eine ausreichend hohe Dosierung des Zytostatikums im Tumor erreicht wird, um alle Tumorzellen sicher abzutöten und Resistenzbildungen vorzubeugen. So sinkt die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten weiter.

### 4.1 Cisplatin schädigt dosisabhängig Medulloblastomzellen mit und ohne c-Myc-Amplifikation

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) klassifizierte 2016 vier genetische Untergruppen des Medulloblastoms mit unterschiedlichen prognostischen Faktoren. Patienten mit einer Gruppe 3 Medulloblastom mit c-Myc-Amplifikation werden der Gruppe mit dem höchsten Risiko zugeordnet (8, 11, 27, 31), deswegen ist das therapeutische Targeting für diese Patientengruppe besonders interessant und verbesserungsbedürftig. Als *in vitro*-Modell wurden daher HD-MB03-Zellen, die Medulloblastomzellen der Gruppe 3 mit c-Myc-Amplifikation entsprechen, ausgewählt.

Um eine mögliche Abweichung des Therapieerfolgs durch die c-Myc-Amplifizierung erkennen zu können, wurden zudem UW228-2-Zellen, die zu den Medulloblastomzellen mit SHH-Aktivierung zählen und keine c-Myc-Überexpression zeigen, verwendet.

#### **4.1.1 Eine c-Myc-Amplifikation sensibilisierte Medulloblastomzellen nicht für eine Behandlung mit Cisplatin**

Die Untersuchungen zur Viabilität nach Cisplatinbehandlung ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den verwendeten Zelllinien. In diesen Untersuchungen sensibilisierte eine c-Myc-Amplifikation Medulloblastomzellen nicht für eine Behandlung mit Cisplatin. In anderen Studien konnte jedoch durch eine Veränderung des c-Myc-Spiegels ein Unterschied im Ansprechen auf eine Zytostatika-Behandlung beobachtet werden. So beobachteten Biroccio *et al.* (124), dass eine Herunterregulierung der c-Myc-Expression humane Melanomzellen gegenüber einer Cisplatingabe, jedoch nicht gegenüber Doxorubicin sensibilisierte (124, 125). Doxorubicin ist ein gängiges Zytostatikum und gehört in der Gruppe der Topoisomerase-Hemmstoffe zur Untergruppe der Anthracycline (9). Die untersuchten Melanomzellen wurden nur 2 h lang mit Cisplatin behandelt und nach 10 bis 12 Tagen wurde ihr Wachstum analysiert, wohingegen die Zellviabilität der Medulloblastomzellen in dieser Arbeit erst nach 24- bis 72-stündiger Dauerbehandlung gemessen wurde. In anderen Arbeiten wiederum wurde eine erhöhte Empfindlichkeit von c-Myc-überexprimierenden Tumorzellen gegenüber einer Zytostatikabehandlung beobachtet (126-128). Von Bueren *et al.* (126) untersuchten die Reaktion von Medulloblastomzellen mit unterschiedlicher c-Myc-Expression auf die Behandlung mit Doxorubicin, Vincristin, Carboplatin, Cisplatin und dem Topoisomerase-II-Hemmer Etoposid. Dazu wurden ebenfalls UW228-Zellen sowie zusätzlich DAOY-Medulloblastomzellen untersucht. C-Myc überexprimierende Medulloblastomzellen zeigten in der Arbeit von von Bueren *et al.* (126) eine signifikant höhere Empfindlichkeit für die Behandlung mit Etoposid und Cisplatin, die DAOY M2-Medulloblastomzellen auch für die Behandlung mit Carboplatin, im Vergleich zu Wildtypzellen (126). Auf eine Behandlung mit Doxorubicin und Vincristin schienen die c-Myc überexprimierenden Medulloblastomzellen zwar empfindlicher zu reagieren, die

Ergebnisse waren hier jedoch nicht signifikant (126). Die Behandlungsdauer wurde wie in dieser Arbeit auf 72 h Dauerbehandlung festgelegt, sodass die unterschiedlichen Ergebnisse nicht auf unterschiedliche Behandlungszeiten zurückführbar sind. Da Behandlungsdosen zwischen 0,1  $\mu\text{M}$  und 33  $\mu\text{M}$  Cisplatin untersucht wurden, sind die unterschiedlichen Beobachtungen ebenfalls nicht auf die verwendete Cisplatinkonzentration zurückführbar. In einer durch von Bueren *et al.* (126) anschließend durchgeführten klinischen Studie konnte die höhere Empfindlichkeit von c-Myc-überexprimierenden Medulloblastomzellen jedoch nicht bestätigt werden. So wurde hier kein signifikanter Unterschied im Ansprechen auf eine postoperative Chemotherapie zwischen Medulloblastomzellen mit hoher und niedriger c-Myc-Expression detektiert (126). Dies wiederum unterstützt die in dieser Arbeit festgestellte fehlende Sensibilisierung von Medulloblastomzellen für eine Cisplatinbehandlung durch eine veränderte c-Myc-Expression. Insgesamt ist die Datenlage diesbezüglich jedoch inhomogen. Ob die beobachteten unterschiedlichen Versuchsergebnisse auf andere zelltypspezifische noch nicht identifizierte Einflussfaktoren zurückzuführen sind, könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Eine generell erhöhte Sensibilität von c-Myc-überexprimierenden Tumorzellen gegenüber Cisplatin konnte hier nicht gezeigt werden.

#### **4.1.2 Cisplatin induzierte einen S-Phase-Arrest in Medulloblastomzellen**

Im Alamar Blue-Assay wird die mitochondriale Aktivität einer Zelle gemessen, die sowohl in apoptotischen Zellen als auch in nicht mehr teilungsfähigen aber noch stoffwechselaktiven Zellen vermindert ist (106, 129). Daher kann eine Abnahme der Viabilität im Alamar Blue-Assay sowohl auf den Zelltod als auch auf einen Zellzyklusarrest zurückzuführen sein (106, 129). Um die Wirkung von Cisplatin auf die Medulloblastomzellen genauer zu untersuchen, wurden Analysen des Zellzyklus durchgeführt. Hierzu wurde zunächst der mitotische Index analysiert. Es befanden sich signifikant weniger Zellen nach Cisplatinbehandlung in der Mitose als in der unbehandelten Kontrollpopulation. In der anschließenden durchflusszytometrischen Untersuchung zeigte sich nach einer Behandlungsdauer von 72 h Cisplatin ein Anstieg von in der S-Phase befindlichen Medulloblastomzellen mit und ohne c-Myc-Amplifikation (Abbildung 5). Da in der Durchflusszytometrie die Zellen nach ihrem

DNA-Gehalt aufgetrennt wurden und somit der prozentuale Anteil an Zellen in der S-Phase (einfach bis doppelter DNA-Gehalt) nicht sicher identifiziert werden konnte, wurde ebenfalls der Einbau von EdU in die DNA von Medulloblastomzellen nach Cisplatinbehandlung analysiert. Hier wurde der in der Durchflusszytometrie vermutete S-Phase Anstieg bestätigt. In den Medulloblastomzellen konnte nach Cisplatingabe ein signifikanter Anstieg der S-Phaseaktivität beobachtet werden. Zusammenfassend führte eine Cisplatinbehandlung zu einem S-Phase-Arrest und damit zu einem Zellzyklusstillstand in Medulloblastomzellen. Eine Akkumulation von Zellen in der S-Phase des Zellzyklus nach Behandlung mit Cisplatin wurde bereits in HeLa-Zellen von Wagner *et al.* (130), in DAOY-Medulloblastomzellen von von Bueren *et al.* (126), sowie nach Behandlung mit Cisplatin und Carboplatin in XP3ORO-Zellen von Cruet-Hennequart *et al.* (131) beobachtet. HeLa-Zervixkarzinom-Zellen sind genau wie die in dieser Arbeit verwendeten Medulloblastomzellen Tumorzellen, im Gegensatz zu XP3ORO-Zellen, bei denen es sich um Fibroblasten (Bindegewebszellen) handelt. HeLa-Zellen wurden in der Arbeit von Wagner *et al.* (130) für 24 h mit 4  $\mu\text{M}$  Cisplatin behandelt und anschließend die Zellzyklusverteilung durchflusszytometrisch bestimmt (130). Die gleiche Konzentration sowie die gleiche Behandlungszeit von 24 h wurden ebenfalls in den durchflusszytometrischen Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit verwendet. Nach 24 h Dauerbehandlung mit 4  $\mu\text{M}$  Cisplatin zeigten die HeLa-Zellen bereits eine S-Phase-Akkumulation. Im Gegensatz dazu wurde in den Medulloblastomzellen nach 24 h keine signifikante S-Phase-Akkumulation beobachtet, jedoch nach 72-stündiger Dauerbehandlung. Bei den Medulloblastomzellen dieser Arbeit wurde außerdem fluoreszenzmikroskopisch der Einbau von EdU in die DNA analysiert, was ebenfalls die S-Phase-Aktivität der Zellen widerspiegelt. Hierzu wurde mit 4  $\mu\text{M}$  und 9  $\mu\text{M}$  Cisplatin für 6 h und 6 h + 24 h Postinkubationszeit behandelt. Dabei zeigten sich bei Behandlung mit 9  $\mu\text{M}$  Cisplatin und nach einem Zeitintervall von 6 h Behandlung und 24 h Postinkubationszeit signifikant mehr Medulloblastomzellen in der S-Phase als in der entsprechenden Kontrollpopulation. Dies deutet darauf hin, dass auch die Medulloblastomzellen genauso wie die HeLa-Zellen bereits nach einer 6- bis 24-stündigen Cisplatinexposition in einen S-Phase-Arrest eintreten. Um einen S-Phase-Arrest nach 6 h + 24 h Behandlung zu induzieren, benötigten die Medulloblastomzellen eine mehr als doppelt so hohe Cisplatinosis im Gegensatz zu den HeLa-Zellen. In einer

weiteren Studie von von Bueren *et al.* (126) konnte ebenfalls ein S-Phase-Arrest in DAOY-Medulloblastomzellen 24 h nach einer Behandlung mit Cisplatin beobachtet werden (126). 48 h nach der Cisplatin-Behandlung wurde der Zellzyklus jedoch nicht mehr in der S-Phase angehalten. Nach Behandlung mit Etoposid oder Doxorubicin konnten Sie den S-Phase-Arrest nicht beobachten (126). Die Veränderungen in XP3OR0-Fibroblasten wurden von Cruet-Hennequart *et al.* (131) nach Behandlung mit nur 1,7  $\mu\text{M}$  Cisplatin zu vier unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten (12 h, 24 h, 36 h, 48 h) untersucht. Hierbei zeigte sich nach 12 h sowie 24 h Cisplatinexposition eine Akkumulation von Zellen in der S-Phase, nach 36 h und 48 h Dauerbehandlung war diese jedoch nicht mehr zu beobachten. Die Fibroblasten wurden zudem mit Carboplatin behandelt. Sowohl nach 12 h und 24 h als auch nach einer 36-stündigen Behandlung mit Carboplatin konnte der Eintritt in einen S-Phase-Arrest beobachtet werden, jedoch ebenfalls nicht nach 48 h Behandlung (131). Die in dieser Arbeit untersuchten Medulloblastomzellen zeigten hingegen auch nach einer längeren Behandlungsdauer von 72 h einen signifikanten Anstieg der in der S-Phase befindlichen Zellen. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass die Medulloblastomzellen im Gegensatz zu den Fibroblasten mit wesentlich höheren Cisplatinkonzentrationen behandelt wurden (4  $\mu\text{M}$  und 9  $\mu\text{M}$  vs. 1,7  $\mu\text{M}$ ). Durch die höhere Konzentration von Cisplatin könnten deutlich mehr DNA-Schäden induziert worden sein, wodurch der Zellzyklusarrest verlängert wurde bis alle entstandenen DNA-Schäden repariert wurden. Zudem gibt es zwei mögliche Erklärungsansätze dafür, dass sich die Fibroblasten in der Arbeit von Cruet-Hennequart *et al.* (131) nach 36 h und 48 h Behandlung mit Cisplatin nicht mehr in einem S-Phase-Arrest befinden. Ursächlich könnte zum einen ein zu großer DNA-Schaden sein, wodurch die Zellen in die Apoptose getrieben werden. Zum anderen könnte die Aufhebung des S-Phase-Arrestes darauf zurückzuführen sein, dass nach Reparatur aller DNA-Schäden die Zelle wieder in den Zellzyklus eintritt. Zur Verifizierung dieser Überlegungen wären weitere Untersuchungen der Fibroblasten zur Zellzyklusverteilung (z. B. durch Bestimmung der Mitoseaktivität mittels pH3-Assay, Bestimmung der G1- und M-Phase in der Durchflusszytometrie) sowie zur Zytotoxizität (z. B. Neutralrot-Assay) und zum Zelltod (z. B. LDH-Assay, Bestimmung der Sub-G1-Population in der Durchflusszytometrie) nach Cisplatinbehandlung nötig.

