

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Zellbiologie
(Tumorforschung)

Die Bedeutung des SLC25A1 Tricarboxylat-Carriers für die DNA Reparatur und Strahlenresistenz

I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin

durch die Medizinische Fakultät

der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von

Christian Kalthoff

aus Iserlohn

2022

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/78126

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20230511-074040-6

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter/in: Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. V. Jendrossek
2. Gutachter/in: Herr Prof. Dr. med. Ch. Pöttgen

Tag der mündlichen Prüfung: 23. März 2023

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Bedeutung der Strahlentherapie	6
1.2	Problematik der Strahlenresistenz	7
1.3	Der SLC25A1 Citratcarrier	8
1.4	DNA-Reparatur	12
2	Fragestellung der Arbeit	18
3	Material und Methoden	20
3.1	Material	20
3.1.1	Chemikalien, Reagenzien und Buffer	20
3.1.2	Zellkultur	21
3.1.3	Geräte	21
3.1.4	Lösungen	23
3.1.4.1	FACS	23
3.1.4.2	Koloniebildungsassay	23
3.1.4.3	Western Blot	23
3.1.5	Kits	25
3.1.6	Wirkstoffe	25
3.1.7	Verbrauchsmaterialien	25
3.1.8	Antikörper	26
3.1.8.1	Primäre Antikörper	26
3.1.8.2	Sekundäre Antikörper	26
3.1.9	Zelllinien	27
3.1.10	Software	27
3.2	Methoden	28
3.2.1	Zellkultur	28
3.2.1.1	Kultivierung von Zellen	28
3.2.1.2	Splitten und Medium-Wechsel	29
3.2.1.3	Konservierung von Zellen	29
3.2.1.4	Auftauen von Zellen	29
3.2.1.5	Behandlung von Zellen	30
3.2.1.5.1	Zellzählung	30
3.2.1.5.2	Wirkstoffbehandlung	30
3.2.1.5.3	Bestrahlung der Zellen	31

3.2.2	Quantifizierung der Zellviabilität	31
3.2.3	Durchflusszytometrie	32
3.2.3.1	Bestimmung ROS-positiver Zellen (DHE Färbung)	33
3.2.3.2	Bestimmung apoptotischer Zellen (sub G1 Fraktion).....	33
3.2.3.3	Bestimmung toter Zellen.....	34
3.2.4	Fluoreszenzmikroskopie	34
3.2.4.1	Vorbereitung der Zellen für die Fluoreszenzfärbung	34
3.2.4.1.1	Färbung der Zellen für γ H2AX-foci	35
3.2.4.1.2	Färbung der Zellen für Rad51-foci und kombinierte Färbung mit γ H2AX	35
3.2.5	Messung der D2-Hydroxyglutarate Bildung	36
3.2.6	Bestimmung des Langzeitüberlebens mittels Koloniebildungsassay (CFA)	38
3.2.6.1	Direktes Plattieren.....	38
3.2.7	Western Blot Analyse	39
3.2.8	Statistische Auswertung	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Verifizierung der BTA-induzierten Effekte auf der Ebene von SLC25A1	41
4.1.1	Effekt der CTPi2 Inhibition auf die Zellvitalität und Zellproliferation	41
4.1.2	CTPi2 induzierte Effekte auf den Zelltod, ROS-Bildung und Apoptose	42
4.1.3	Behandlung mit CTPi2 induzierte eine Akkumulation von D2HG	44
4.1.4	Auswirkungen der SLC25A1 Inhibition auf die DNA-Reparatur	46
4.2	Überprüfen der bisherigen Erkenntnisse in genetisch veränderten Zelllinien	50
4.2.1	Einfluss der SLC25A1 Inhibition mit CTPi2 auf die D2HG Produktion in isogenen MEF Zelllinien mit Defekten in Haupt-DNA-Reparaturwegen	50
4.2.2	Effekte einer CTPi2 Behandlung auf die ROS-Produktion, den Zelltod und die Apoptosefraktion bei gentechnisch veränderten MEF-Zelllinien.....	51
4.2.3	Auswirkungen der SLC25A1 Inhibition auf die Zellviabilität von genetisch veränderten Zellen	53
4.2.4	Verringerung des Langzeitüberlebens der Zellen nach vorheriger SLC25A1 Inhibition	54
4.2.5	Einfluss der Behandlung von gentechnisch veränderten MEF Zellen mit spezifischen Inhibitoren des EJ-Signalweges auf die DNA-Reparatur	55
4.3	Die Erzeugung einer synthetischen Letalität	57
4.3.1	Auswirkungen einer kombinierten Therapie von durch SLC25A1-Inhibition erzeugten HRR-Defizienz und der Applikation von EJ-Inhibitoren auf die	

Kinetik der γH2AX-foci in Tumorzellmodellen der NSCLC (A549, NCI-H460) und GBM (T98G und U87MG)	58
4.3.2 Auswirkungen von kombinierter Inhibition von SLC25A1 und PARP bzw. DNA-PK auf das Überleben der Zellen.....	61
4.4 Inhibition von SLC25A1 zur Sensibilisierung gegenüber der Bestrahlung mit Protonen.....	64
4.4.1 Auswirkungen auf das Langzeitüberleben der Zellen bei Nutzung eines Protonenstrahls und einer Vorbehandlung mit CTPi2.....	65
4.4.2 Auswirkungen der Kombination von CTPi2 mit Protonentherapie auf die DNA-Reparatur.....	68
5 Diskussion	74
5.1 Sensibilisierung der Tumorzelllinien für die Bestrahlung durch Inhibition von SLC25A1.....	75
5.2 Therapeutische Möglichkeiten zur Strahlensensitivierung über die metabolische Induktion einer HRR-Defizienz	80
5.3 Verstärkte Strahlensensitivität nach Bestrahlung mit Protonen	81
6 Zusammenfassungen.....	84
6.1 Deutsche Zusammenfassung	84
6.2 Englische Zusammenfassung	85
7 Verzeichnisse	86
7.1 Literaturverzeichnis.....	86
7.2 Abkürzungsverzeichnis.....	99
7.3 Tabellenverzeichnis.....	103
7.4 Abbildungsverzeichnis.....	104
8 Lebenslauf.....	107

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der Strahlentherapie

Die Strahlentherapie gilt neben der Chemotherapie als eine der beiden Grundsäulen der modernen Tumorbehandlung (Baskar et al., 2014). Über 50% aller Tumorpatienten erhalten eine Strahlentherapie als Komponente ihrer Behandlung (Delaney et al., 2005). Dabei ist die Anwendung der Therapiemöglichkeiten sehr breit gefächert. Die Strahlentherapie kann sowohl nach einer operativen Entfernung des Tumors angewandt werden, um makroskopisch nicht sichtbare Zellverbände zu entfernen (adjuvante Strahlentherapie), als auch vor einer geplanten operativen Resektion, um die Tumormasse so zu verringern, dass eine Resektion überhaupt erst ermöglicht bzw. die postoperative Überlebenswahrscheinlichkeit verbessert wird. Die Anwendung der Strahlentherapie ist dabei jedoch nicht nur kurativ, sondern häufig auch palliativ, um Patienten mit aggressiv wachsenden Tumoren zumindest eine gewisse Symptomlinderung und damit auch eine verbesserte Lebensqualität zu ermöglichen (Durante and Loeffler, 2010; Guadagnolo et al., 2013). Die Nutzung der Strahlentherapie basiert auf dem Prinzip, dass Krebszellen, verglichen mit gesunden Zellen, eine deutlich erhöhte Proliferation zeigen und damit auch deutlich anfälliger für Schäden in ihrer DNA sind (Bernier et al., 2004). Wenn ein Tumor im Rahmen einer Strahlentherapie behandelt wird, wird das Erbgut der Zellen in Form der Desoxynukleotidsäure (DNA) geschädigt und es kommt zu einer Arretierung des Zellzyklus sowie, bei einer ineffizienten Reparatur der induzierten Schäden, zum Zelltod (Baskar et al., 2008; Elledge, 1996). Die Schäden äußern sich dabei in Einzel- (SSB) und Doppelstrangbrüchen (DSB), die entweder direkt, durch eine Ionisierung des Phosphat-Rückgrats der DNA, entstehen (Mariotti et al., 2013), oder durch eine indirekte Schädigung, welche bis zu 60% des strahleninduzierten Schadens ausmacht (Barcellos-Hoff et al., 2005). Bei der indirekten Schädigung werden Wassermoleküle in den bestrahlten Zellen ionisiert und so in Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) umgewandelt (Yamamori et al., 2012). Diese ROS versetzen das umliegende Gewebe als freie Radikale in oxidativen Stress, was wiederum zu DNA-Schäden in Form von SSB und DSB führt (Lieber, 2010).

1.2 Problematik der Strahlenresistenz

Die Strahlenresistenz, welche für einige Tumorarten charakteristisch ist, gestaltet sich dadurch problematisch und erschwert eine erfolgreiche Therapie. Hierbei kann man grob zwischen zwei Arten der Resistenzbildung unterscheiden: Die erworbenen und die genetisch bedingten Resistenzen. Herrscht in einem Tumor Sauerstoffmangel, Hypoxie genannt, können sich die Krebszellen diesem anpassen, um ihr eigenes Überleben zu verbessern (Horsman et al., 2012). Es zeigte sich, dass die Tumorphypoxie sehr heterogen verteilt sein kann, mit Regionen mit einer Sauerstoffverfügbarkeit von <5% (leichte Hypoxie) bis <0,5% (schwere Hypoxie) oder sogar <0,01% O₂ (Anoxie). Die Tumorphypoxie ist hinsichtlich ihrer Dauer (kurz- bis langfristig) und ihres zeitlichen Ablaufs (vorübergehend, chronisch oder intermittierend) hochdynamisch und schwankt auch regional, was vor allem auf die Instabilität und chaotische Organisation der Tumervaskularisation zurückzuführen ist (Lee et al., 2014; Ljungkvist et al., 2007; Matsamoto et al., 2010; Vaupel and Harrison, 2004). Eine Anpassung an eine Hypoxie und Reoxigenierung führt innerhalb der Zellen zu einer gesteigerten Kapazität des antioxidativen Systems, reduziert somit das Level der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und führt zu einer reduzierten ROS-vermittelten Zellschädigung (Matschke et al., 2016; Nakashima et al., 2017; Rouschop et al., 2013). Diese erworbene Fähigkeit der besseren Kontrolle von ROS führt bei einer Radiotherapie jedoch auch zu einer erhöhten Resistenz gegenüber den eingesetzten Strahlen, da diese unter anderem auch über die Induktion der ROS Level Schaden an den Krebszellen verursachen (Brown and Wilson, 2004). Die zytotoxische Wirksamkeit der Strahlentherapie hängt nicht nur von der Fähigkeit ab, mit DNA-Schäden umzugehen, sondern auch von der richtigen Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und damit auch direkt von der lokalen Verfügbarkeit von molekularem Sauerstoff (O₂) im Tumorgewebe während der Behandlung. Folglich verleiht eine Senkung des O₂-Spiegels, bis hin zur Tumorphypoxie, durch unzureichendes O₂-Angebot, erhöhter O₂-Bedarf oder beides eine direkte Resistenz, indem der oxidative Stress und die therapieinduzierte Zellabtötung verringert werden (Bristow et al., 2008). So ist es nicht überraschend, dass die Fähigkeit von Krebszellen, mit oxidativem Stress umzugehen, eine weitere Determinante der Strahlenempfindlichkeit von Krebszellen ist und dass eine Hochregulierung des zellulären antioxidativen Abwehrsystems während der malignen Progression zu einer erhöhten Strahlenresistenz beitragen kann (Matschke

et al., 2019; Nakashima et al., 2017; Rouschop et al., 2013). Ein solch erzeugter Selektionsdruck innerhalb der Zellen kann jedoch nicht nur über Strahlen, sondern auch über eine Chemotherapie erzeugt werden. Es wurde bereits gezeigt, dass eine Umprogrammierung des Metabolismus innerhalb der Tumorzellen eben diesen hilft, in den veränderten bioenergetischen Bedingungen zu überleben, welche zum Beispiel durch schwankende Sauerstoff-Konzentrationen erzeugt werden (Matschke et al., 2016). Unserer Arbeitsgruppe hat eine veränderte Nutzung von Glutamin über die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT1) für die Produktion von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH), welches seinerseits für die Reduktion von Glutathion und damit unmittelbar für die Regeneration des Antioxidanten Systems verwendet wird, herausgestellt. Diese Vorarbeiten stehen im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Matschke et al., 2016; Nakashima et al., 2017; Rouschop et al., 2013). Das ist vor allem dahingehend interessant, da eine Überexpression oder aktivierte Mutation der GOT1 häufig in Tumorarten gefunden werden, die strahlenresistent sind, wie das Brust-, Pankreas- und Nicht-kleinzellige-Lungenkarzinom (Matschke et al., 2016; Chakrabarti, 2015). Alternativ zu den durch Selektionsdruck entstandenen Resistenzen gibt es auch solche, die durch genetische Veränderungen hervorgerufen werden. So kann ein genetischer Defekt in den Zellen, deren DNA-Reparatur verbessern oder auch verschlechtern, aber auch Resistenzen gegen ROS deutlich erhöhen. So zeigte Chakrabarti (2015) ebenfalls, dass es eine Assoziation zwischen KRAS Mutationen und der Expression von ME1 und GOT in NSCLC-Krebszellen gibt. Eine durch die Mutation ausgelöste Erhöhung der ME1- und GOT-Expression zeigte bei der Betrachtung der Überlebenskurven der Patienten nach Strahlenbehandlung einen signifikanten Abfall im Vergleich zu der Gruppe ohne eine erhöhte Expression (Chakrabarti, 2015).

1.3 Der SLC25A1 Citratcarrier

Eine weitere enge Verknüpfung zwischen den adaptiven Veränderungen des Tumormetabolismus und der Produktion von ROS findet sich bei dem mitochondrialen Citratcarrier SLC25A1. Dieser Transporter wird von dem gleichnamigen Gen *SLC25A1* codiert und befindet sich auf dem Chromosom 22 im Bereich 22q11.2 (Iacobazzi et al., 1997). Der in der inneren mitochondrialen Membran gelegene Transporter dient vor allem dem elektronenneutralen Austausch von Citrat aus der mitochondrialen Matrix gegen

Malat aus dem Cytosol (Nicholls, 2010). Auf das Oxalacetat wird nun mittels Citrat-Synthase eine Acetylgruppe eines Acetyl-CoA übertragen, während das CoA abgespalten wird. So wird aus Malat wieder Citrat, das das Mitochondrium über den Citratecarrier verlässt (Abb. 1). Der Citratexport aus dem Mitochondrium ins Cytosol wird durch den Citratcarrier SLC25A1 ermöglicht und zeigt somit eine Verbindung zum Energiemetabolismus, der mitochondrialen Redox Homöostase als auch der Biosynthese verschiedener Metabolite (Catalina-Rodriguez et al., 2012; Hlouschek et al., 2018; Majd et al., 2018). Intramitochondriales Citrat sowie das durch den Transporter ins Mitochondrium aufgenommene Malat werden im Rahmen des Citratzyklus oxidiert und zur Energiegewinnung in Form von Adenosintriphosphat (ATP) weiterverwendet (Sun et al., 2010; Catalina-Rodriguez et al., 2012). Das cytosolische Citrat wiederum inhibiert die Glykolyse über allosterische Inhibition der Phosphofruktokinase-1 (PFK1) oder wird in Acetyl coenzyme A (Acetyl-CoA) umgewandelt (Newsholme et al., 1977; Srere, 1959). Acetyl-CoA wird für die Synthese von Ubiquitinen, Fettsäuren und des Steroidgerüsts benötigt (Grünler et al., 1994; Watson and Lowenstein, 1970). Eine Inhibition des SLC25A1 beeinflusst mehrere zelluläre Vorgänge wie z.B. die Membranfunktion und Membranbildung und sogar die Hormonhomöostase. Insbesondere unterstützt SLC25A1 zusammen mit der mitochondrialen Isocitrat Dehydrogenase 2 (IDH2) und zusammen mit der cytosolischen IDH1 die Redoxhomöostase und die damit verbundene Produktion von NADPH, welches zur Reduktion vom oxidiertem Glutathion und somit zur Reduktion von ROS beiträgt (Jiang et al., 2016; Hlouschek et al., 2018). Die Bedeutung von SLC25A1 zeigt sich auch in anderen medizinischen Bereichen. So haben bereits Prasun et al. (2014) einen Zusammenhang zwischen einer SLC25A1 Defizienz und verschiedenen Krankheitsbildern wie z.B. der epileptischen Enzephalopathie oder respiratorischer Insuffizienz herausstellen. Wie wichtig SLC25A1 ist, zeigt sich auch in den massiven Veränderungen, die eine Defizienz in diesem Gen für den Metabolismus bedeutet. In SLC25A1 defizienten Zellen kommt es zu tiefgreifenden Umstrukturierungen im zentralen Kohlenstoffstoffwechsel, einschließlich der

Unterdrückung der Pyruvatdehydrogenase und der Induktion einer glukoseabhängigen Anaplerose durch die Pyruvatcarboxylase (Jiang et al., 2017).

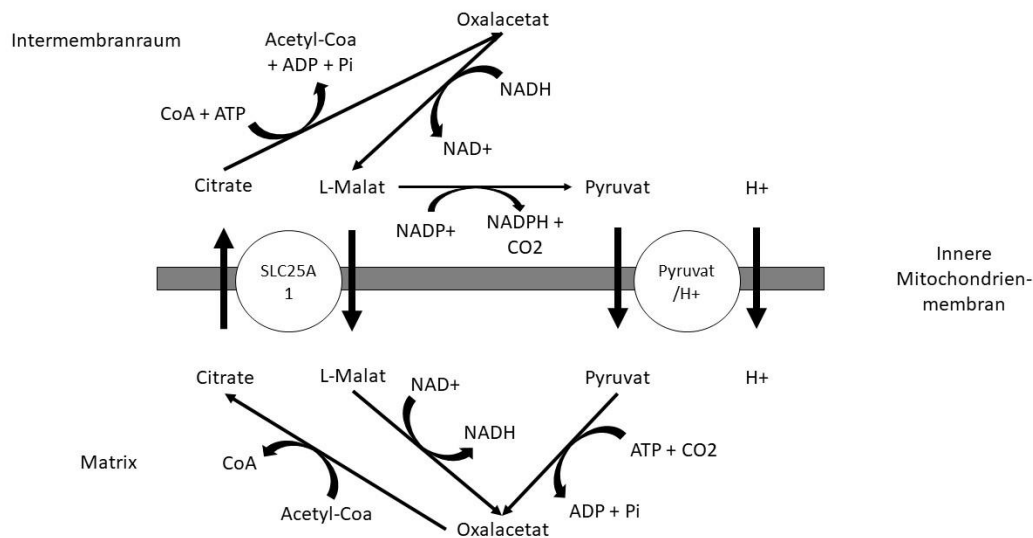


Abbildung 1 Schematische Darstellung des Citrat-Metabolismus im Mitochondrium und Cytosol und Austausch über den Citrat Transporter SLC25A1. Das Citrat wird im Antiport gegen Malat aus der Matrix ins Cytosol gebracht. Dort wird es über Oxalacetat unter Erzeugung von NAD⁺ zu Malat reduziert. Das Malat kann dann entweder wieder über den Citrat-Carrier in die mitochondriale Matrix gelangen oder wird zu Pyruvat oxidiert. Auch Pyruvat kann die Membran mittels Pyruvat/H⁺ Sympoter überwinden, wo es über die Pyruvat-Carboxylase erneut in Oxalacetat umgewandelt wird.