Zusammenfassend induziert Cisplatin in Tumorzellen einen zumindest vorübergehenden S-Phasen-Arrest. Dieser Effekt war in der hier vorliegenden Arbeit unabhängig vom c-Myc-Expressionsstatus der Zellen. Die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse im Zusammenhang mit der Viabilitätsmessung zeigte einen Viabilitätsverlust sowie einen S-Phase-Arrest in Medulloblastomzellen nach Cisplatingabe.

#### **4.1.3 Cisplatin induziert Apoptose in Medulloblastomzellen**

Wie oben bereits erwähnt kann die Abnahme der Viabilität im Alamar Blue-Assay sowohl auf den nachgewiesenen Zellzyklusarrest der Medulloblastomzellen sowie auf den induzierten Zelltod zurückzuführen sein (106, 129). Daher wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse die SubG1-Population, welche den apoptotischen Zellanteil repräsentiert, nach Behandlung mit Cisplatin genauer untersucht. Die HD-MB03-Zellen zeigten bereits nach 24 h Behandlung mit Cisplatin einen signifikanten Anstieg in der Anzahl von in der SubG1-Phase befindlichen Zellen, die UW228-2-Zellen erst nach 72-stündiger Behandlung. Zudem zeigte die HD-MB03-Zelllinie einen deutlich höheren basalen apoptotischen Zellanteil in der Kontrollgruppe im Vergleich zur UW228-2-Zelllinie. Dass c-Myc-überexprimierende Zellen eine erhöhte basale Apoptose-Rate aufweisen, wurde bereits von von Bueren *et al.* (126) in DAOY M2-Medulloblastomzellen sowie von Albiñ *et al.* (126, 127) in Fibroblasten beobachtet. Zudem wiesen c-Myc-überexprimierende DAOY M2-Medulloblastomzellen eine hohe Anfälligkeit für den Cisplatin-, sowie Etoposid- und Doxorubicin-induzierten Zelltod auf (126). 24 h nach Cisplatinbehandlung konnte in c-Myc-überexprimierenden DAOY M2-Zellen bereits eine signifikante Ansammlung an apoptotischen Zellen beobachtet werden im Gegensatz zu Wildtyp und Leervektor-transfizierten Zellen. 48 h und 72 h nach Cisplatinbehandlung stieg die Anzahl an apoptotischen DAOY-M2 Zellen zeitabhängig weiter an und auch die Wildtyp und Leervektor-transfizierten Zellen zeigten einen Anstieg an apoptotischen Zellen, jedoch in einem signifikant geringeren Ausmaß (126). Diese Beobachtungen wurden ebenfalls nach Behandlung mit Etoposid, Doxorubicin sowie nach Bestrahlung der Zellen getätigt (126). Dies deckt sich mit den Untersuchungsergebnissen in dieser Arbeit. Auch hier führte eine Cisplatinbehandlung nur in der c-Myc-überexprimierenden Zelllinie bereits nach 24 h zu einem signifikanten

Anstieg von apoptotischen Zellen. Bei den nicht c-Myc-überexprimierenden Zellen befanden sich nach Cisplatinbehandlung übereinstimmend erst nach 72 h signifikant mehr Zellen in der SubG1-Population im Vergleich zur unbehandelten Kontrollpopulation.

Albiñ *et al.* (126, 127) analysierten den Einfluss von c-Myc auf den durch Etoposid-, Doxorubicin- und Cisplatin-induzierten Zelltod in Fibroblasten. Durch eine 36-stündige Behandlung mit Cisplatin konnte eine konzentrationsabhängige Zelltodinduktion beobachtet werden. Diese fiel im Gegensatz zu den DAOY-Medulloblastomzellen in c-Myc-exprimierenden sowie in nicht c-Myc-exprimierenden Rat1-Zellen (Fibroblasten) ähnlich hoch aus. Eine 24-stündige Behandlung mit Doxorubicin und Etoposid konnte den Zelltod in allen Zellen konzentrationsabhängig auslösen, hier kam es zudem zu einer verstärkten Zelltodinduktion in c-Myc-exprimierenden Zellen (127). Adachi *et al.* (128) zeigten ebenfalls, dass Cisplatin in Rattenfibroblasten c-Myc-unabhängig Apoptose auslöste. In nicht c-Myc-exprimierenden Zellen geschah dies jedoch erst nach einer zeitlichen Verzögerung (128). Diese Erkenntnisse unterstützen die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen. In den nicht c-Myc-überexprimierenden Zellen war ebenfalls erst zeitverzögert nach 72-stündiger Cisplatinbehandlung ein signifikanter Anstieg an Zellen in der SubG1-Fraktion zu verzeichnen im Gegensatz zu den c-Myc-überexprimierenden Zellen. Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dafür, dass eine Überexpression von c-Myc die basale Apoptose-Rate einer Zellkolonie erhöht. Cisplatin induziert c-Myc-unabhängig Apoptose, die Apoptoseinduktion scheint in nicht c-Myc-überexprimierenden Zellen jedoch zeitverzögert aufzutreten.

#### **4.1.4 Cisplatin aktiviert die DNA-Schadensantwort in Medulloblastomzellen**

Cisplatin führt zur Ausbildung von Intrastrangverknüpfungen in der DNA, die das Auftreten von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen begünstigen und sowohl Replikation als auch Transkription blockieren (77, 78). Die induzierten Doppelstrangbrüche wurden immunzytochemisch durch kolokalisierte  $\gamma$ H2AX-/53BP1-Foci nachgewiesen. Hier zeigte sich eine dosisabhängige Induktion von Doppelstrangbrüchen nach einer sechsstündigen Behandlung mit Cisplatin sowie ein weiterer Anstieg nach einer anschließenden Postinkubationsphase von 24 h (Abbildung

9). Eine Cisplatin-induzierte Phosphorylierung von H2AX konnte auch von Sokol *et al.* (132) in humanen Fibroblasten 6 h nach Cisplatinexposition sowie Carboplatinexposition beobachtet werden. Die Induktion der H2AX-Phosphorylierung erfolgte früher und stärker als Reaktion auf Cisplatin im Vergleich zu Carboplatin. Zudem wurde ebenfalls eine weitere Zunahme an  $\gamma$ H2AX nach einer 24-stündigen Postinkubationsphase sowohl nach Cisplatin- als auch nach Carboplatinbehandlung gezeigt (132). Die Beobachtungen von Sokol *et al.* (132) bezogen auf Cisplatin stehen im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Die Zunahme der Cisplatin-induzierten Doppelstrangbrüche ( $\gamma$ H2AX-Foci) nach einer 24-stündigen Postinkubationsphase könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Zellen die S-Phase durchlaufen müssen, um eine H2AX-Phosphorylierung zu stimulieren. Die Mehrheit der Zellen in Tumoren absolvieren aber nicht synchron den Zellzyklus. Somit muss jeder Zelle ausreichend Zeit gegeben werden, nach einer Cisplatinbehandlung in die S-Phase einzutreten oder ausreichend Zeit, damit Tumorzellumsatz und Zellverlust auftreten können (43, 78).

Die durch Zytostatika erzeugten DNA-Schäden führen zur Aktivierung der DNA-Schadensantwort durch den ATR-Chk1-Signalweg oder zum Zelltod (s. Abbildung 2). Cisplatin schädigt Tumorzellen unter anderem durch die Erzeugung von DNA-Läsionen, die während der S-Phase am stärksten zytotoxisch wirken (133). Durch die induzierten Schäden treten die Medulloblastomzellen in einen S-Phase-Arrest ein oder gehen zu Grunde. Der Zellzyklusarrest wird unter anderem über den Chk1-Signalweg vermittelt, was am effizientesten in der S- und G<sub>2</sub>-Phase zu einem Stillstand des Zellzyklus führt (44). Wagner *et al.* (130) zeigten, dass durch eine Behandlung mit Cisplatin Chk1 in Zellen phosphoryliert und somit aktiviert wurde. Anschließend gab Chk1 ein Signal weiter, das den Abbau von Cdc25A (s. Abbildung 2) verursachte und das Fortschreiten der S-Phase verlangsamte (130). Dieser Signalweg scheint für durch Cisplatin geschädigte Tumorzellen zum Überleben wichtig zu sein. Auch die in dieser Arbeit untersuchten Medulloblastomzellen treten nach Cisplatinbehandlung in einen S-Phase-Arrest ein um induzierte DNA-Schäden von überlebenden Tumorzellen zu reparieren. Wagner *et al.* zeigten, dass dieser Arrest durch die Aktivierung von Chk1 erzeugt wird (130). Um zu überprüfen, ob Cisplatin auch in den Medulloblastomzellen in dieser Arbeit zu einer Aktivierung der DNA-Schadensantwort und insbesondere zu einer

Chk1-Phosphorylierung führt, wurde dies nachfolgend durch Western Blot-Analysen untersucht. In den durchgeführten Western Blot-Analysen zeigte sich in der hier vorliegenden Arbeit eine deutliche Aktivierung der DNA-Schadensantwort in beiden Medulloblastomzelllinien, was an der Phosphorylierung der Proteine ATM, P53, Chk1, Kap1, H2AX nach 6 h und nach 6 h + 24 h Postinkubationszeit auch von Chk2 und RPA32 zu sehen war. Die Aktivierung dieser Proteine sowie die verzögerte Phosphorylierung des ssDNA bindenden Proteins RPA nach Cisplatinbehandlung stimmt mit den Beobachtungen aus anderen Arbeiten überein (130, 131). Auch Cruet-Hennequart *et al.* (131) beschrieben eine Chk1-Phosphorylierung und einen anschließenden S-Phase-Arrest von XP30R0-Fibroblasten sowie eine verspätete RPA-Phosphorylierung nach 12-, 18- und 24-stündiger Behandlung mit Cisplatin (131). In den Fibroblasten trat die Phosphorylierung von RPA vor allem in der S-Phase des Zellzyklus nach Cisplatinbehandlung auf (131). Auch Wagner *et al.* (130) beobachteten in HeLa-Zervixkarzinomzellen, dass eine Behandlung mit Cisplatin eine Chk1-Phosphorylierung induzierte. Diese konnte jedoch nicht nach Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin (einem Pyrimidin-Antagonisten) nachgewiesen werden (130). Sokol *et al.* (132) beobachteten ebenfalls die Phosphorylierung der Checkpointkinase 1 und von RPA nach einer Behandlung mit Cisplatin und Carboplatin in humanen Fibroblasten. Hier war in den Fibroblasten die Chk1-Phosphorylierung bereits 6 h nach Cisplatin- und Carboplatin-Exposition nachweisbar und nahm 24 h nach der Behandlung weiter zu (132). Eine Phosphorylierung von RPA wurde erst 12 h nach der Behandlung mit Cisplatin und 24 h nach der Behandlung mit Carboplatin nachgewiesen und nahm 24 h bzw. 36 h nach Exposition ebenfalls weiter zu (132). In Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten führte eine Cisplatingabe zu einer frühen Chk1- sowie H2AX-Phosphorylierung. Dies wurde übereinstimmend nach unterschiedlichen Expositionszeiträumen und durch verschiedene Cisplatinkonzentrationen beobachtet. Die Phosphorylierung von Chk1- sowie H2AX nahm des Weiteren einheitlich nach einer 24-stündigen Postinkubationsphase weiter zu und Cisplatin führte unter allen Bedingungen zu einer verzögerten RPA-Phosphorylierung.