Eine erhöhte Expression des *SLC25A1* Gens wurde bereits in Tumorzellen gefunden und als Folge einer Anpassung an oxidativen und respirativen Stress vermutet (Catalina-Rodriguez et al., 2012). Ebenfalls wurde von einem vorherigen Promotionsstudenten in meiner Arbeitsgruppe aber auch von anderen gezeigt, dass eine Inhibition des SLC25A1 Transportproteins mit einer erhöhten Strahlensensitivierung in Lungenkrebszellen einhergeht (Fernandez et al., 2018; Hlouschek et al., 2018). Durch die direkte Auswirkung von SLC25A1 auf den Tumormetabolismus und die Redox-Homöostase stellt SLC25A1 ein mögliches Ziel für eine tumorspezifische Therapie dar. Erste positive Ergebnisse für einen Tumor-hemmenden Effekt, sowie keine bislang nachweisbaren toxischen Auswirkungen auf SLC25A1 exprimierendes Normalgewebe, untermauern diese These (Catalina-Rodriguez et al., 2012; Hlouschek et al., 2018). Die große Bedeutung von SLC25A1 zeigt sich aber auch klinisch, wenn man Patienten mit Nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom und hohen Expressionen des Citrattransporters denen

mit einer geringen Expression gegenüberstellt (Hlouschek et al., 2018). Dabei wird deutlich, dass eine hohe Expression von SLC25A1 signifikant mit einem deutlich geringeren Überleben der Patienten korreliert (Hlouschek et al., 2018). Dies wird noch einmal deutlicher, wenn man die gleiche Untersuchung mit Patienten durchführt, welche eine Operation durchführen ließen, bei denen der Tumor bis ins gesunde Gewebe hinein entfernt werden konnte, eine sogenannte R0-Resektion (Abb. 2) (Hlouschek et al., 2018). Zusammenfassend stellt SLC25A1 über den Export von Citrat aus der Matrix ins Cytosol eine wichtige Verbindung der beiden Energiestoffwechselwege (oxydative Phosphorylierung und Glykolyse) sowie der antioxidativen Kapazität der Zelle dar. Sowohl der Energiemetabolismus als auch die antioxidative Kapazität gelten als wichtige Determinanten der Strahlenantwort. Zusätzliche Überexpression des SLC25A1 Transporters in Tumorzellen machen den Citratcarrier zu einem attraktiven Zielmolekül für eine Radiosensitivierung.

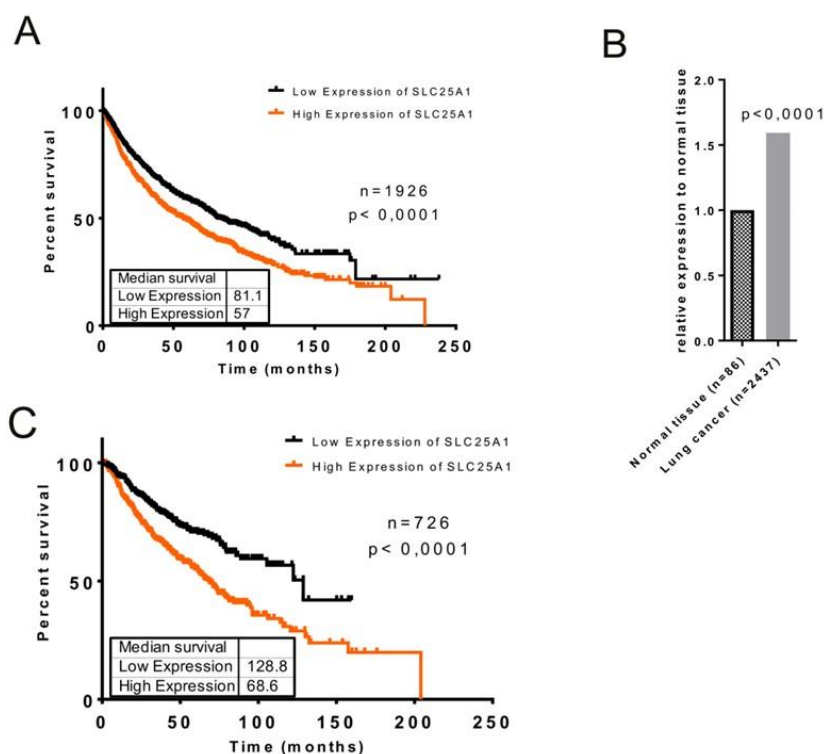


Abbildung 2 Patientenüberleben in Abhängigkeit der Expression von SLC25A1.

(A) Gesamtüberleben der Patienten mit Lungenkarzinom, (B) Relative Expression von SLC25A1 in gesundem bzw. Tumorgewebe, (C) Gesamtüberleben nach R0-Resektion des Tumorgewebes (Hlouschek et al., 2018).

1.4 DNA-Reparatur

Wie bereits oben erwähnt, induziert die Strahlentherapie die für die Zelle toxischen DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) (Mladenov et al., 2011; Schipler and Iliakis, 2013). Die menschlichen Zellen benutzen primär zwei verschiedene Wege für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, wenn diese z.B. durch Strahlung entstanden sind. Dabei handelt es sich zum einen um die fehleranfällige Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) und die fehlerfreie Homologe Rekombination (HRR) (Abb. 3). Ursprünge für DNA-Schäden sind dabei jedoch vielseitig und können auch chemisch oder durch Fehler in der DNA Replikation entstehen (Mahaney et al., 2009).

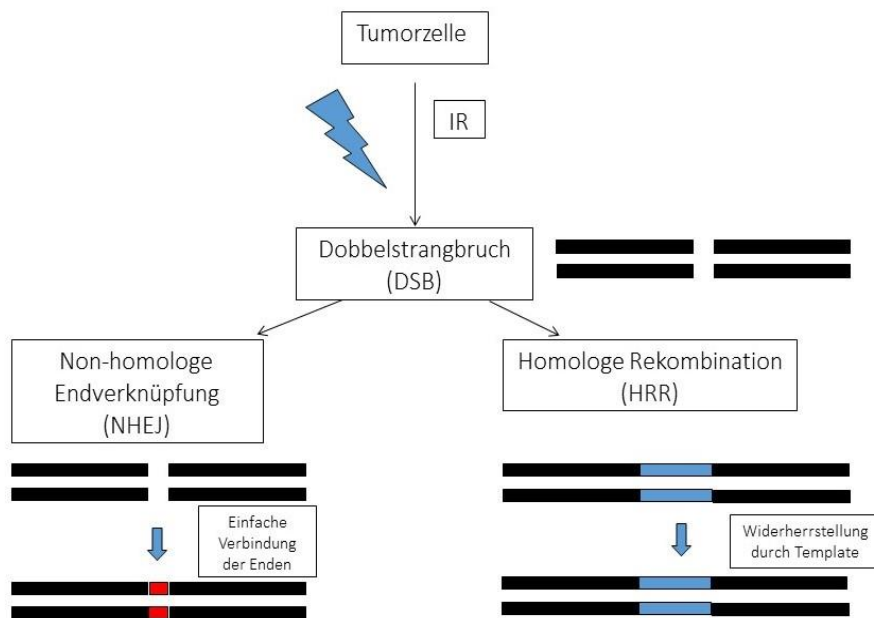


Abbildung 3 Schematische Darstellung von den zwei Hauptwegen der DNA-Reparatur in einer Tumorzelle nach Bestrahlung (IR).

Durch die Bestrahlung entstehen Doppelstrangbrüche in der DNA der Tumorzellen. Diese werden dann primär durch die Nicht-homologe Endverknüpfung oder die Homologe Rekombination repariert.

Insgesamt haben sowohl die Reparatur mittels NHEJ als auch die Reparatur durch die HRR Vor- als auch Nachteile. So ist die NHEJ vor allem schnell und kann zu jedem Zeitpunkt des Zellzyklus eingesetzt werden (Lieber, 2008). Da hier kein komplementärer DNA Strang als Template genutzt wird und die losen Enden lediglich direkt verbunden

werden, ist diese Art der Reparatur jedoch sehr anfällig für kleinere Insertionen, Deletionen oder sogar Translokationen (Varga and Aplan, 2005). Die NHEJ beginnt schon wenige Sekunden nach Entstehung des Doppelstrangbruchs. Das Heterodimer Ku70/Ku80, welches in hoher Konzentration im Zellkern vorliegt, bindet mit hoher Affinität an die offenen Enden der DNA.

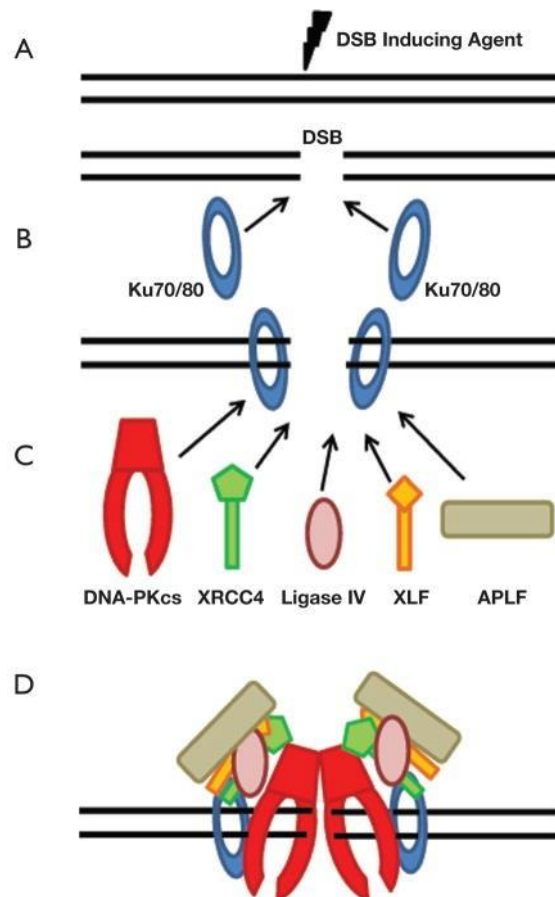


Abbildung 4 Verknüpfung durch NHEJ.

(A) Entstehung des DSB, (B) Anlagerung des Ku70/80 Heterodimers, (C) Anlagerung der verschiedenen Faktoren, (D) Verknüpfung der freien Enden mithilfe der vorher entstandenen Komplexes. Modifiziert nach (Davis and Chen, 2013).

Dieser KU:DNA-Komplex dient als Bindungsstelle für weitere Faktoren wie z.B. Serin/Threonin-Proteinkinase DNA-PKcs, XRCC4 und DNA-Ligase IV (s. Abb. 4) (Lieber, 2008; Davis and Chen, 2013). Ligase IV stellt dabei eine ATP-anhängige DNA-Ligase dar. Diese wird benötigt, um die kovalente Bindung zwischen den DNA-Enden

mittels einer Phosphodiesterbindung zu katalysieren (Timson et al., 2000). XRCC4 zeigt über eine Wechselwirkung mit der Ligase IV jedoch auch eine rekrutierende Funktion für den DSB (Wu et al., 2009). Darüber hinaus rekrutiert der KU:DNA-Komplex die Polymerasen μ und λ , welche ebenfalls für die Verarbeitung der DNA-Enden benötigt werden (Ma et al., 2004). Gerade die Fähigkeit zur Template-unabhängigen Synthese, welche die Polymerase μ mit sich bringt, ist von großer Bedeutung für die NHEJ (Domínguez et al., 2000). Dabei hängt sowohl die Zusammensetzung als auch die Reihenfolge der Komponenten stark von der Art des DSB ab und kann dadurch variieren (Davis and Chen, 2013; Mari et al., 2018). Im vorletzten Schritt werden nun noch Hydroxyl- und Phosphatgruppen modifiziert, welche die Verbindung sonst blockieren würden und einige Nukleotide entfernt. Die dafür zur Verfügung stehenden Exo- und Endonukleasen werden durch einen Komplex aus Artemis und DNA-PKcs phosphoryliert und somit aktiviert (Bernstein et al., 2005). Im letzten Schritt können nun mithilfe des XLF:XRCC4:Ligase IV-Komplexes die offenen Enden verknüpft und damit die NHEJ abgeschlossen werden. Dabei übt die Ligase IV die eigentliche Ligase-Aktivität aus, während XLF und XRCC4 mehr strukturelle Funktionen ausführen (Ahnesorg et al., 2006; Critchlow et al., 1997). XLF und XRCC4 formen über stabile Homodimere, als Zwischenschritt, superhelikale Filamente, welche die DNA-Enden in die richtige Position für die Ligation bringen (Ahnesorg et al., 2006; Andres et al., 2012).

Im Gegensatz zur NHEJ kann die HRR nur während der späten S- oder der G2-Phase benutzt werden. Dieser Umstand besteht, da diese Reparaturmethode das Schwester-Chromatid als Template benötigt und nur während dieser Phasen eine ausreichende räumliche Nähe zwischen beiden Chromatiden besteht (Sonoda et al., 2006). Dabei erkennt der Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN)-Komplex den Doppelstrangbruch, bindet daran und initiiert so den Weg für die HRR (Paull and Gellert, 1999). Anschließend führt Mre11 zusammen mit der Endonuklease CtIP die erste Resektion der DNA-Enden am Doppelstrangbruch durch (Cannavo and Cejka, 2014; Mimitou and Symington, 2009). Grundsätzlich kann man die HRR in drei Phasen unterteilen (Heyer et al., 2010). Die erste Phase ist die Pre-Synapsis. Diese Phase dient der Herstellung eines 3'-Überhangs. Dafür wird zum einen der aus vier Nukleasen bestehende MRN-Komplex benötigt, zum anderen ein Komplex aus zwei Helikasen, welcher die beiden Gabeln des Doppelstrangs offenhält. Das Protein RPA dient unterdessen der Stabilisierung der DNA (Chen and Wold, 2014;

Hass et al., 2012), um die Ausbildung von Sekundärstrukturen an den nun einzeln liegenden Strängen zu verhindern. Da RPA jedoch auch die Bindung von Rad51 inhibiert, werden Mediatorproteine, wie z.B. BRCA 2, benötigt, welche es Rad51 erlauben, auch dort zu binden, wo RPA gebunden ist (Heyer et al., 2010) und dieses anschließend zu ersetzen (Jensen et al., 2010; Ma et al., 2017). Anschließend beginnt die zweite Phase mit der sogenannten Synapsis. In dieser sucht Rad51 gezielt nach der passenden Sequenz zum zuvor erstellten 3'-Überhang und interagiert mit Rad54, um den sogenannten Displacement-loop zu bilden (Petukhova et al., 1998; Raschle et al., 2004). Diese Vorbereitung für die DNA-Synthese benötigt das Rad54-Motorprotein sowohl für die Stabilisierung als auch für den Übergang von DNA-Stranginvasion in DNA-Synthese (Heyer et al., 2010; Raschle et al., 2004). In der abschließenden Post-Synapsis, der dritten Phase, kann die Reparatur nun entweder über die Doppelstrangbruch-Reparatur (DSBR) oder die Synthese-abhängige Strang-Verknüpfung (SDSA) beendet werden, welche jedoch beide Polymerase δ benötigen (s. Abb. 5) (Maloisel et al., 2008; Sung and Klein, 2006).

Vor allem klinisch sind diese beiden Reparaturmechanismen von großem Interesse. So wurden z.B. in Mammakarzinomen bei fast drei Viertel der untersuchten Proben eine Mutation im BRCA1 und BRCA 2 Gen gefunden (Knijnenburg et al., 2018). Durch diese Mutation wird ein wichtiger Tumorsuppressor nicht mehr korrekt kodiert, welcher gemeinsam mit dem BRCA 2- und RAD51-Genen eine wichtige Rolle bei der HRR-vermittelten DNA-Reparatur spielt. Die entsprechenden Tumorzellen sind daher durch eine Defizienz in der HRR charakterisiert, die auch als „BRCA-ness“ oder „HR-ness“ bezeichnet wird.

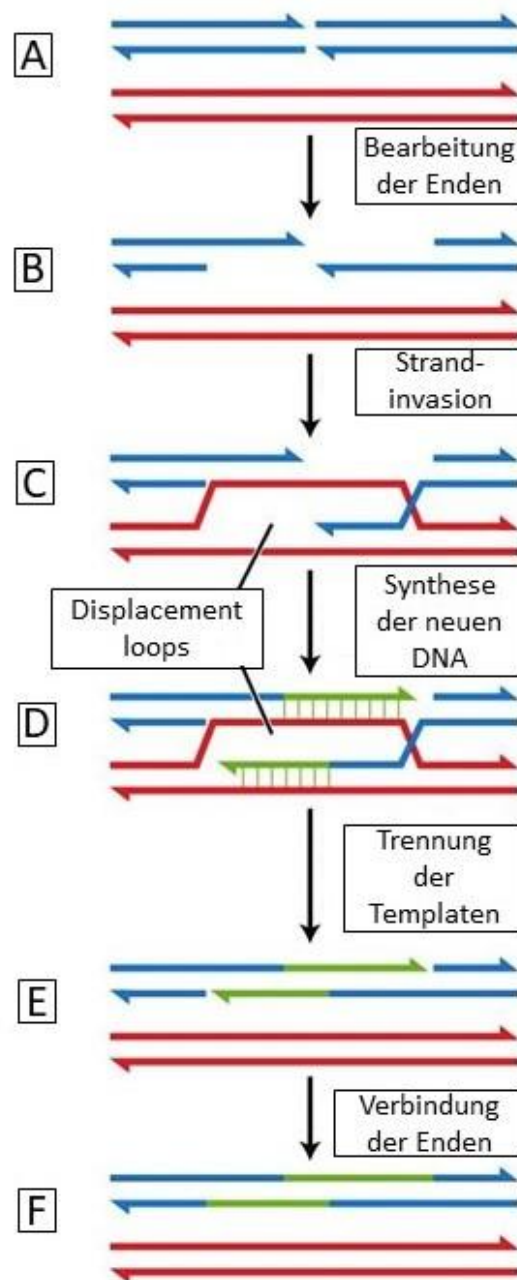


Abbildung 5 Schematische Darstellung der HRR.