## **4.2 Eine c-Myc-Überexpression sensibilisiert Medulloblastomzellen für eine Checkpointkinase-Inhibition**

C-Myc induziert die Transkription von proliferationsfördernden Genen und reguliert wichtige zelluläre Prozesse (57). Die Überexpression von c-Myc verursacht zudem unabhängig von seiner Rolle als Transkriptionsfaktor Replikationsstress (s. 1.2.1.2). C-Myc führt so einerseits zu starkem replikativem Stress, andererseits kann c-Myc selbst über die Aktivierung des ATR-Chk1-Signalwegs das Ausmaß von replikativem Stress begrenzen und so schädliche genetische Instabilitäten vermeiden (s. 1.2.1.2) (12, 42, 43, 56, 62, 63). Durch die Aktivierung von ATR und Chk1 kann das Überleben von potenziellen Krebszellen geschützt werden. Die vollständige Aktivierung des ATR-Chk1-Signalweges ist somit für die Überlebensfähigkeit eines Tumors wesentlich und bietet wichtige Möglichkeiten für therapeutische Interventionen (60). So wurde beobachtet, dass Zellen, die eine hohe c-Myc-Expression aufweisen, besonders empfindlich auf RSR-Inhibitoren (Replication-Stress-Response) wie einen Chk1-Inhibitor oder ATR-Inhibitor reagieren (12, 42, 134). Auch in den Viabilitätsuntersuchungen in dieser Arbeit konnte bei der Behandlung mit dem Chk1-Inhibitor AZD-7762 ein signifikanter Unterschied in den Dosis-Wirkungskurven der beiden Zelllinien festgestellt werden (s. Abbildung 11). Die c-Myc-überexprimierenden HD-MB03-Zellen zeigten eine signifikant höhere Empfindlichkeit gegenüber einer Chk1-Inhibition als die UW228-2-Zellen. Dass die HD-MB03-Medulloblastomzellen in dieser Arbeit nicht generell empfindlicher auf eine Therapie reagieren als UW228-2-Zellen, zeigten die Ergebnisse der Viabilitätsmessung mit dem Zytostatikum Cisplatin (s. Tabelle 15). Die beobachtete Überempfindlichkeit von HD-MB03-Zellen gegenüber AZD-7762 könnte allerdings auch auf andere, unbekannte Effekte des Inhibitors zurückzuführen sein. In fortführenden Versuchen unserer Arbeitsgruppe wurden UW228-2- und HD-MB03-Zellen auch mit einem weiteren Chk1-Inhibitor LY-2603618 (Prexasertib) behandelt (43). Auch hier zeigte sich eine deutlich höhere Empfindlichkeit der HD-MB03-Zellen gegenüber LY-2603618 im Vergleich zu den UW228-2-Zellen (43). Dies bestärkt die Annahme, dass Medulloblastome der Gruppe 3 tatsächlich eine erhöhte Sensitivität gegenüber einer Chk1-Inhibition aufweisen. Zudem wurden von unserer Arbeitsgruppe weitere Medulloblastomzellen der Gruppe 3 (HD-MB03-, D283- und Med8A-Zellen) sowie Medulloblastomzellen mit SHH-Aktivierung (UW228-2-, ONS76- und DAOY-Zellen)

untersucht. Die Gruppe 3 Medulloblastomzellen zeigten hier wieder eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber einer Chk1-Inhibition und bestätigten die beschriebenen Ergebnisse (43). Da c-Myc-amplifizierte Medulloblastomzellen deutlich sensibler auf eine Chk1-Inhibition zu reagieren scheinen als solche ohne c-Myc-Expression, lässt sich vermuten, dass eine funktionierende Chk1-Signalgebung essentiell für die Aufrechterhaltung der Lebensfähigkeit von c-Myc-amplifizierten Gruppe 3 Medulloblastomzellen ist. Diese Vermutung wird auch dadurch gestützt, dass die HD-MB03-Zellen deutlich empfindlicher auf eine ATM/ATR-Inhibition reagierten als die UW228-2-Zellen (s. Anhang). ATR ist in ihrem gemeinsamen Signalweg Chk1 vorgeschaltet (s. Abb. 2). Wird ATR gehemmt, führt dies zu einer verminderten Chk1-Aktivierung. Der Einfluss einer c-Myc-Expression auf die Wirkung von ATR-Inhibitoren wurde bereits in anderen Arbeiten untersucht. Murga *et al.* (42) beobachteten, dass eine ATR-Hemmung Zellen *in vitro* für Myc-induzierte Apoptose sensibilisierte und niedrige ATR-Spiegel die Entwicklung von Myc-induzierten B-Zell-Lymphomen *in vivo* verhindern konnten (42). Cottini *et al.* (61) zeigten, dass ATR für das Überleben von Myc-überexprimierenden multiplen Myelomzellen erforderlich ist. U266-Multiple-Myelomzellen wurden durch das Vorhandensein einer Myc-Expression empfindlicher gegenüber dem ATR-Inhibitor VE-821 und die Stummschaltung von Myc in MM1S- und H929-Multiplen-Myelomzellen verminderte die Wirkung einer VE-821-Behandlung (61). Somit wird die Hypothese, dass c-Myc-überexprimierende Zellen zum Überleben auf den ATR-Chk1-Signalweg angewiesen sind und deutlich empfindlicher auf eine ATR- oder Chk1-Hemmung reagieren als nicht c-Myc-überexprimierende-Zellen, weiter unterstützt.

Die Inhibition des für Tumorzellen überlebenswichtigen ATR-Chk1-Signalweges zeigte zudem bereits in anderen *in vitro*-Modellen sowie in *in vivo*-Mausmodellen eine starke Wirksamkeit gegenüber c-Myc-überexprimierenden Tumoren (12, 42, 58, 135). Subletale Dosen eines Chk1-Inhibitors führten nur zu leichtem replikativen Stress in Wildtyp-Zellen, lösten aber eine starke Letalität in c-Myc-überexprimierenden Zellen aus (12, 42, 58, 135). Høglund *et al.* (58) beobachteten, dass eine Chk1-Hemmung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einem erhöhten Zelltod in c-Myc-überexprimierenden B-Zell-Lymphomzellen führte. Nach 48-stündiger Behandlung der

Lymphomzellen mit dem selektiven Chk1-Inhibitor Chekin wurde eine P53-unabhängige Induktion von Apoptose sowie die Induktion von DNA-Schäden *in vitro* beobachtet (58). In der gleichen Arbeit konnte in einem *in vivo*-Mausmodell in Tieren mit c-Myc-überexprimierenden Lymphomen ein signifikant langsamerer Krankheitsverlauf durch eine Chk1-Inhibition nachgewiesen werden im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (58). Auch Murga *et al.* (42) zeigten in einem *in vivo*-Mausmodell, dass ein Chk1-Inhibitor eine Einzelwirkstoffaktivität in Myc-exprimierenden Lymphomzellen aufweist (42). Die Behandlung mit einem Chk1-Inhibitor führte zu einem starken Anstieg der Apoptose in den Lymphomzellen und nach 9-tägiger Therapie mit dem Chk1-Inhibitor UCN-01 zeigte sich eine deutliche Regression der Myc-induzierten Lymphome in den Mäusen. Die Empfindlichkeit war bei den Lymphomen mit den höchsten Myc-Spiegeln am stärksten ausgeprägt. In Zellen einer gesunden Milz wurde durch die gleiche Konzentration des Chk1-Inhibitors nur wenig Apoptose ausgelöst (42). Zusammenfassend zeigten die c-Myc-überexprimierenden Zellen eine erhöhte Sensibilität gegenüber einer Chk1-Inhibition. Diese Daten sprechen für eine effektive Einzelwirkstoffaktivität von Chk1-Inhibitoren in c-Myc-exprimierenden Tumorzellen und bieten einen Ansatzpunkt für weitere Forschung.

Nicht nur eine Überexpression von c-Myc sondern auch die Überexpression der Protoonkogene N-Myc und Ras wurde mit einer erhöhten Sensibilität von Zellen gegenüber einer Chk1- und ATR-Hemmung in Verbindung gebracht (135-138). Ras (*Rat sarcoma*) stellt wie c-Myc und N-Myc ein Proto-Onkogen dar und kodiert in Säugetierzellen für drei Ras-Proteine (H-, K- und N-Ras). Diese gehören zur Familie der kleinen G-Proteine und regulieren das Zellwachstum durch Aktivierung weiterer Proteinkinasen (z. B. Raf (*accelerated fibrosarcoma*), MAP (*mitogen-activated protein*) und ERK (*extracellular signal-regulated kinases*)). Das Ras-Protein wechselt zwischen einer aktiven GTP- und einer inaktiven GDP-Form (133). Mutationen können zum Verlust der Fähigkeit führen GTP zu hydrolysieren, sodass Ras in seiner aktiven Form festgehalten und das Zellwachstum durchgehend angeregt wird, was zu onkogenem Stress und zur Tumorentstehung führt (9, 139). Cole *et al.* (135) behandelten RPE1-Zellen (retinale Pigmentepithelzellen) mit und ohne N-Myc-Expression mit einem

Chk1-Inhibitor und konnten eine signifikante Abnahme des Zellwachstums in den N-Myc-exprimierenden RPE1-Zellen im Vergleich zu RPE1-Zellen, die keine N-Myc-Expression aufwiesen, beobachten (135). Walton *et al.* (136) zeigten, dass in N-Myc überexprimierenden Neuroblastomzellen ein Chk1-Inhibitor als Einzelwirkstoff in einem Mausmodell ebenfalls eine ausgeprägte antitumorogene Wirkung hatte. Nach 7-tägiger Dauerbehandlung konnte ein signifikanter Rückgang der Tumormasse gemessen werden (136). Gilad *et al.* (137) beobachteten, dass die Transformation des Ras-Proteins zu einer Sensibilisierung von Zellen gegenüber einer ATR-Chk1-Hemmung führte. Eine K-Ras- oder H-Ras-Transformation wirkte in der Arbeit von Gilad *et al.* (137) in Kombination mit einer Hemmung des ATR-Chk1-Signalweges synthetisch letal in embryonalen Fibroblastenzellen der Maus (MEF-Zellen). Die Unterdrückung des ATR-Signalweges führte in den Fibroblastenzellen *in vitro* zu einer signifikant stärkeren Abnahme der Zellzahl sowie zu einer signifikant höheren Zelltodrate in Ras-transformierten Zellen im Vergleich zu nicht transformierten Kontrollzellen (137). In einer weiteren Arbeit von Schoppy *et al.* (138) wurde der Effekt einer ATR-Inhibition auf onkogen-exprimierende Fibroblasten untersucht. Hierzu wurden H-Ras und c-Myc-exprimierende Zellen sowie Kontrollzellen mit dem ATR-45-Inhibitor behandelt. Niedrige Konzentrationen des ATR-Inhibitors (1  $\mu$ M – 4  $\mu$ M) unterdrückten die Proliferation von H-rasG12V- und c-Myc-überexprimierenden Zellen wirksam und führten zu einem signifikant erhöhten Zelltod im Gegensatz zu Kontrollzellen (138). Auch der Einfluss einer P53-Mutation in Kombination mit einer ATR-Inhibition wurde in der Arbeit von Schoppy *et al.* (138) untersucht. Interessanterweise erhöhte eine ATR-Unterdrückung in Kombination mit einem P53-Mangel zwar die H2AX-Phosphorylierung, jedoch nicht den Anstieg von Chromatidbrüchen (138). Eine Transformation des Protoonkogens Ras sowie eine Überexpression der Protoonkogene N-Myc- und c-Myc, nicht jedoch ein Mangel des Tumorsupressorproteins P53 scheinen Zellen für eine ATR-Inhibierung zu sensibilisieren. Murga *et al.* (42) verglichen zudem die Wirksamkeit von Chk1-Inhibitoren in Pankreaskrebszellen die durch Myc- oder Ras-Onkogene ausgelöst wurden (42). Die Behandlung mit einem Chk1-Inhibitor erhöhte in Myc-induzierten Zellen die  $\gamma$ H2AX- und Apoptose-Spiegel deutlich. Die Chk1-Inhibition hatte jedoch keinen nachweisbaren Einfluss auf durch Ras induzierte Tumorzellen (42). Zusammenfassend zeigen diese Arbeiten in Übereinstimmung mit der hier

vorliegenden Arbeit, dass eine Myc-Expression verschiedene Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* sowohl für die Chk1- als auch für die ATR-Hemmung sensibilisieren kann. Im Gegensatz dazu stellt sich die Frage, ob in Ras-transformierten Zellen nur eine ATR-Hemmung, nicht aber eine Chk1-Inhibition eine antitumorigene Wirkung aufweist. Dies könnte Anlass für weitere Untersuchungen sein. So könnten die von Murga *et al.* (42) verwendeten Pankreaskrebszellen mit Ras-Transformation auf das Ansprechen auf einen ATR-Inhibitor untersucht werden. Dadurch könnte analysiert werden, ob die Hemmung des ATR-Chk1-Signalweges generell keinen nachweisbaren Einfluss auf diese Zellen zeigt oder die Wirkung bei einer Chk1-Inhibition anders ausfällt als bei einer ATR-Inhibition.

### **4.3 Chk1-Inhibition sensibilisiert für Cisplatin-induzierte Schäden in Medulloblastomzellen**

Ein Zellzyklusstillstand an durch DNA-Schäden induzierbaren Kontrollpunkten erleichtert das Überleben von Tumorzellen nach einer zytotoxischen Chemotherapie, da Zeit zur Reparatur von potenziell tödlichen DNA-Schäden vor der Replikation oder Mitose bleibt (140). Wagner *et al.* (123) zeigten, dass durch eine Behandlung mit Cisplatin Chk1 in Zellen phosphoryliert und somit aktiviert wurde, was zu einem Zellzyklusarrest führte. Dieser Signalweg scheint für durch Cisplatin geschädigte Tumorzellen zum Überleben wichtig zu sein. Eine verbreitete Hypothese ist, dass die Aufhebung des Zellzyklusarrestes das Abtöten von Zellen durch DNA-schädigende Wirkstoffe potenzieren kann. Dies stellt einen möglichen Ansatzpunkt für die Sensibilisierung von Medulloblastomzellen gegenüber einer Cisplatinbehandlung dar. Durch den Einsatz eines Chk1-Inhibitors wird der durch Chk1-induzierte S-Phase-Arrest nach Cisplatingabe aufgehoben und die geschädigte Zelle tritt wieder in den Zellzyklus ein (131). Auf diese Weise wird die Reparatur von durch Cisplatin-induzierten DNA-Schäden verhindert, was zur schädlichen genetischen Instabilität und somit zur Apoptoseinduktion führt. Bei einer Co-Behandlung mit dem Chk1-Inhibitor AZD-7762 und Cisplatin könnten Tumorzellen für Cisplatin sensibilisiert werden und dadurch die Cisplatinkonzentration bei gleicher Wirksamkeit gegen die Tumorzellen reduziert werden. Eine kombinierte Chk1-Inhibition scheint somit ein vielversprechender Ansatz in der Tumorthherapie zu sein. Bereits 1996 beschrieben Bunch *et al.* (141), dass ein

Chk1-Inhibitor Namens UCN-01 einen Cisplatin-induzierten Zellzyklusarrest aufhebt und so die Zellen für Cisplatin sensibilisiert werden können (141). Daher wurde in der hier vorliegenden Arbeit als nächstes die Wirkung einer Chk1-Inhibition mit anschließender Cisplatinbehandlung auf Medulloblastomzellen untersucht. UW228-2-Zellen wurden im Vergleich zu HD-MB03-Zellen mit zehnfach höheren Konzentrationen AZD-7762 vorbehandelt, in Anlehnung an die unterschiedlichen Sensitivitäten beider Zelllinien gegenüber dem Chk1-Inhibitor (s. Abschnitt 3.5) und anschließend mit Cisplatin behandelt. Durch die Kobehandlung zeigte sich eine hochsignifikante Abnahme der Lebensfähigkeit, eine Induktion von signifikant mehr Doppelstrangbrüchen sowie eine stärkere Aktivierung der DNA-Schadensantwort in beiden Medulloblastomzelllinien im Vergleich zur alleinigen Cisplatintherapie. Zudem induzierte die alleinige Chk1-Inhibition keine schwerwiegende Zellschädigung. Beide Zelllinien wurden durch subtoxische Dosen des Chk1-Inhibitors für eine Cisplatinbehandlung signifikant sensibilisiert. Dies könnte an der oben beschriebenen Tatsache liegen, dass eine Cisplatinbehandlung über eine Chk1-Aktivierung einen S-Phase-Arrest induziert und so entstandene DNA-Schäden repariert oder neue Schäden vermieden werden können. Durch den Einsatz von AZD-7762 können die Zellen den Checkpoint jedoch nach Cisplatingabe passieren und es bleibt nicht genügend Zeit um die erzeugten DNA-Schäden zu reparieren, was einen erhöhten Viabilitätsverlust in beiden Tumorzelllinien induziert. Um den gleichen zytotoxischen Effekt auf die beiden Zelllinien zu erzielen waren in der c-Myc-amplifizierten Zelllinie jedoch zehnfach niedrigere AZD-7762-Konzentrationen nötig. Dies unterstützt die Hypothese, dass Medulloblastomzellen mit c-Myc-Amplifikation eine erhöhte Sensitivität gegenüber einer Chk1-Inhibition aufweisen weiter (s. 4.2). Zudem wurde die Sensibilisierung von Tumorzellen durch eine Chk1-Inhibition gegenüber Cisplatin bereits in zuvor veröffentlichten Studien dargestellt und stimmt mit den hier beschriebenen Daten überein (142-144). Sen *et al.* (144) beobachteten, dass der Chk1-Inhibitor LY2606368 die zytotoxische Wirkung von Cisplatin in kleinzelligen Lungenkarzinomzellen (SCLC) *in vitro* und *in vivo* potenzierte. Bereits durch Behandlung mit sehr geringen Konzentrationen LY2606368 (1 nmol/l) konnte die schädigende Wirkung von Cisplatin verstärkt werden und die Kombinationsbehandlung mit unterschiedlich hohen Cisplatin-Konzentrationen wirkte synergistisch auf die SCLC-Zelllinie (144). Diese Daten

unterstützen die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse der Viabilitätsuntersuchungen der Medulloblastomzellen (s. Abb. 12), in denen ebenfalls niedrige Konzentrationen eines Chk1-Inhibitors Tumorzellen signifikant für eine Cisplatintherapie sensibilisieren konnten. Sen *et al.* (144) untersuchten des Weiteren die *in vivo* Wirkung der Chk1-Inhibition, indem in einem gentechnisch veränderten Mausmodell tumortragende Mäuse mit LY2606368, Cisplatin oder der Kombination aus LY2606368 und Cisplatin behandelt wurden (144). Die Kombinationsbehandlung wurde gut vertragen und erzeugte in Übereinstimmung mit den Untersuchungen in dieser Arbeit signifikant mehr Tumorregression als Cisplatin alleine. Die alleinige Chk1-Inhibition in den Medulloblastomzellen in der hier vorliegenden Arbeit zeigte eine deutlich geringere Wirksamkeit im Vergleich zur Kombinationsbehandlung aus Chk1-Inhibition plus Cisplatin. Gegensätzlich dazu steht die Beobachtung von Sen *et al.* (144), dass eine alleinige Behandlung mit einem Chk1-Inhibitor in den SCLC-tragenden Mäusen eine deutlich höhere Wirksamkeit als die Kombinationsbehandlung (Chk1-Inhibition plus Cisplatin) zeigte. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass in der Arbeit von Sen *et al.* (144) bei der Kombinationsbehandlung deutlich niedrigere Konzentrationen LY2606368 verwendet wurden im Vergleich zur alleinigen LY2606368-Behandlung (32 mg / kg / Woche gegenüber 60 mg / kg / Woche). Dadurch sind die Ergebnisse einer alleinigen LY2606368-Behandlung im Vergleich zur Kombinationsbehandlung aus LY2606368 plus Cisplatin nur schwer vergleichbar und könnten die unterschiedlichen Ergebnisse beider Arbeiten erklären. (144). Des Weiteren wurde von Sen *et al.* (144) untersucht, ob LY2606368 die zytotoxische Wirkung von Cisplatin in einem Cisplatinresistenten menschlichen SCLC-Modell verstärken kann. In diesem Versuch zeigte Cisplatin daher alleine keinen signifikanten Effekt, eine Behandlung mit dem Chk1-Inhibitor konnte als Einzelwirkstoff das Tumorwachstum verzögern. Die Überlebensraten sowie die Verzögerung des Tumorwachstums war noch größer, wenn LY2606368 mit Cisplatin kombiniert wurde (144). Dass die Kombinationsbehandlung aus Chk1-Inhibition plus Cisplatin *in vitro* eine signifikant stärkere Wirkung im Vergleich zur alleinigen Chk1-Inhibition oder einer alleinigen Cisplatinbehandlung zeigte, steht im Einklang mit den Ergebnissen in dieser Arbeit sowie mit den Ergebnissen einer *in vivo*-Studie von Gao *et al.* (142). Hier wurde die chemosensibilisierende Wirkung der Inhibition von Chk1 in Kombination mit einer

Cisplatinbehandlung an humanen Brustkrebszellen (MDA-MB-231-Zellen) in einem Mausmodell untersucht (142). Die Kombinationsbehandlung aus Chk1-Herunterregulierung plus Cisplatinbehandlung verbesserte das Überleben der Mäuse signifikant und es konnte eine höhere Anzahl von Mäusen mit vollständiger Tumorregression beobachtet werden als nach alleiniger Cisplatingabe (142). Am Ende der Untersuchungen wiesen alle Mäuse, die eine alleinige Cisplatinbehandlung erhielten, Anzeichen von Metastasen auf. Im Gegensatz dazu wurden nach Kombinationsbehandlung Metastasen nur in 1 von 12 behandelten Mäusen gefunden. Die Inhibition von Chk1 plus Cisplatinbehandlung zeigte *in vivo* somit eine starke antitumorale Wirksamkeit und war für ein verbessertes Überleben und reduzierte Metastasenbildung verantwortlich (142).

Auch die Hemmung der ATR-Proteinkinase, die nach DNA-Schädigung aktiviert wird und anschließend zur Chk1-Aktivierung führt, sensibilisierte verschiedene Tumorzellen für eine zytostatische Therapie sowie für Bestrahlung. Dies unterstützt die Hypothese, dass die Inhibition des ATR-Chk1-Signalweges die Empfindlichkeit von Tumorzellen für eine zytostatische Therapie erhöht. Die Auswirkung der ATR-Inhibition auf Brustkrebszellen, Kolonkarzinomzellen sowie Pankreas-Adenocarcinom-Zellen wurde hierzu in mehreren Studien analysiert (145, 146). Josse *et al.* (145) untersuchten die Wirkung des ATR-Inhibitors VE-821 alleine sowie in Kombination mit zwei Topoisomerase-1-Inhibitoren (Camptothecin und LMP-400) an MDA-231-Brustkrebszellen sowie drei Kolonkarzinomzelllinien (145). Die ATR-Inhibition hatte alleine nur einen minimalen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen, wohingegen der ATR-Inhibitor die Tumorzellen für beide Topoisomerase-1-Inhibitoren sensibilisieren konnte (145). Die Wirksamkeit eines weiteren ATR-Inhibitors (VE-822) wurde von Josse *et al.* (145) sowie von Fokas *et al.* (146) untersucht. VE-822 zeigte als Einzelwirkstoff keinen Einfluss auf das Tumorwachstum (145) und erhöhte nicht die normale Zell- oder Gewebetoxizität oder die Strahlenempfindlichkeit und Chemosensitivität in gesunden Zellen (146). Der ATR-Inhibitor potenzierte hingegen die antitumorogene Wirkung des Topoisomerase-1-Inhibitors Irinotecan in COLO205-Darmkrebszellen *in vivo* signifikant (145) sowie die therapeutische Wirksamkeit von Gemcitabin und einer Bestrahlung in Pankreas-Adenocarcinomzellen *in vitro* und