(A) Beschädigter DNA Doppelstrang (blau) und Schwester Strang (rot), (B) Vorbereitung der Enden während der Pre-Synapsis, (C) Induzierung des D-loops durch Rad51, (D) Synthese der neuen DNA komplementär zum Schwesterstrang, (E) Auflösung der Loops und Trennung beider Stränge, (F) Verbindung der neu synthetisierten DNA mit den Enden der zuvor beschädigten DNA. Modifiziert nach Freeman et al., 2008.

Dies führt zu dem, dass Schäden durch Bestrahlung oder auch durch falsch abgelaufene Mitosen nicht mehr durch die HRR repariert werden, sondern die Zelle auf die NHEJ zurückgreifen muss und so die Gefahr für eine Entartung deutlich ansteigt.

Zum anderen bietet diese genetische Mutation der HRR-vermittelten DNA-Reparatur jedoch auch einen therapeutischen Angriffspunkt. So kann man diese Form der genetischen Mutation, die für die HRR-vermittelten DNA-Reparatur wichtiger Gene, bei Tumorerkrankungen zum Beispiel mit Inhibitoren des Endverknüpfungs (EJ)-DNA-Reparaturweges, z.B. PARP- oder DNA-PK-Inhibitoren, verbinden. Der Effekt von PARP-Inhibitoren wurde bereits mit der Induktion einer Störung bei der Basenexzisionsreperatur beschrieben, welche z.B. nach einem DNA-Einzelstrangbruch benötigt wird (Caldecott et al., 1996). Interessanterweise erhöhen solche krebszellspezifischen Veränderungen in einem DSB-Kernreparaturprotein die Anfälligkeit der Zellen für Medikamente, die in die entsprechenden alternativen DSB-Reparaturwege eingreifen und dieser Effekt kann noch verstärkt werden, wenn solche Medikamente mit DNA-Schaden induzierenden Behandlungen, wie z.B. Strahlentherapie oder genotoxischer Chemotherapie, kombiniert werden (Pilié et al., 2018; Lord & Ashworth, 2018; Turner et al., 2004). Das zugrundeliegende Konzept der synthetischen Letalität war für Tumoren mit Funktionsverlustmutationen in den HR-Genen BRCA1 oder BRCA2 entwickelt worden (Lord & Ashworth, 2018; Turner et al., 2004). BRCA-mutante Tumoren weisen Defekte in der HR-Reparatur auf („BRCAness“ oder „HRness“) und dies ist synthetisch tödlich durch die Hemmung von Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP)-abhängigen DNA-Reparaturwegen, wie z.B. der Nicht-homologen Endverknüpfung, unter Verwendung von PARP-Inhibitoren (Pilié et al., 2018; Lord & Ashworth, 2018; Turner et al., 2004). Krebszellen können jedoch auch Resistenzen gegen Behandlungen mit DNA-Reparatur-Inhibitoren entwickeln, was die Notwendigkeit neuartiger therapeutischer Ansätze zur Verhinderung oder Überwindung von Resistenzen und die Notwendigkeit der Identifizierung und Validierung robuster Biomarker, die das Ansprechen oder die Resistenz auf Inhibitoren der DNA-Schadensantwort und DNA-Reparatur vorhersagen, unterstreicht (Knijnenberg et al., 2018; Pilié et al., 2018).

2 Fragestellung der Arbeit

Vorherige Studien zeigen verschiedene Effekte auf Tumorzellen wie Nicht-kleinzellige Lungenkarzinome, wenn man bei diesen Zellen den SLC25A1 Transporter inhibiert. Dabei zeigte sich eine Erhöhung des zytotoxischen Effektes auf die Krebszellen, wenn einer Strahlentherapie eine Vorbehandlung mit dem 1,2,3-Benzotriazol (BTA) Wirkstoff vorausgeht. Diese Effekte äußerten sich in Form von erhöhten ROS Leveln, einer Ansammlung des Onkometabolites D2-Hydroxyglutarat (D2HG), welches auch durch eine gain-of-function Mutation der IDH1/2 entsteht (Dang et al., 2009), sowie einem reduzierten Zellüberleben in Kombination mit Strahlentherapie (Hlouschek et al., 2018). D2HG ist ein kompetitiver Inhibitor der α -ketoglutarat abhängigen Dioxygenase, von welcher wiederum einige wichtige Reparaturfaktoren für Doppelstrangbrüche abhängig sind (Xu et al., 2011; Young et al., 2013; Xiang et al., 2020). Eine Erhöhung des D2HG Levels trägt so zu einer reduzierten Fähigkeit der Zelle bei, DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) mithilfe der homologen Rekombination (HR)-vermittelten DNA-Reparatur zu reparieren (Sulkowski et al., 2017; Sulkowski et al., 2020). Diesen Arbeiten folgend ist es Ziel dieses Projektes, die molekularen Mechanismen der SLC25A1-regulierten Inhibition der HRR-vermittelten DNA-Reparatur sowie deren Einfluss auf das Tumorzellüberleben nach kombinierter Behandlung mit herkömmlichen DNA-Reparaturinhibitoren und Strahlentherapie zu erforschen. Dafür sollen grundlegende Experimente wiederholt werden, um den Zusammenhang zwischen Strahlensensitivierung und SLC25A1-Inhibierung zu bestätigen. Dafür werden sowohl der deutlich spezifischere Citrat-Transport-Protein Inhibitor 2 (CTPi2) als auch eine genetische Runterregulation des Citrat-Transporters (SLC25A1) mithilfe der siRNA verwendet. Auch soll die Übertragbarkeit dieses Konzeptes auf andere Tumorentitäten getestet werden, indem zusätzlich zu den Lungenadenokarzinom-Zelllinien-Modellen (NCI-H460-Zellen) drei weitere Zelllinien, darunter ein weiteres Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (A549), als auch zwei Glioblastom-Zelllinien (U87MG, T98G) verwendet werden. Die Kurzzeit-Effekte der Inhibierung von SLC25A1 auf die Zellfunktionen (ROS-, Apoptose- und Zelltod-Level) sowie die Langzeit-Effekte auf das Zellüberleben (Koloniebildungsverhalten) werden quantifiziert. Die Effekte der SLC25A1-Inhibition auf die Reparaturkinetik von strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen (Quantifizierung der γ H2AX- foci), als auch die Effekte auf die

HRR-vermittelte DNA-Reparatur (Quantifizierung der RAD51-foci) werden zusätzlich quantifiziert. Da nach einem DSB das Histon H2AX sehr schnell von ATM oder DNA-PK zu γ H2AX phosphoryliert wird, ist dies ein zuverlässiger Marker für kürzlich erfolgte DSB (Marková et al., 2007). Die vermuteten, der SLC25A1-inhibition zugrundeliegenden Mechanismen auf die HRR-vermittelte DNA-Reparatur sollen außerdem mithilfe der isogenen Mouse Embryonen Fibroblasten mit defekter, in NHEJ-vermittelter (homologe Ligase IV knockout (-/-)) oder HRR-vermittelter (homologer Rad54 knockout (-/-)) DNA-Reparatur untersucht werden. Wenn sich ein spezifischer Effekt der SLC25A1-Hemmung auf der Ebene der HRR-vermittelten DNA-Reparatur bestätigt, wird zusätzlich untersucht, ob die SLC25A1-vermittelte Inhibition der HRR-vermittelten DNA-Reparatur (den sogenannten BRCAness-Phänotyp) eine Sensibilisierung von Krebszellen gegenüber den Poly-ADP-Ribose-Polymerasen (PARP)-Inhibitoren zeigt. PARP-Inhibitoren werden sogar bereits klinisch genutzt, da sie signifikante Verbesserungen in der Behandlung von Karzinomen zeigen, die auf Grundlage einer BRCA Mutation entstanden sind wie z.B. das Ovarialkarzinom (Liu et al., 2019). Ähnlich wie die PARP-Inhibitoren sorgen auch DNAPK-Inhibitoren für eine Störung der DNA-Reparatur durch die Endverknüpfung (EJ)-vermittelte DNA-Reparatur und sind dadurch auch für dieses Projekt von Interesse. Zuletzt wird der Effekt von CTPi2 auf die strahleninduzierten DNA-Schäden und Zellüberleben nach Behandlung mit unterschiedlichen Strahlenarten (Photonen vs. Protonen Strahlentherapie) untersucht. Die Protonentherapie bietet physikalisch die Besonderheit des Bragg-Peaks, wobei der Energieverlust im Gewebe mit der Weglänge kontinuierlich bis zum Bragg-Peak ansteigt und dann steil auf nahezu Null abnimmt, was als Möglichkeit für eine bessere Schonung des umliegenden Gewebes angesehen wird (Durante & Loeffler, 2009; Tommasino & Durante, 2015). Diese physikalischen Gegebenheiten der Protonentherapie sorgen zurzeit für zunehmende Bedeutung der Protonentherapie besonders bei kindlichen Tumoren. Aufgrund der komplexeren Form von Schäden, die durch eine Protonentherapie in der DNA hervorgerufen werden, ist die Reparatur von solchen DNA-Schäden verstärkt auf den HRR-vermittelten DNA-Reparaturweg angewiesen (Grosse et al., 2014). Somit könnte eine Kombinationstherapie der Protonenbestrahlung mit CTPi2-Behandlung eine innovative Strategie darstellen, um die Tumorzellen gegenüber der zytotoxischen Wirkung von Protonenbestrahlung zu sensitivieren.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Buffer