*in vivo*. (146). Diese Beobachtungen untermauern in Kombination mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten die Hypothese, dass die Inhibition des ATR-Chk1-Signalwegs Tumorzellen signifikant für eine zytostatische Therapie sensibilisieren kann ohne eine stark schädigende Wirkung auf gesundes Gewebe auszuüben. Es scheint, dass zur Sensibilisierung von Tumorzellen nicht nur die Chk1-Inhibition, sondern ebenfalls ATR als Target nutzbar ist und daher wahrscheinlich auch weitere nachgeschaltete Proteine des Signalweges wie Wee1 oder Cdc25 (s. Abbildung 2). Jedoch konnte eine generell erhöhte Empfindlichkeit für eine zytostatische Therapie bei Verwendung eines weiteren ATR-Inhibitors (VX-970) von Leszczynska *et al.* (147) nicht bestätigt werden. Speiseröhrenkrebszellen (OE21-, OE33- und FLO-1-Zellen) konnten durch die ATR-Hemmung für die Behandlung mit Cisplatin, Carboplatin und eine Bestrahlung signifikant sensibilisiert werden (147), jedoch nicht für die Behandlung mit dem Pyrimidin-Antagonisten 5-FU oder dem Mitosehemmstoff Paclitaxel (147). Auch in Lungenkrebszellen konnte VX-970 in der Arbeit von Hall *et al.* (148) nur zum Teil für eine Behandlung mit Cisplatin, Oxaliplatin, Gemcitabin, Etoposid und Irinotecan sensibilisieren. Die Wirkung war am stärksten bei gleichzeitiger Behandlung mit Cisplatin oder Gemcitabin ausgeprägt, konnte jedoch nicht in allen Zelllinien nachgewiesen werden (148). Da nicht alle Tumorzelllinien durch eine ATR-Inhibition für eine zytostatische Therapie sensibilisiert werden konnten, scheint es weitere Einflussfaktoren zu geben, durch die Zellen empfindlicher auf eine Inhibition des ATR-Signalwegs reagieren und noch identifiziert werden müssen. Zudem scheint je nach Zelltyp eine unterschiedliche Kombinationstherapie sinnvoll zu sein, was in weiteren Studien ebenfalls beleuchtet werden muss. Auch eine Chk1-Hemmung führte im Gegensatz zu den Ergebnissen in der hier vorliegenden Arbeit nicht immer zu einer Sensibilisierung gegenüber einer chemotherapeutischen Behandlung. In Experimenten von Wagner *et al.* (130) konnte der Chk1-Inhibitor AZD-7762 HeLa-Zervixkarzinom-Zellen und ein weiterer Chk1-Inhibitor HCT-116- (Zellen eines kolorektalen Adenokarzinoms) und U2OS-Tumorzellen (humane Osteosarkom-Zellen) weder für eine Behandlung mit Cisplatin noch mit Oxaliplatin oder Carboplatin sensibilisieren, wohl aber für eine Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin (130). Allerdings wurden von Wagner *et al.* deutlich geringere Konzentrationen Cisplatin (0,1 – 0,8  $\mu\text{M}$  vs. 2 – 4  $\mu\text{M}$ ) verwendet als in der hier vorliegenden Arbeit. Bei einer

Behandlung der HeLa-Zellen mit einem ATR-Inhibitor zeigte sich jedoch eine deutlich erhöhte Sensibilität der Zellen gegenüber einer Cisplatin- sowie Gemcitabinbehandlung (130). Die Depletion von Chk1 sensibilisierte zudem in der Arbeit von Wagner *et al.* (130) Zellen mit deaktivierten Reparaturproteinen (Rad51, BRCA1, BRCA2, Rad18 und FancD2) nicht für eine Cisplatinbehandlung. Die oben genannten Reparaturproteine sind an der Reparatur von Cisplatin-induzierten Läsionen beteiligt und weisen häufig in mit Cisplatin behandelten Tumoren Defekte auf. Die Deaktivierung von Chk1 kehrte die Empfindlichkeit von Zellen mit Defekten der Reparaturproteine Rad 18 und FancD2 gegenüber Cisplatin sogar um (130). Es scheint somit noch nicht identifizierte Einflussfaktoren zu geben, die zu einer Abhängigkeit von Tumorzellen vom ATR-Chk1-Signalweg führen. Somit muss für jeden Zell- bzw. Tumortypen neu detektiert werden, ob und wenn ja welche Kombinationstherapie zur Behandlung sinnvoll wäre. Wieso die Chk1-Hemmung sowie die ATR-Hemmung manchen Zellen für eine platinbasierte Therapie sensibilisiert, in anderen Zellen jedoch keinen oder sogar einen gegenteiligen Effekt zeigt, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen werden. Der generelle Einsatz von Chk1-Inhibitoren in *in vivo*-Modellsystemen und der Klinik muss deshalb kritisch hinterfragt werden.

#### **4.4 Auswirkungen von Cisplatin und AZD-7762 auf primäre Neurone und Gliazellen**

Bei Cisplatin handelt es sich um ein potentes Zytostatikum in der Medulloblastomtherapie. Dessen Neurotoxizität führt zu Einschränkungen, die die Lebensqualität von behandelten Patienten langfristig beeinflusst, da Neurone nur eine begrenzte Fähigkeit zur Regeneration aufweisen. Durch eine synergistische Kombinationstherapie aus Cisplatin und einem Chk1-Inhibitor könnte die Cisplatinkonzentration möglicherweise bei gleicher Wirksamkeit reduziert werden und so die adversen Effekte vermindert werden. Die neurotoxische Wirkung einer Chk1-Inhibition ist jedoch bislang nicht erforscht worden. Um den Einfluss eines Chk1-Inhibitors sowie von Cisplatin auf die Neurotoxizität zu überprüfen, wurden daher in dieser Arbeit primäre Neurone und Gliazellen als *in vitro*-Modell verwendet. Durch die Cisplatingabe kam es zu einer dosisabhängigen Reduktion der Lebensfähigkeit in beiden Zellen. Dies steht im Einklang mit der bereits bekannten Neurotoxizität der

Platinverbindung (s. 1.3.2.2), es gibt jedoch keine ausreichenden Daten diesbezüglich über den Inhibitor AZD-7762. In den Viabilitätsuntersuchungen führten ähnliche Konzentrationen Cisplatin zu Viabilitätsverlusten sowohl in Tumorzellen als auch in primären Neuronen und Gliazellen. Eine unterschiedliche Sensibilität der Tumorzellen und primären neuronalen Zellen nach Behandlung mit AZD-7762 müsste daher auf den Chk1-Inhibitor zurückzuführen sein. Die Abnahme der Lebensfähigkeit von Neuronen und Gliazellen nach Behandlung mit AZD-7762 betrug auch bei hohen Konzentrationen von bis zu 5  $\mu$ M AZD-7762 bei den Neuronen nicht über 20 % (s. Abb. 3.15). Die Gliazellen schienen insgesamt etwas sensibler gegenüber einer Chk1-Inhibition zu sein (s. Abb. 17). Diese Beobachtung könnte darin begründet sein, dass Gliazellen noch einen aktiven Zellzyklus besitzen, wohingegen Neurone weitestgehend nicht mehr teilungsfähig sind. Insgesamt induzierte eine Behandlung mit dem Chk1-Inhibitor nur einen geringen Verlust der Lebensfähigkeit in Neuronen und Gliazellen. Insbesondere AZD-7762-Konzentrationen, die sich in vorherigen Versuchen für Tumorzellen als stark toxisch erwiesen, führten in den primären Zellen nur zu minimalen Viabilitätsverlusten. Da eine Behandlung mit dem Zytostatikum Cisplatin hingegen einen erheblichen Viabilitätsverlust in beiden primären Zellen induzierte, spricht dies für das Hervorrufen von deutlich weniger oder mildereren Nebenwirkungen auf neuronaler Ebene bei Gabe eines Chk1-Inhibitors im Vergleich zu einer Therapie mit dem Zytostatikum Cisplatin. Dies lässt hoffen, dass durch den Einsatz eines Chk1-Inhibitors eine stärkere Toxizität in Tumorzellen bei gleichzeitig weniger Nebenwirkungen auf primäres Gewebe erreicht werden kann. Besonders Neurone, die nur eine sehr begrenzte Fähigkeit zur Regeneration und Zellteilung aufweisen, könnten so durch geringere Cisplatinkonzentrationen geschont werden. Die Überlebensraten sowie die Lebensqualität der Patienten nach einer adjuvanten Therapie könnten so verbessert werden. Weitere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten zudem, dass eine AZD-7762 Vorbehandlung und eine anschließende Cisplatinbehandlung nicht zu signifikanten Abnahmen der Lebensfähigkeit von Neuronen im Vergleich zu einer alleinigen Cisplatinbehandlung führte (43). Da in der hier vorliegenden Arbeit die Kombinationsbehandlung aus AZD-7762 und Cisplatin in Tumorzellen zu hoch signifikanten Viabilitätsverlusten im Vergleich zur alleinigen Cisplatingabe führte (s. Abbildung 12) und sich diese Sensibilisierung in fortführenden Versuchen unserer

Arbeitsgruppe nicht in den gesunden Neuronen zeigte (43), lässt dies auf ein sinnvolles therapeutisches Fenster von Chk1-Inhibitoren in der Tumorthherapie hoffen.

Es erfolgten bereits klinische Phase-I-Studien, in denen Patienten mit unterschiedlichen Tumoren durch eine Hemmung der Checkpointkinase für eine Cisplatinbehandlung sensibilisiert werden sollten (140, 149, 150). Hierbei zeigten sich schwere Nebenwirkungen der Therapie wie Lungentoxizität, Laktatazidose, Hyperglykämie, Übelkeit und Erbrechen, Herzischämie, Vorhofflimmern, Hypoxie und Sepsis, die zum Teil dosislimitierend und lebensbedrohlich waren (140, 149, 150). Auch der in dieser Arbeit verwendete Inhibitor AZD-7762 wurde in mehreren Phase-I-Studien, unter anderem in den USA und Japan an Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren getestet (151-153). Die Patienten erhielten AZD-7762 jeweils an Tag 1 und 8 der Studien als Kurzinfusion. Hier zeigten sich maximal tolerierbare Konzentrationen von 21 mg (Japan) bzw. 30 mg (USA) AZD-7762. Es traten viele Nebenwirkungen auf, unter anderem Neutropenie, Leukopenie, Bradykardie, Hypertonie, Hautausschlag, Übelkeit, sowie eine erhöhte Aspartataminotransferase und Alaninaminotransferase. Des Weiteren wurde eine dosislimitierende Kardiotoxizität von AZD-7762 beobachtet, die sich durch einen Troponin-Anstieg oder durch relevante Myokardischämien zeigte (151-153). Aufgrund der Kardiotoxizität, die im gesamten Phase-I-Entwicklungsprogramm gemeldet wurde, wurde das Gleichgewicht zwischen Nutzen und Risiko als ungünstig beurteilt und die klinische Weiterentwicklung von AZD-7762 wurde eingestellt (151, 152). Auch wenn AZD-7762 wegen der unvorhersehbaren kardialen Nebenwirkungen in den bisher durchgeführten klinischen Studien nicht weiterentwickelt wurde, bleibt die Chk1-Inhibition ein interessanter Ansatzpunkt vor allem in der Therapie von Hoch-Risiko Patienten.

Wegen der ausgeprägten Wirksamkeit der Hemmung des ATR-Chk1-Signalweges in c-Myc-überexprimierenden Tumoren sollten weitere Inhibitoren des Signalwegs in spezifischen Tumoruntergruppen untersucht werden. So könnte die Inhibition des Proteins Wee 1, welches Chk1 in Ihrem gemeinsamen Signalweg nachgeschaltet ist, auf seine antitumorigenen Effekte untersucht werden. Dabei sollte auch die Wirkung auf primäres Gewebe und hier speziell auf kardiale Strukturen (Kardiomyozyten,

Perikard und Epikard) Beachtung finden, da die Kardiotoxizität als therapielimitierend bei klinischer Anwendung von Chk1-Inhibitoren erkannt wurde. Es sollte ein Inhibitor identifiziert werden, der bestimmte Tumorzellen (zum Beispiel solche mit c-Myc-Überexpression) für eine zytostatische Therapie sensibilisiert, ohne eine gravierende Zytotoxizität auf normales Gewebe (z. B. Kardiomyozyten) auszuüben. Daher sollten nicht nur weitere Inhibitoren mit geringerer Toxizität entwickelt werden, sondern vor allem inhibitorspezifische Patientengruppen für die jeweilige Therapie in Zukunft identifiziert werden. So benötigten Zellen mit c-Myc-Überexpression in der hier vorliegenden Arbeit *in vitro* nur eine zehnfach geringere Konzentration des Chk1-Inhibitors für eine effiziente Sensibilisierung der Tumorzellen gegenüber Cisplatin als Zellen ohne c-Myc-Überexpression (s. Abbildung 12). Auch in mehreren anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Zellen mit einer Überexpression von Proto-Onkogenen deutlich empfindlicher auf eine Inhibition des ATR-Chk1-Signalwegs reagierten. Daher wäre es möglich, dass bestimmte Patientengruppen bei ausreichender Wirksamkeit deutlich weniger AZD-7762 verabreicht bekommen müssten. Als Beispiel seien Tumore genannt, die hohen replikativen Stress aufweisen, beispielsweise durch eine c-Myc-Überexpression, eine Ras-Transformation oder RAD51-Hemmung (s. 4.2). Durch den Einsatz geringerer Chk1-Inhibitor-Konzentrationen würden eventuell auch die oben genannten schweren Nebenwirkungen bei diesen Patienten nicht auftreten, wodurch die Therapie klinisch anwendbar werden könnte. Zudem scheinen Tumore, bei denen der G<sub>1</sub>-Checkpoint bereits durch eine P53-Mutation defekt ist, sensibler auf eine Chk1-Hemmung zu reagieren. Kommt es zu einem Verlust von P53, was einen häufigen genetischen Defekt in Krebszellen darstellt, ist die Zelle stärker auf die Funktionsfähigkeit der verbliebenen Kontrollpunkte angewiesen. Daher ist der Chk1-Signalweg in P53-mutierten Krebszellen häufig hochreguliert und für die Lebensfähigkeit dieser Zellen erforderlich (44). Durch die Chk1-Hemmung verliert die P53-mutierte Zelle einen weiteren wichtigen regulatorischen Kontrollpunkt und könnte so effizienter durch herkömmliche Zytostatika geschädigt werden. So konnte ein selektiver Chk1-Inhibitor bereits *in vitro* die Wirksamkeit des Chemotherapeutikums Gemcitabin nur in P53-mutierten HT29-Zellen (Kolonkarzinom-Zellen), nicht jedoch in P53-Wildtyp-HCT116-Zellen (Kolonkarzinom-Zellen) erhöhen (154). Ebenso wurden Plattenepithelkarzinom-

Zellen des Halses mit (HN31-Zellen) und ohne (HN30-Zellen) P53-Mutation *in vitro* auf das Ansprechen auf eine Kombinationsbehandlung mit dem Chk1-Inhibitor AZD-7762 plus Cisplatin untersucht. Nur in P53-mutierten HN31-Zellen induzierte die Kombinationsbehandlung eine deutlich stärkere Abtötung der Zellkolonien im Gegensatz zu einer alleinigen Cisplatin- oder AZD-7762-Behandlung. Dieser Effekt konnte nicht in P53-Wildtyp HN30-Zellen beobachtet werden (155). Somit lässt sich vermuten, dass Patienten mit P53-mutierten Tumorzellen von einer Chk1-Inhibition profitieren könnten. Für diese Tumoruntergruppen wären neue *in vitro*- sowie *in vivo*-Studien nötig. Hierbei müsste zunächst detektiert werden, ob eine Dosisreduktion des Chk1-Inhibitors weiterhin eine signifikante Wirkung alleine und in Kombination mit konventionellen Behandlungsmethoden aufweist. Gleichzeitig müsste in den Studien ein besonderes Augenmerk auf die adversen Effekte durch die Behandlung gelegt werden, um nachzuvollziehen, ob die Dosisreduktion tatsächlich zu weniger und abgeschwächten Nebenwirkungen führt und die Therapie so für den klinischen Einsatz anwendbar wird. Dieser Ansatz personalisierter Medizin sollte in Zukunft mehr in den Vordergrund rücken um individuelle und targetspezifische Ansätze zu ermöglichen.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Polkinghorn WR, Tarbell NJ. Medulloblastoma: tumorigenesis, current clinical paradigm, and efforts to improve risk stratification. *Nat Clin Pract Oncol*. 2007;4(5):295-304.
2. Rutkowski S TR, Korinthenberg R, Warmuth-Metz M, Weckesser M, Krauss J, Pietsch T. Leitsymptome und Diagnostik der ZNS-Tumoren im Kindes- und Jugendalter. Gemeinsame Leitlinie der Gesellschaft für Neuropädiatrie und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie. 2016.
3. Gurney JG, Kadan-Lottick N. Brain and other central nervous system tumors: rates, trends, and epidemiology. *Curr Opin Oncol*. 2001;13(3):160-6.
4. Kaatsch P GD, Spix C. German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2018 (1980-2017). Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz 2019. 2019.
5. Kleihues P BP, Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol* 3. 1993:255–68.
6. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016;131(6):803-20.
7. Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, Remke M, Cho YJ, Clifford SC, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol*. 2012;123(4):465-72.
8. Ramaswamy V, Remke M, Bouffet E, Bailey S, Clifford SC, Doz F, et al. Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus. *Acta Neuropathol*. 2016;131(6):821-31.
9. Heinrich PC, Müller, M., Graeve, L. . Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9., vollständig überarbeitete Auflage ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014.
10. Kool M, Korshunov A, Remke M, Jones DT, Schlanstein M, Northcott PA, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol*. 2012;123(4):473-84.
11. Northcott PA, Korshunov A, Witt H, Hielscher T, Eberhart CG, Mack S, et al. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol*. 2011;29(11):1408-14.
12. Rohban S, Campaner S. Myc induced replicative stress response: How to cope with it and exploit it. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1849(5):517-24.
13. Rutkowski S. Medulloblastom im Kindes- und Jugendalter, S1-Leitlinie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie 025/009. AWMF online 2018;7.
14. Stearns D, Chaudhry A, Abel TW, Burger PC, Dang CV, Eberhart CG. c-myc overexpression causes anaplasia in medulloblastoma. *Cancer Res*. 2006;66(2):673-81.
15. Pietsch T, Haberler C. Update on the integrated histopathological and genetic classification of medulloblastoma - a practical diagnostic guideline. *Clin Neuropathol*. 2016;35(6):344-52.
16. Lindsey JC, Hill RM, Megahed H, Lusher ME, Schwalbe EC, Cole M, et al. TP53 mutations in favorable-risk Wnt/Wingless-subtype medulloblastomas. *J Clin Oncol*. 2011;29(12):e344-6; author reply e7-8.
17. Appel T, Gath R, Wernert N, Martini M, Berge S. [Molecular biological and immunohistochemical analysis of tp53 in human ameloblastomas]. *Mund Kiefer Gesichtschir*. 2004;8(3):167-72.
18. Kaatsch P. GD, Spix C. German Childhood Cancer Registry - Jahresbericht / Annual Report 2016. Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI), Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. 2016.

19. Strother D, Ashley D, Kellie SJ, Patel A, Jones-Wallace D, Thompson S, et al. Feasibility of four consecutive high-dose chemotherapy cycles with stem-cell rescue for patients with newly diagnosed medulloblastoma or supratentorial primitive neuroectodermal tumor after craniospinal radiotherapy: results of a collaborative study. *J Clin Oncol.* 2001;19(10):2696-704.
20. Mulhern RK, Palmer SL, Merchant TE, Wallace D, Kocak M, Brouwers P, et al. Neurocognitive consequences of risk-adapted therapy for childhood medulloblastoma. *J Clin Oncol.* 2005;23(24):5511-9.
21. Zeltzer PM, Boyett JM, Finlay JL, Albright AL, Rorke LB, Milstein JM, et al. Metastasis stage, adjuvant treatment, and residual tumor are prognostic factors for medulloblastoma in children: conclusions from the Children's Cancer Group 921 randomized phase III study. *J Clin Oncol.* 1999;17(3):832-45.
22. Kortmann RD, Kuhl J, Timmermann B, Mittler U, Urban C, Budach V, et al. Postoperative neoadjuvant chemotherapy before radiotherapy as compared to immediate radiotherapy followed by maintenance chemotherapy in the treatment of medulloblastoma in childhood: results of the German prospective randomized trial HIT '91. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000;46(2):269-79.
23. Jenkin D, Shabanah MA, Shail EA, Gray A, Hassounah M, Khafaga Y, et al. Prognostic factors for medulloblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000;47(3):573-84.
24. Ellison DW, Dalton J, Kocak M, Nicholson SL, Fraga C, Neale G, et al. Medulloblastoma: clinicopathological correlates of SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups. *Acta Neuropathol.* 2011;121(3):381-96.
25. Pfister S, Remke M, Benner A, Mendrzyk F, Toedt G, Felsberg J, et al. Outcome prediction in pediatric medulloblastoma based on DNA copy-number aberrations of chromosomes 6q and 17q and the MYC and MYCN loci. *J Clin Oncol.* 2009;27(10):1627-36.
26. Eberhart CG, Kratz J, Wang Y, Summers K, Stearns D, Cohen K, et al. Histopathological and molecular prognostic markers in medulloblastoma: c-myc, N-myc, TrkC, and anaplasia. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004;63(5):441-9.
27. Shih DJ, Northcott PA, Remke M, Korshunov A, Ramaswamy V, Kool M, et al. Cytogenetic prognostication within medulloblastoma subgroups. *J Clin Oncol.* 2014;32(9):886-96.
28. Rickman DS, Schulte JH, Eilers M. The Expanding World of N-MYC-Driven Tumors. *Cancer Discov.* 2018;8(2):150-63.
29. Eberhart CG, Burger PC. Anaplasia and grading in medulloblastomas. *Brain Pathol.* 2003;13(3):376-85.
30. Leonard JR, Cai DX, Rivet DJ, Kaufman BA, Park TS, Levy BK, et al. Large cell/anaplastic medulloblastomas and medulloblastomas: clinicopathological and genetic features. *J Neurosurg.* 2001;95(1):82-8.
31. Cho YJ, Tsherniak A, Tamayo P, Santagata S, Ligon A, Greulich H, et al. Integrative genomic analysis of medulloblastoma identifies a molecular subgroup that drives poor clinical outcome. *J Clin Oncol.* 2011;29(11):1424-30.
32. Schünke M, Schulte, E., Schumacher, U., & Voll, M. Kopf, Hals Und Neuroanatomie. 5., vollständig überarbeitete Auflage. 2018.
33. Duffner PK, Horowitz ME, Krischer JP, Friedman HS, Burger PC, Cohen ME, et al. Postoperative chemotherapy and delayed radiation in children less than three years of age with malignant brain tumors. *N Engl J Med.* 1993;328(24):1725-31.
34. Evans AE, Jenkin RD, Sposto R, Ortega JA, Wilson CB, Wara W, et al. The treatment of medulloblastoma. Results of a prospective randomized trial of radiation therapy with and without CCNU, vincristine, and prednisone. *J Neurosurg.* 1990;72(4):572-82.
35. Lian H, Daniels C, Han YP, Li QF, Zhao Y, Wang BC, et al. Incidence of metastatic disease and survival among patients with newly diagnosed primary CNS tumors in the United States from 2004-2013. *J Cancer.* 2019;10(13):3037-45.