Acrylamid-/bisacrylamid (Gel 30)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxidsulfat 10% (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenol Blau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dihydroethidium (DHE)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Essigsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol 100%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fluoreszenz Mounting Medium	Agilent, Santa Clara, USA
Formaldehyde 37%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glutaraldehyd (1%)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Hoechst 33342	Thermo Fisher, Waltham, USA
Isopropanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kristallviolett	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat	MERCK, Darmstadt, Deutschland

Normales Ziegenserum (NGS)	Gibco, Gaithersburg, USA
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher, Waltham, USA
Paraformaldehyd (PFA)	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Phosphat gepufferte Lösung (PBS)	Gibco Life Technologies
Propidiumiodid (PI)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Block	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

3.1.2 Zellkultur

CASYton	Omni Life Science, Bremen, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Gaithersburg, USA
Fetales Kalbsserum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphat gepufferte Lösung (PBS)	Gibco, Gaithersburg, USA
RPMI1640	Gibco, Gaithersburg, USA
Trypsin (0,05% EDTA)	Biochrom, Berlin, Deutschland

3.1.3 Geräte

3D Gyro-Rocker SSL3	Stuart Equipment, Staffordshire, UK
Analysewaage ABS120-4N	Kern, Balingen, Deutschland
AxioObserver.Z1 Fluoreszenz Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland

(mit Apotome)

Biologischer Bestrahler X-RAD 320	Precision X-Ray, North Branford,
Blot imaging system Fusion Solo	Vilber, Eberhardzell, Deutschland
Blotting chamber Trans-Blot	BIO-RAD Laboratories, Hercules, USA
CASY Cell Counter & Analyzer	Omni Life Science, Bremen, Deutschland
Colony Counter GelCount	Oxford Optronix, Oxford, UK
Elektrophorese-Stromversorgung	VWR, Darmstadt, Deutschland
ELISA Reader	Synergy HT Bio-Tek
Flow Cytometer FACS Calibur	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Inkubator C200	Labotect, Göttingen, Deutschland
Laminar flow bench	BDK, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Microplate Reader Synergy HT	BioTek, Winooski, USA
Mikroskop DM IRB	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Microtiter Shaker MTS 2/4	IKA, Staufen, Deutschland
Multikanal Pipette	Eppendorf, Hamburg, Germany
Pipetten (10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe	Hirschmann, Eberstadt, Germany
Proteus Plus mit einem 230 MeV Cyclotron	IBA International, Louvain-La- Neuve, Belgium

Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Germany
Vortex Mixer Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Germany
Zentrifuge CR 4.22	Jouan SA, Saint-herblain, Frankreich
Zentrifuge Z216M	Hermle, Wehingen, Germany

3.1.4 Lösungen

3.1.4.1 FACS

DHE-Lösung	5 μ M in PBS
Nicoletti-Lösung	0,1 % Natriumcitrat 0,1 % TritonX 100 50 μ g/ml Propidiumiodid
PI-Exclusion-Lösung	5 μ g/ml PI in PBS
FACS Flow	BD Biosciences
FACS Clean	BD Biosciences
FACS Rinse	BD Biosciences

3.1.4.2 Koloniebildungsassay

3,7% Formaldehyd	
70% Ethanol	
Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung (0,05%)	20% Methanol 7,5% Essigsäure 0,05% Coomassie Blue

3.1.4.3 Western Blot

Viermal SDS sample buffer	40% Glycerol 240 mM Tris-HCl (pH 6.8)
---------------------------	--

	8% SDS
	0.04% Bromphenol Blue
	10% β -mercaptoethanol
	in H ₂ O
Gelelektrophorese 12% Laufgel	6 mL Acrylamidlösung
	3.8 mL 1.5M Tris-HCl (pH 8.8)
	0.15 mL SDS (10%)
	0.15 mL APS (10%)
	0.006 mL TEMED
	4.9 mL H ₂ O
Gelelektrophorese 5% Stapelgel	0.83 mL Acrylamidlösung
	0.63 mL 1M Tris-HCl (pH 6.8)
	0.05 mL SDS (10%)
	0.05 mL APS (10%)
	0.005 mL TEMED
	3.4 mL H ₂ O
Tris-buffered saline (TBS) (10x)	500 mM Tris
	1,5 M NaCl
	HCl bis pH 7.3
	in H ₂ O

Tris-Glycine (TG) Buffer (10x)	250 mM Tris
	2 M Glycin
	in H ₂ O

3.1.5 Kits

D2HG Assay Kit	Biovision, Zürich, Schweiz
DC Protein Assay Kit	BIO-RAD Laboratories, Hercules, USA
ECL Prime Reagent	Amersham, Little Chalfont, UK
ECL Select Reagent	Amersham, Little Chalfont, UK

3.1.6 Wirkstoffe

2-((4-chloro-3-nitrophenyl) sulfonamido)	
benzoic acid (CTPi2)	Enamine Ltd, Kyiv, Ukraine
PJ34 hydrochloride (PARP)	abcam, Cambridge, UK
DNA-PK Inhibitor (NU7441)	Tocris Bioscience, Bristol, UK

3.1.7 Verbrauchsmaterialien

1.5 mL Mikrozentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
2 mL Mikrozentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
CASYcups	Omni Life Science, Bremen, Deutschland
CELLSTAR Seroglogical Pipette (5 mL, 10 mL, 25 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
FACS Röhrchen	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

Falcon Röhren (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µL, 100 µL/200 µL, 1000 µL)	STARLAB, Hamburg, Deutschland
Polyvinylidene fluoride (PVDF) Membran	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturflaschen (T25/T75/T175)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
6-well tissue culture plate	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
12-well tissue culture plate	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
96-well cell culture plate	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

3.1.8 Antikörper

3.1.8.1 Primäre Antikörper

Ziel	Hersteller	Spezies	Verdünnung
DNA Ligase IV	Cell Signaling	Kaninchen	1:1000
PTEN	Cell Signaling	Kaninchen	1:1000
SLC25A1	Cell Signaling	Kaninchen	1:1000
β-Actin	Sigma-Aldrich	Maus	1:20000
γH2AX (Alexa Fluor 647)	BD Pharmingen	Maus	1:50
Anti-RAD51	Merck KGaA	Kaninchen	1:100

3.1.8.2 Sekundäre Antikörper

Ziel	Hersteller	Spezies	Verdünnung
Anti-Maus (HRP)	Cell Signalling	Ziege	1:20000
Anti-Kaninchen (HRP)	Cell Signalling	Ziege	1:20000

3.1.9 Zelllinien

Name	Kurzbeschreibung
A549	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC)
U87MG	Glioblastom
MEF ctrl	Mäuse Embryonen Fibroblasten
MEF Ligase IV ^{-/-}	MEF Zellen mit homologer Defizienz in dem Ligase IV Gen
MEF Rad54 ^{-/-}	MEF Zellen mit homologer Defizienz in dem Rad54 Gen
M059J	DNA-PK defiziente Glioblastomzellen
M059K	Glioblastom
NCI-H460	NSCLC
T98G	Glioblastom

3.1.10 Software

Adobe Photoshop CS3	Adobe Systems
Axio Vision LE64	Carl Zeiss
Cytometrische Analysesoftware FlowJo	FloJo Enterprise
Gel Count	Oxford Optronix
ImageJ	Wayne Rasband
Imaris - Microscopy Image Analysis Software	Oxford Instruments
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Kultivierung von Zellen

Die Aussaat, Kultivierung und ein Großteil der Vorbehandlungen der verschiedenen Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen an geeigneten Arbeitsplätzen vorgenommen. Dabei erhielt jede Zelllinie das optimale Medium (Tab. 1). Benutztes Material wurde entweder vor und nach der Benutzung autoklaviert oder es handelte sich um Einwegmaterialien, welche nach der Benutzung verworfen wurden. Dem Zellwachstum angemessen wurden die Zellen regelmäßig gesplittet und das Medium erneuert, um für die Versuchsvorhaben optimale Bedingungen in Hinsicht auf Zellzahl und Zelldichte zu erhalten.

Tabelle 1 Für die Zelllinien verwendete Medien.

Zelllinien	Erhaltenes Medium
A549	DMEM + 10% FCS + 1,5% Pen/Strep
NCI-H460	RPMI1640 + 10% FCS + 1,5% Pen/Strep
T98G	RPMI1640 + 10% FCS + 1,5% Pen/Strep
U87MG	DMEM + 10% FCS + 1,5% Pen/Strep
MEF ctrl	DMEM + 10% FCS + 1,5% Pen/Strep
MEF Rad54 ^{-/-}	DMEM + 10% FCS + 1,5% Pen/Strep
MEF Lig IV ^{-/-}	DMEM + 10% FCS + 1,5% Pen/Strep
M059K	DMEM + 10% FCS + 1,5% Pen/Strep
M059J	DMEM + 10% FCS + 1,5% Pen/Strep

3.2.1.2 Splitten und Medium-Wechsel

Um die Zelldichte und die Zellzahl im optimalen Bereich zu erhalten, benötigen die Zellen regelmäßig neues Medium. Dafür wurde das Medium aus Flaschen, in denen die Zellen am Boden adhärten, mit einer sterilen Pipette abgesaugt und die Zellen anschließend mit PBS einmal gewaschen. Auch das PBS wurde anschließend wieder abgesaugt. Entsprechend der Flaschengröße, in diesem Fall T75, wurde neues Medium hinzugegeben. Sobald die Flaschen eine optimale Zelldichte überschritten oder mehr Zellen benötigte wurden, haben wir diese gesplittet. Dafür wurde ebenfalls das Medium abgesaugt und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für kurze Zeit mit Trypsin inkubiert, um diese vom Flaschenboden abzulösen. Die Reaktion wurde mit Medium gestoppt und je nach Bedarf im Verhältnis 1:10 oder 1:20 in neue Flaschen überführt. Dort erhielten sie wiederum neues Medium entsprechend dem Verhältnis. Die Zellen wurden unter Standardzellkulturbedingungen (37 °C, 21 % O₂, 5 % CO₂) inkubiert.