36. Fouladi M, Gajjar A, Boyett JM, Walter AW, Thompson SJ, Merchant TE, et al. Comparison of CSF cytology and spinal magnetic resonance imaging in the detection of leptomeningeal disease in pediatric medulloblastoma or primitive neuroectodermal tumor. *J Clin Oncol.* 1999;17(10):3234-7.
37. Packer RJ, Goldwein J, Nicholson HS, Vezina LG, Allen JC, Ris MD, et al. Treatment of children with medulloblastomas with reduced-dose craniospinal radiation therapy and adjuvant chemotherapy: A Children's Cancer Group Study. *J Clin Oncol.* 1999;17(7):2127-36.
38. Ris MD, Packer R, Goldwein J, Jones-Wallace D, Boyett JM. Intellectual outcome after reduced-dose radiation therapy plus adjuvant chemotherapy for medulloblastoma: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol.* 2001;19(15):3470-6.
39. Packer RJ, Gajjar A, Vezina G, Rorke-Adams L, Burger PC, Robertson PL, et al. Phase III study of craniospinal radiation therapy followed by adjuvant chemotherapy for newly diagnosed average-risk medulloblastoma. *J Clin Oncol.* 2006;24(25):4202-8.
40. Jenkin D, Danjoux C, Greenberg M. Subsequent quality of life for children irradiated for a brain tumor before age four years. *Med Pediatr Oncol.* 1998;31(6):506-11.
41. Rutkowski S, Bode U, Deinlein F, Ottensmeier H, Warmuth-Metz M, Soerensen N, et al. Treatment of early childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy alone. *N Engl J Med.* 2005;352(10):978-86.
42. Murga M, Campaner S, Lopez-Contreras AJ, Toledo LI, Soria R, Montana MF, et al. Exploiting oncogene-induced replicative stress for the selective killing of Myc-driven tumors. *Nat Struct Mol Biol.* 2011;18(12):1331-5.
43. Kruger K, Geist K, Stuhldreier F, Schumacher L, Blumel L, Remke M, et al. Multiple DNA damage-dependent and DNA damage-independent stress responses define the outcome of ATR/Chk1 targeting in medulloblastoma cells. *Cancer Lett.* 2018;430:34-46.
44. Barnum KJ, O'Connell MJ. Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods Mol Biol.* 2014;1170:29-40.
45. Harper JW, Elledge SJ. The DNA damage response: Ten years after. *Mol Cell.* 2007;28(5):739-45.
46. Giglia-Mari G, Zotter A, Vermeulen W. DNA damage response. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(1):a000745.
47. Tapia-Alveal C, Calonge TM, O'Connell MJ. Regulation of chk1. *Cell Div.* 2009;4:8.
48. O'Connell MJ, Raleigh JM, Verkade HM, Nurse P. Chk1 is a wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 by Y15 phosphorylation. *EMBO J.* 1997;16(3):545-54.
49. Russell P, Nurse P. cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell.* 1986;45(1):145-53.
50. Raleigh JM, O'Connell MJ. The G(2) DNA damage checkpoint targets both Wee1 and Cdc25. *J Cell Sci.* 2000;113 ( Pt 10):1727-36.
51. Zou L, Elledge SJ. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science.* 2003;300(5625):1542-8.
52. Zhao H, Piwnicka-Worms H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol.* 2001;21(13):4129-39.
53. den Elzen N, Kosoy A, Christopoulos H, O'Connell MJ. Resisting arrest: recovery from checkpoint arrest through dephosphorylation of Chk1 by PP1. *Cell Cycle.* 2004;3(5):529-33.
54. Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. P21 Is Necessary for the P53-Mediated G(1) Arrest in Human Cancer-Cells. *Cancer Research.* 1995;55(22):5187-90.
55. Hoeflerlin LA, Oleinik NV, Krupenko NI, Krupenko SA. Activation of p21-Dependent G1/G2 Arrest in the Absence of DNA Damage as an Antiapoptotic Response to Metabolic Stress. *Genes Cancer.* 2011;2(9):889-99.
56. Bouchard C, Staller P, Eilers M. Control of cell proliferation by Myc. *Trends Cell Biol.* 1998;8(5):202-6.

57. Kress TR, Sabo A, Amati B. MYC: connecting selective transcriptional control to global RNA production. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(10):593-607.
58. Høglund A, Nilsson LM, Muralidharan SV, Hasvold LA, Merta P, Rudelius M, et al. Therapeutic implications for the induced levels of Chk1 in Myc-expressing cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2011;17(22):7067-79.
59. Dominguez-Sola D, Ying CY, Grandori C, Ruggiero L, Chen B, Li M, et al. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature*. 2007;448(7152):445-51.
60. Campaner S, Amati B. Two sides of the Myc-induced DNA damage response: from tumor suppression to tumor maintenance. *Cell Div*. 2012;7(1):6.
61. Cottini F, Hideshima T, Suzuki R, Tai YT, Bianchini G, Richardson PG, et al. Synthetic Lethal Approaches Exploiting DNA Damage in Aggressive Myeloma. *Cancer Discov*. 2015;5(9):972-87.
62. Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, Kramer A, Tort F, Zieger K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*. 2005;434(7035):864-70.
63. Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science*. 2008;319(5868):1352-5.
64. Wheate NJ, Walker S, Craig GE, Oun R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans*. 2010;39(35):8113-27.
65. Dilruba S, Kalayda GV. Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemoth Pharm*. 2016;77(6):1103-24.
66. Platinum Coordination Complexes. *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. Bethesda (MD)2012.
67. Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature*. 1965;205:698-9.
68. Bracher F, Heisig, P., Langguth, P., Mutschler, E., Rücker, G., Scriba, G. K. E., Stahl-Biskup, E., Troschütz, R., Seitz, G., Schirmeister, T., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Arzneibuch-Kommentar . *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart*. 2019;1. Auflage einschließl. 61. Akt.Lfg. 2019. .
69. Kim H, Kang HJ, Lee JW, Park JD, Park KD, Shin HY, et al. Irinotecan, vincristine, cisplatin, cyclophosphamide, and etoposide for refractory or relapsed medulloblastoma/PNET in pediatric patients. *Childs Nerv Syst*. 2013;29(10):1851-8.
70. Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(22):14298-302.
71. Ciarimboli G, Deuster D, Knief A, Sperling M, Holtkamp M, Edemir B, et al. Organic cation transporter 2 mediates cisplatin-induced oto- and nephrotoxicity and is a target for protective interventions. *Am J Pathol*. 2010;176(3):1169-80.
72. Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev*. 1999;99(9):2467-98.
73. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014;740:364-78.
74. Baik MH, Friesner RA, Lippard SJ. Theoretical study of cisplatin binding to purine bases: why does cisplatin prefer guanine over adenine? *J Am Chem Soc*. 2003;125(46):14082-92.
75. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev*. 2007;33(1):9-23.
76. Fichtinger-Schepman AM, van der Veer JL, den Hartog JH, Lohman PH, Reedijk J. Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry*. 1985;24(3):707-13.
77. Mello JA, Lippard SJ, Essigmann JM. DNA adducts of cis-diamminedichloroplatinum(II) and its trans isomer inhibit RNA polymerase II differentially in vivo. *Biochemistry*. 1995;34(45):14783-91.
78. Olive PL, Banath JP. Kinetics of H2AX phosphorylation after exposure to cisplatin. *Cytometry B Clin Cytom*. 2009;76(2):79-90.

79. Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett.* 2013;332(2):237-48.
80. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature.* 2000;408(6811):433-9.
81. Laurell G, Jungnelius U. High-dose cisplatin treatment: hearing loss and plasma concentrations. *Laryngoscope.* 1990;100(7):724-34.
82. Thompson SW, Davis LE, Kornfeld M, Hilgers RD, Standefer JC. Cisplatin neuropathy. Clinical, electrophysiologic, morphologic, and toxicologic studies. *Cancer.* 1984;54(7):1269-75.
83. Madias NE, Harrington JT. Platinum nephrotoxicity. *Am J Med.* 1978;65(2):307-14.
84. Daugaard G, Abildgaard U. Cisplatin nephrotoxicity. A review. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1989;25(1):1-9.
85. Skowron MA, Petzsch P, Hardt K, Wagner N, Beier M, Stepanow S, et al. Distinctive mutational spectrum and karyotype disruption in long-term cisplatin-treated urothelial carcinoma cell lines. *Sci Rep.* 2019;9(1):14476.
86. Hartmann JT, Lipp HP. Toxicity of platinum compounds. *Expert Opin Pharmacother.* 2003;4(6):889-901.
87. Markman M. Chemotherapy-associated neurotoxicity: an important side effect-impacting on quality, rather than quantity, of life. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1996;122(9):511-2.
88. Szeimies R-MHA, Jann. *Tumoren der Haut : Grundlagen, Diagnostik und Therapie in der dermatologischen Onkologie.* Thieme Verlagsgruppe, Stuttgart, New York, Delhi, Rio. 2010.
89. Staff NP, Cavaletti G, Islam B, Lustberg M, Psimaras D, Tamburin S. Platinum-induced peripheral neurotoxicity: From pathogenesis to treatment. *J Peripher Nerv Syst.* 2019;24 Suppl 2:S26-S39.
90. Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci.* 2007;334(2):115-24.
91. Kuhlmann MK, Burkhardt G, Kohler H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant.* 1997;12(12):2478-80.
92. Ciarimboli G, Ludwig T, Lang D, Pavenstadt H, Koepsell H, Piechota HJ, et al. Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *Am J Pathol.* 2005;167(6):1477-84.
93. Ozulker F, Ozulker T, Uzun AK, Ozpacaci T. Investigation of the efficacy of 99mTc-DTPA scintigraphic GFR measurement with Gates method in the detection of cisplatin-induced nephrotoxicity in comparison with plasma urea and creatinine measurement. *Med Oncol.* 2011;28(4):1101-6.
94. Goren MP, Forastiere AA, Wright RK, Horowitz ME, Dodge RK, Kamen BA, et al. Carboplatin (CBDCA), iproplatin (CHIP), and high dose cisplatin in hypertonic saline evaluated for tubular nephrotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1987;19(1):57-60.
95. Flatters SJL, Dougherty PM, Colvin LA. Clinical and preclinical perspectives on Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy (CIPN): a narrative review. *Brit J Anaesth.* 2017;119(4):737-49.
96. Staff NP, Cavaletti G, Islam B, Lustberg M, Psimaras D, Tamburin S. Platinum-induced peripheral neurotoxicity: From pathogenesis to treatment. *J Peripher Nerv Syst.* 2019;24:S26-S39.
97. van der Hoop RG, van der Burg ME, ten Bokkel Huinink WW, van Houwelingen C, Neijt JP. Incidence of neuropathy in 395 patients with ovarian cancer treated with or without cisplatin. *Cancer.* 1990;66(8):1697-702.
98. Alberts DS, Noel JK. Cisplatin-associated neurotoxicity: can it be prevented? *Anticancer Drugs.* 1995;6(3):369-83.
99. Warner E. Neurotoxicity of cisplatin and taxol. *Int J Gynecol Cancer.* 1995;5(3):161-9.

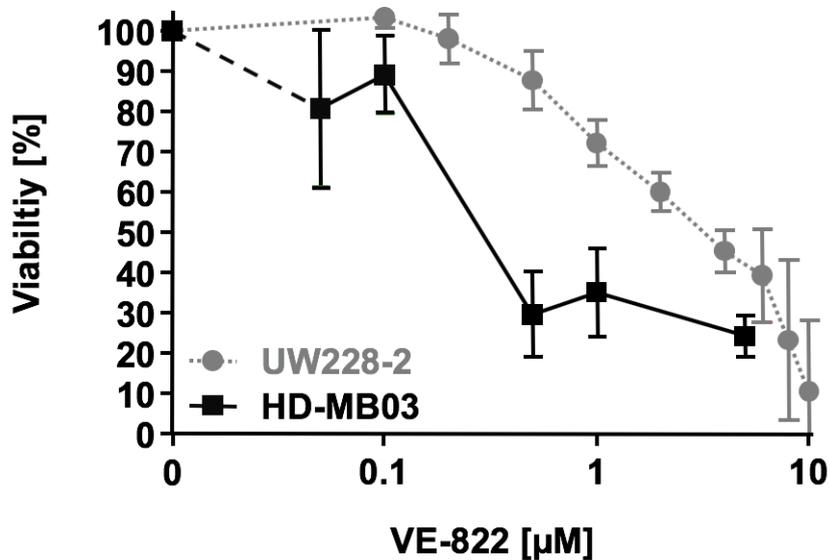
100. Avan A, Postma TJ, Ceresa C, Avan A, Cavaletti G, Giovannetti E, et al. Platinum-induced neurotoxicity and preventive strategies: past, present, and future. *Oncologist*. 2015;20(4):411-32.
101. Amptoulach S, Tsavaris N. Neurotoxicity caused by the treatment with platinum analogues. *Chemother Res Pract*. 2011;2011:843019.
102. Moxon-Emre I, Bouffet E, Taylor MD, Laperriere N, Scantlebury N, Law N, et al. Impact of craniospinal dose, boost volume, and neurologic complications on intellectual outcome in patients with medulloblastoma. *J Clin Oncol*. 2014;32(17):1760-8.
103. van de Velde ME, Kaspers GL, Abbink FCH, Wilhelm AJ, Ket JCF, van den Berg MH. Vincristine-induced peripheral neuropathy in children with cancer: A systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;114:114-30.
104. Prince EW, Balakrishnan I, Shah M, Levy JMM, Griesinger AM, Alimova I, et al. Checkpoint kinase 1 expression is an adverse prognostic marker and therapeutic target in MYC-driven medulloblastoma. *Oncotarget*. 2016;7(33):53881-94.
105. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*. 2015;111:A3 B 1-A3 B
106. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. 2000;267(17):5421-6.
107. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
108. Jansohn M, ; Rothhämel, S. *Gentechnische Methoden*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2012. 2012;5. Auflage.
109. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1991;139(2):271-9.
110. Paulson JR, Taylor SS. Phosphorylation of histones 1 and 3 and nonhistone high mobility group 14 by an endogenous kinase in HeLa metaphase chromosomes. *J Biol Chem*. 1982;257(11):6064-72.
111. Gurley LR, Walters RA, Barham SS, Deaven LL. Heterochromatin and histone phosphorylation. *Exp Cell Res*. 1978;111(2):373-83.
112. Yu YM, Arora A, Min WX, Roifman CM, Grunebaum E. EdU incorporation is an alternative non-radioactive assay to [<sup>3</sup>H]thymidine uptake for in vitro measurement of mice T-cell proliferations. *Journal of Immunological Methods*. 2009;350(1-2):29-35.
113. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*. 1998;273(10):5858-68.
114. Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, Halazonetis TD. p53 Binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol*. 2000;151(7):1381-90.
115. Abraham RT. Checkpoint signalling: focusing on 53BP1. *Nat Cell Biol*. 2002;4(12):E277-9.
116. Student. The Probable Error of a Mean. *Biometrika*. 1908;vol. 6, no. 1:pp. 1-25
117. Ivanov DP, Coyle B, Walker DA, Grabowska AM. In vitro models of medulloblastoma: Choosing the right tool for the job. *J Biotechnol*. 2016;236:10-25.
118. Shiloh Y. ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev*. 2001;11(1):71-7.
119. Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol*. 2000;10(15):886-95.
120. Moh C, Kubiak JZ, Bajic VP, Zhu X, Smith MA, Lee HG. Cell cycle deregulation in the neurons of Alzheimer's disease. *Results Probl Cell Differ*. 2011;53:565-76.
121. Schünke M, Schulte E, Schumacher, U. *Prometheus LernAtlas der Anatomie; Kopf, Hals und Neuroanatomie* Georg Thieme Verlag Stuttgart 2012; 3. Auflage.
122. Dehmelt L, Halpain S. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol*. 2005;6(1):204.

123. St Clair WH, Adams JA, Bues M, Fullerton BC, La Shell S, Kooy HM, et al. Advantage of protons compared to conventional X-ray or IMRT in the treatment of a pediatric patient with medulloblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;58(3):727-34.
124. Biroccio A, Benassi B, Amodei S, Gabellini C, Del Bufalo D, Zupi G. c-Myc down-regulation increases susceptibility to cisplatin through reactive oxygen species-mediated apoptosis in M14 human melanoma cells. *Mol Pharmacol.* 2001;60(1):174-82.
125. Leonetti C, Biroccio A, Candiloro A, Citro G, Fornari C, Mottolese M, et al. Increase of cisplatin sensitivity by c-myc antisense oligodeoxynucleotides in a human metastatic melanoma inherently resistant to cisplatin. *Clin Cancer Res.* 1999;5(9):2588-95.
126. von Bueren AO, Oehler C, Shalaby T, von Hoff K, Pruschy M, Seifert B, et al. c-MYC expression sensitizes medulloblastoma cells to radio- and chemotherapy and has no impact on response in medulloblastoma patients. *Bmc Cancer.* 2011;11.
127. Albihn A, Loven J, Ohlsson J, Osorio LM, Henriksson M. c-Myc-dependent etoposide-induced apoptosis involves activation of Bax and caspases, and PKCdelta signaling. *J Cell Biochem.* 2006;98(6):1597-614.
128. Adachi S, Obaya AJ, Han Z, Ramos-Desimone N, Wyche JH, Sedivy JM. c-Myc is necessary for DNA damage-induced apoptosis in the G(2) phase of the cell cycle. *Mol Cell Biol.* 2001;21(15):4929-37.
129. de Fries R, Mitsunashi M. Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: comparison of alamarBlue assay to 3H-thymidine incorporation assay. *J Clin Lab Anal.* 1995;9(2):89-95.
130. Wagner JM, Karnitz LM. Cisplatin-induced DNA damage activates replication checkpoint signaling components that differentially affect tumor cell survival. *Mol Pharmacol.* 2009;76(1):208-14.
131. Cruet-Hennequart S, Villalan S, Kaczmarczyk A, O'Meara E, Sokol AM, Carty MP. Characterization of the effects of cisplatin and carboplatin on cell cycle progression and DNA damage response activation in DNA polymerase eta-deficient human cells. *Cell Cycle.* 2009;8(18):3039-50.
132. Sokol AM, Cruet-Hennequart S, Pasero P, Carty MP. DNA polymerase eta modulates replication fork progression and DNA damage responses in platinum-treated human cells. *Sci Rep.* 2013;3:3277.
133. Donaldson KL, Goolsby GL, Wahl AF. Cytotoxicity of the anticancer agents cisplatin and taxol during cell proliferation and the cell cycle. *Int J Cancer.* 1994;57(6):847-55.
134. Rundle S, Bradbury A, Drew Y, Curtin NJ. Targeting the ATR-CHK1 Axis in Cancer Therapy. *Cancers.* 2017;9(5).
135. Cole KA, Huggins J, Laquaglia M, Hulderman CE, Russell MR, Bosse K, et al. RNAi screen of the protein kinome identifies checkpoint kinase 1 (CHK1) as a therapeutic target in neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(8):3336-41.
136. Walton MI, Eve PD, Hayes A, Valenti MR, Brandon AKD, Box G, et al. CCT244747 Is a Novel Potent and Selective CHK1 Inhibitor with Oral Efficacy Alone and in Combination with Genotoxic Anticancer Drugs. *Clinical Cancer Research.* 2012;18(20):5650-61.
137. Gilad O, Nabet BY, Ragland RL, Schoppy DW, Smith KD, Durham AC, et al. Combining ATR suppression with oncogenic Ras synergistically increases genomic instability, causing synthetic lethality or tumorigenesis in a dosage-dependent manner. *Cancer Res.* 2010;70(23):9693-702.
138. Schoppy DW, Ragland RL, Gilad O, Shastri N, Peters AA, Murga M, et al. Oncogenic stress sensitizes murine cancers to hypomorphic suppression of ATR. *J Clin Invest.* 2012;122(1):241-52.
139. Berg JM, Tymoczko, J. L., Stryer, L. *Stryer Biochemie.* Springer Berlin Heidelberg. 2013;7. Auflage.

140. Perez RP, Lewis LD, Beelen AP, Olszanski AJ, Johnston N, Rhodes CH, et al. Modulation of cell cycle progression in human tumors: a pharmacokinetic and tumor molecular pharmacodynamic study of cisplatin plus the Chk1 inhibitor UCN-01 (NSC 638850). *Clin Cancer Res.* 2006;12(23):7079-85.
141. Bunch RT, Eastman A. Enhancement of cisplatin-induced cytotoxicity by 7-hydroxystaurosporine (UCN-01), a new G2-checkpoint inhibitor. *Clin Cancer Res.* 1996;2(5):791-7.
142. Gao Q, Huang X, Tang D, Cao Y, Chen G, Lu Y, et al. Influence of chk1 and plk1 silencing on radiation- or cisplatin-induced cytotoxicity in human malignant cells. *Apoptosis.* 2006;11(10):1789-800.
143. Carrassa L, Broggin M, Erba E, Damia G. Chk1, but not Chk2, is involved in the cellular response to DNA damaging agents: differential activity in cells expressing or not p53. *Cell Cycle.* 2004;3(9):1177-81.
144. Sen T, Tong P, Stewart CA, Cristea S, Valliani A, Shames DS, et al. CHK1 Inhibition in Small-Cell Lung Cancer Produces Single-Agent Activity in Biomarker-Defined Disease Subsets and Combination Activity with Cisplatin or Olaparib. *Cancer Res.* 2017;77(14):3870-84.
145. Josse R, Martin SE, Guha R, Ormanoglu P, Pfister TD, Reaper PM, et al. ATR inhibitors VE-821 and VX-970 sensitize cancer cells to topoisomerase i inhibitors by disabling DNA replication initiation and fork elongation responses. *Cancer Res.* 2014;74(23):6968-79.
146. Fokas E, Prevo R, Pollard JR, Reaper PM, Charlton PA, Cornelissen B, et al. Targeting ATR in vivo using the novel inhibitor VE-822 results in selective sensitization of pancreatic tumors to radiation. *Cell Death Dis.* 2012;3:e441.
147. Leszczynska KB, Dobrynin G, Leslie RE, Ient J, Boumelha AJ, Senra JM, et al. Preclinical testing of an Atr inhibitor demonstrates improved response to standard therapies for esophageal cancer. *Radiother Oncol.* 2016;121(2):232-8.
148. Hall AB, Newsome D, Wang Y, Boucher DM, Eustace B, Gu Y, et al. Potentiation of tumor responses to DNA damaging therapy by the selective ATR inhibitor VX-970. *Oncotarget.* 2014;5(14):5674-85.
149. Sausville EA, Arbuck SG, Messmann R, Headlee D, Bauer KS, Lush RM, et al. Phase I trial of 72-hour continuous infusion UCN-01 in patients with refractory neoplasms. *J Clin Oncol.* 2001;19(8):2319-33.
150. Lara PN, Jr., Mack PC, Synold T, Frankel P, Longmate J, Gumerlock PH, et al. The cyclin-dependent kinase inhibitor UCN-01 plus cisplatin in advanced solid tumors: a California cancer consortium phase I pharmacokinetic and molecular correlative trial. *Clin Cancer Res.* 2005;11(12):4444-50.
151. Sausville E, Lorusso P, Carducci M, Carter J, Quinn MF, Malburg L, et al. Phase I dose-escalation study of AZD7762, a checkpoint kinase inhibitor, in combination with gemcitabine in US patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014;73(3):539-49.
152. Seto T, Esaki T, Hirai F, Arita S, Nosaki K, Makiyama A, et al. Phase I, dose-escalation study of AZD7762 alone and in combination with gemcitabine in Japanese patients with advanced solid tumours. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013;72(3):619-27.
153. Ho AL, Bendell JC, Cleary JM, Schwartz GK, Burris HA, Oakes P, et al. Phase I, open-label, dose-escalation study of AZD7762 in combination with irinotecan (irinot) in patients (pts) with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology.* 2011;29(15).
154. King C, Diaz H, Barnard D, Barda D, Clawson D, Blosser W, et al. Characterization and preclinical development of LY2603618: a selective and potent Chk1 inhibitor. *Invest New Drugs.* 2014;32(2):213-26.
155. Gadhikar MA, Sciuto MR, Alves MV, Pickering CR, Osman AA, Neskey DM, et al. Chk1/2 inhibition overcomes the cisplatin resistance of head and neck cancer cells secondary to the loss of functional p53. *Mol Cancer Ther.* 2013;12(9):1860-73.

## 6. Anhang

### 6.1 Ergänzende Abbildungen



**Abb. 19: Lebensfähigkeit von Medulloblastomzellen nach Behandlung mit dem ATR-Inhibitor VE-822.**

UW228-2- und HD-MB03-Medulloblastomzellen wurden für 72 h einer Behandlung mit dem ATM/ATR-Inhibitor VE-822 ausgesetzt. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels des Alamar Blue-Assays bestimmt. Die gezeigten Ergebnisse sind als lebensfähige Zellen in Prozent der unbehandelten Kontrolle ausgedrückt, die auf 100 % normalisiert wurde. Dargestellt sind der Mittelwert + die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten (jeweils 8 Replikate pro Bedingung).

## **Danksagung**

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. G. Fritz für die Überlassung des Themas, die intensive Betreuung, die ausführliche Korrektur sowie für die gemeinsame Publikation unserer Daten danken.

Zudem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Csaba Mahotka für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein weiterer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Katharina Roquette für die tolle Einarbeitung, die immer offene Türe, die Beantwortung all meiner Fragen und die stetige Begleitung meiner Arbeit.

Zudem möchte ich mich ganz herzlich bei Lena Schumacher bedanken, die mir bei den Versuchen und vor allem bei praktischen Fragen und Aufgaben bis zuletzt mit Rat und Tat zur Seite stand.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für den enormen Rückhalt, die Motivation und die bedingungslose Unterstützung.