3.2.1.3 Konservierung von Zellen

Um Zellen für spätere Nutzung zu konservieren, wurden diese in einem Stickstofftank eingefroren. Dafür haben wir die Zellen zuerst wie bereits beschrieben mit Trypsin vorbehandelt, um diese von dem Zellboden abzulösen. Und die Reaktion durch Zugabe von Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde anschließend für 4 min bei 1500 rpm pelletiert und dieses Pellet wiederum in RPMI bzw. DMEM + 10% FCS + 10% DMSO resuspendiert. Diese Suspension wurde in Kryogefäße überführt und zuerst über Nacht in einem Isopropanol-Einfriergefäß bei -80 °C gelagert, um langsam abzukühlen und Zellschäden zu vermeiden. Erst am folgenden Tag froren wir diese in flüssigem Stickstoff ein.

3.2.1.4 Auftauen von Zellen

Um die zuvor konservierten Zellen wieder aufzutauen, haben wir diese zunächst in einem 37°C Wasserbad erwärmt. Die Zellsuspension wurde anschließend in DMEM/RPMI + 20% FCS + 1,5% Pen/Strep aufgenommen und in Flaschen überführt. Ein Mediumwechsel auf DMEM/RPMI + 10% FCS + 1,5% Pen/Strep erfolgte nach 24 Stunden.

3.2.1.5 Behandlung von Zellen

3.2.1.5.1 Zellzählung

Um die Vergleichbarkeit der Versuche zu gewährleisten, benötigten wir stets gleiche Zellzahlen. Um diese zu ermitteln, stand uns der CASY Cell Counter zur Verfügung. Um diesen zu benutzen, wurde wiederum eine Zellsuspension aus den kultivierten Flaschen, durch Trypsinisieren und vorherigem Waschen mit PBS, erzeugt. Von dieser Suspension wurde eine 1:200 Verdünnung mit CASYton in extra dafür vorgesehenen CASY cups erzeugt. Diese wurde so im CASY Cell Counter platziert, dass eine feine Kapillare in die Suspension reichte, durch welche das Gerät über einen Unterdruck Flüssigkeit einsaugt. In dieser Kapillare wird der Widerstand gemessen, welcher durch die Zellkette erzeugt wird. Dieser korreliert direkt mit der Anzahl von Zellen mit intakter Zellmembran (vitale Zellen). Durch die Anzahl der Zellen in der 1:200er Verdünnung konnte so die Menge an Suspension errechnet werden, die für die Plattierung benötigt wurde.

3.2.1.5.2 Wirkstoffbehandlung

Je nach Experiment erfolgte eine Vorbehandlung der Zellen zwischen zwei und 24 Stunden vor Bestrahlung. Die dabei benutzten Wirkstoffe waren die in Tabelle 2 dargestellten:

Tabelle 2 Verwendete Wirkstoffe für die Vorbehandlung der Zellen

Wirkstoffname	Lösungsmittel	Eingesetzte Konzentration	Wirkmechanismus (Einsatzgebiet)
CTPi2	DMSO	200µM	Hemmung von SLC25A1
PARP Inhibitor (PJ34) von Calbiochem	DMSO	4µM	Hemmung des PARP Komplexes (NHEJ)
DNA-PK Inhibitor (NU7441) von Tocris	DMSO	2,5µM	Hemmung der DNA-Proteinkinase (NHEJ)

Nach der Behandlung wurden die Zellen wieder bis zum jeweiligen Versuch inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte oder mit dem Lösungsmittel des Wirkstoffes behandelte Zellen der gleichen Passage.

3.2.1.5.3 Bestrahlung der Zellen

Für die Bestrahlung mit Photonen benutzen wir bei Raumtemperatur eine X-RAD 320 Röntgen-Anlage bei 320 kV, 12.5 mA und einem 1,65 mm Aluminiumfilter. Der Abstand zu den Zellen betrug 50cm. Die Gesamtdosis von 0-10Gy war abhängig vom jeweiligen Experiment und wurde mit einer Rate von 3,7 Gy/Min erzeugt.

Für die Protonenbestrahlung benutzten wir das Proteus Plus mit einem 230 MeV Cyclotron von IBA International. Das bestrahlte Feld deckt eine Größe von 240x400mm² ab, wobei die Zellen sich innerhalb des Isfeldes befinden. Der Bragg peak befindet sich bei 105,5 MeV. Der Strahl verläuft durch einen 74mm dicken Range Shifter, sowie 2ml Medium bei 12- und 6-well Platten und 100µl bei 96-well Platten. Für die Planung des Bestrahlungsfeldes wurde das klinische Planungssystem benutzt. Zudem fand eine Kalibrierung des Strahls mittels 2F array detector MatriXX PT von der Firma IBA International statt, welcher sich auf derselben Höhe wie die Zellen befand.

Nach der Bestrahlung wurden die Zellen wieder bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

3.2.2 Quantifizierung der Zellviabilität

Das Kristallviolett-Assay dient der Quantifizierung der Zellviabilität, indem die Menge an Zellkern-DNA vitaler, adhärenter Zellen gemessen wird.

Dafür wurden die Zellen in 96-well Platten plattiert. Die Anzahl der Zellen betrug 7500 Zellen/well. Nach 24 Stunden Inkubation haben wir diese Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des CTPi2 Inhibitors behandelt (0 µM bis 250 µM) und nach weiteren zwei Stunden Inkubation mit 0 bzw. 2Gy Photonen bestrahlt. Nach 24, 48 und 72 Stunden fand dann die Kristallviolettfärbung statt. Zur Verwerfung der toten Zellen bzw. der Zellen, die nicht adhären sind, wurde das Medium verworfen und die 96-well Platten vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen mithilfe von Glutaraldehyd (1% in PBS) für 15min. Die Lösung wurde abgenommen und stattdessen die Kristallviolettfärbung für 25min auf die Zellen gegeben. Nach Abnahme des Farbstoffes sind die Zellen erneut vorsichtig gewaschen worden, nun mit destilliertem

Wasser, und die Zellen dann mithilfe von Triton X-100 (0,2% in PBS) für eine halbe Stunde auf einem Schüttler permeabilisiert. Dies sorgte für die Freisetzung des Farbstoffes aus den vitalen Zellen. Mit einer Wellenlänge von 540nm konnte dann die Extinktion mit einem ELISA Reader bestimmt werden. Die dabei gemessene Absorption ist dabei direkt proportional zu der Anzahl der vitalen Zellen.

3.2.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es, bis zu 1.000 Zellen pro Sekunde in Hinsicht auf Größe, Fluoreszenz und Granularität zu analysieren. Dabei werden Zellen nach der hierfür erforderlichen Vorbereitung durch einen Überdruck durch eine Messkapillare gesaugt. Dabei entsteht ein Strom aus aneinandergereihten Zellen, welcher an einem Laserstrahl vorbeigeleitet wird und diesen auf für verschiedene Eigenschaften spezifische Weise ablenkt. Das dabei gestreute Licht wird hinterher durch Photodetektoren erfasst. Die Streuung unterscheidet man dabei in ein Vorwärtsstreulicht (FSC) und ein Seitwärtsstreulicht (SSC), wobei ersteres für die Messung der relativen Zellgröße, und das zweite für die Zellgranularität genutzt werden kann. Aus den verschiedenen Wellenlängen wiederum lassen sich die Fluoreszenzintensitäten ableiten. Die Analyse dieser Intensität erfolgt durch die Absorption und erneute Emission des vom Laser ausgesandten Lichts durch das Fluorochrom. Dieses Emissionslicht wird nun zu optischen Detektoren geleitet. Die Anzahl der detektierten Fluorochrom-Moleküle ist dabei proportional zum emittierten Fluoreszenzlicht und wird in einem Diagramm oder Histogramm dargestellt. Dabei kann man in einem Histogramm hinterher auch eine Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzsignale sehen. In einem Diagramm dagegen werden FSC und SSC dargestellt (Matschke et al., 2015).

Bevor die Zellen mittels FACS Gerät gemessen und analysiert werden, gilt es jedoch, sie vorzubereiten. Dafür werden 300.000 Zellen für jede Probe in einer 6cm Petrischale plattiert und anschließend für 24 Stunden inkubiert. Die Zellen werden nun entsprechend des Versuchs vorbehandelt bzw. nicht vorbehandelt und zwar zwei Stunden vor der geplanten Bestrahlung. Diese erfolgt wieder mittels Photonenstrahl mit den Dosen 0 oder 10 Gy. Bei der Bestrahlung mit Protonen wurde die Dosis auf 6 Gy reduziert, um die mit Protonenbestrahlung einhergehende Abklingzeit des Materials, das durch die Bestrahlung aktiviert wird, im vertretbaren Bereich zu halten. Danach werden die Zellen wiederum für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Für die Färbung der Zellen wird zunächst das

Medium aus den Platten abgenommen und in FACS Röhren überführt. Die Platten werden nun einmal mit PBS gewaschen und das PBS ebenfalls in die Röhren gegeben. Danach werden die Zellen mit Trypsin behandelt und für drei bis fünf Minuten bei 37°C inkubiert, um sie von den Platten zu lösen. Durch Resuspendieren mit dem zuvor abgenommenen Medium wird die Reaktion des Trypsins gestoppt und auch die restlichen Zellen gelöst. Nun wird die gesamte Suspension auf die FACS Röhren aufgeteilt, entsprechend der geplanten Färbungen. In unserem Fall wurde jede Probe auf drei Röhren aufgeteilt, um anschließend eine der drei Färbungen für funktionelle Messungen durchzuführen. Die Röhren werden für sechs Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert, um ein Zellpellet zu erhalten. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das Pellet mit 200 µl der vorbereiteten Färbungen resuspendiert und gevortext.

3.2.3.1 Bestimmung ROS-positiver Zellen (DHE Färbung)

Die Färbung der Zellpellets mit Dihydroethidium dient der Bestimmung der Level von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Wird DHE durch ROS oxidiert, entsteht Ethidium, welches in die DNA interkaliert. Durch diese Interkalation verschiebt sich der zuvor blaue Fluoreszenzstrahler in den grünen bis roten Wellenlängenbereich (Zhao et al., 2003). Ist DHE jedoch nicht oxidiert, kann es nicht in die Zellen eindringen und auch nicht in die DNA interkalieren. Es eignet sich somit sehr gut als Redoxindikator für die Messung von oxidativen Vorgängen in lebenden Zellen. Die Inkubationszeit dieser Färbung beträgt 30 Minuten im Dunkeln bei 37°C im Inkubator.

3.2.3.2 Bestimmung apoptotischer Zellen (sub G1 Fraktion)

Mithilfe der Nicoletti Färbung (Schaefer et al., 1991) ist es möglich, eine Zellzyklusanalyse durchzuführen, bei der der Anteil der apoptotischen Zellen bestimmt wird. Durch das Hinzugeben von Triton X-100 zum hypotonen Puffer werden nicht nur die Zellmembranen von apoptotischen Zellen, sondern auch die Membranen gesunder Zellen permeabilisiert, damit der Farbstoff Propidiumiodid (PI) aufgenommen werden kann. Dies dient dazu, dass der Zellzyklus von allen Zellen sichtbar gemacht werden kann. Der Anteil der apoptotischen Zellen wird im Diagramm durch die sogenannte Sub-G1 sichtbar. Diese entsteht durch die Fragmentierung der DNA in diesen geschädigten Zellen durch enzymatische Verdauung. Die Inkubationszeit der Nicoletti Färbung beträgt 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur.

3.2.3.3 Bestimmung toter Zellen

Auch die Lebend-Tot Färbung durch Propidium-Iodid (PI) Exklusion macht sich die unterschiedlichen Zustände der Zellmembran von lebenden und toten Zellen zunutze. PI kann eine intakte Zellmembran nicht überwinden und so nicht in die Zellen eindringen. Das ist jedoch bei toten Zellen durch die nicht mehr funktionierende Membran möglich. Durch die Interkalierung von PI in die DNA nimmt die Fluoreszenz zu und kann mittels FACS Gerät gemessen werden. Die Inkubationszeit der ExPI Färbung beträgt 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur.

3.2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Ähnlich wie auch das Durchflusszytometrie-Gerät macht sich das AxioObserver.Z1 Fluoreszenz Mikroskop die Tatsache zunutze, dass die Anregung von gewissen Fluoreszenz-Farbstoffen mit Licht einer gewissen Wellenlänge mit der Emission von Licht einer anderen Wellenlänge einhergeht. So ist es möglich, spezifische Strukturen der Zellen anzufärben und sie dann hochauflösend sichtbar zu machen. Das eingebaute Apotome in unserem Mikroskop ermöglicht es außerdem, die Menge an Streulicht zu verringern, indem es eine künstliche Schnittebene in das aufzunehmende Bild einbaut. Diese Schnittebene entsteht durch eine Gitterstruktur innerhalb des Apotomes, wodurch ein Teil der Fluoreszenz-Anregung unterdrückt wird und das Programm so die Ebene des aufzunehmenden Bildes errechnen kann. Dies führt zu einer besseren Darstellbarkeit von Zellen, vor allem, wenn diese sehr eng aneinander oder sogar übereinanderliegen. Die Erstellung der Bilder sowie die Berechnung der Ebenen, die durch das Apotome erzeugt werden, erfolgt durch die Axio Vision Software.

3.2.4.1 Vorbereitung der Zellen für die Fluoreszenzfärbung

Die Zellen werden 24 Stunden vor Beginn der Behandlung mit einer Dichte von 50.000 Zellen pro Well in 12-well Platten plattiert. In diese Wells wurden vorher 12mm runde Deckgläser platziert. Diese dienen dazu, die Zellen hinterher aus dem Well entfernen zu können, ohne deren Struktur zu verletzen. Nach 24 Stunden Inkubation werden die Zellen entsprechend Versuchsaufbau mit BTA, CTPi2, PARP (PJ34) oder DNA-PK (NU7441) Inhibitoren oder aber einer entsprechenden Kombination der Wirkstoffe behandelt. Nach zwei weiteren Stunden Inkubation erfolgte die Bestrahlung der Platten mit 0 oder 5 Gy. Um die Bildung der zu untersuchenden γ H2AX-foci zu spezifischen Zeitpunkten zu messen, haben wir die Zellen nach 0, 5, 2, 4, 6 und 24 Stunden mit einer Fixier-

/Permeabilisierungslösung bestehend aus Paraformaldehyd (4%), Triton X-100 (0,2%) und PBS (1x) behandelt. In dieser Lösung erfolgte die Inkubation der Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur, bevor die Lösung wieder abgesaugt und die Zellen 3-mal mit PBS gewaschen wurden. Anschließend wurden die Zellen noch mit einer 2%igen NGS Lösung in PBS für 30 Minuten geblockt. Nach dem Blocken aller Zeitpunkte war es möglich, die Zellen entsprechend zu färben.

3.2.4.1.1 Färbung der Zellen für γ H2AX-foci

Zum Nachweis der DNA Schäden führten wir die γ H2AX-foci Färbung durch. Der Antikörper wurde 1:50 in der bereits zuvor hergestellten Blocklösung verdünnt. Dabei waren pro Coverslip 30 μ l eingeplant. Es wurden nun Parafilm-Streifen auf eine Arbeitsplatte gelegt und entsprechend der Anzahl der Proben 30 μ l Tropfen auf diese Streifen verteilt. Es folgte das Herausnehmen der Coverslips aus den Wells, bevor sie mit den Zellen nach unten auf die Tropfen gelegt wurden. In dieser Lösung haben wir die Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Sämtliche Arbeiten wurden im Dunkeln durchgeführt, um einer verfrühten Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes entgegen zu wirken. Nach der Inkubation wurden die Zellen wieder zurück in die Wells gebracht und zweimal mit PBS gewaschen. Das PBS ist anschließend wieder abgenommen worden, bevor eine Hoechst-Lösung (1:1000 in PBS) hinzugegeben wurde. Diese dient der Anfärbung der Zellkerne durch Interkalation in die DNA. Auch diese Lösung musste 30 Minuten im Dunkeln inkubieren. Vor dem Eindeckeln auf die Objektträger mit dem Fluoreszenz Mounting Medium wurden die Zellen erneut vorsichtig mit PBS gewaschen. Nachdem die Objektträger fertig waren, haben wir sie für mindestens 24 Stunden bei 4°C getrocknet und anschließend auch bei diesen Bedingungen bis zum Mikroskopieren gelagert.

3.2.4.1.2 Färbung der Zellen für Rad51-foci und kombinierte Färbung mit γ H2AX

Zum Nachweis der DNA Schäden führten wir die γ H2AX-foci Färbung durch. Ebenfalls nach dem Blocken beginnt die Rad51-foci Färbung. Zunächst wurden die Zellen mit dem Primärantikörper Rad51 in einer 1:100 Verdünnung behandelt. Das Vorgehen war identisch wie bei den γ H2AX-foci auf Parafilm Streifen, wobei ca. 30 μ l pro Coverslips Anwendung fanden. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden. Vor dem Hinzugeben des Sekundärantikörpers in einer 1:400 Verdünnung wurden die Zellen wieder dreimal mit

PBS gewaschen. Beide Antikörper wurden in einer Blocklösung verdünnt. Der Sekundärantikörper inkubierte für 35 Minuten. Auch nach diesem Schritt wurde viermal mit PBS gewaschen. An dieser Stelle bietet sich die Möglichkeit, wie bereits mit der Hoechst Färbung fortzufahren, oder man färbt die Zellen noch mit dem γ H2AX-Antikörper, sodass man zwei verschiedene Färbungen in einer Probe erhält. Diese lassen sich dann mithilfe der Axio Vision Software auch in einer Probe nacheinander auswerten. Nach der Färbung mit dem Hoechst Farbstoff wurden die Deckgläser ebenfalls mit dem Fluoreszenz Mounting Medium eingedeckelt und bei 4°C für 24 Stunden getrocknet und danach bei 4°C gelagert bis zum Mikroskopieren.

3.2.5 Messung der D2-Hydroxyglutarate Bildung

Zur Messung der D2HG Level kam das Kolorimetrische Kit der Firma Biovision zur Anwendung. Die Zellen wurden in T175 Flaschen kultiviert, um von jeder Zelllinie die benötigte Zellzahl (1×10^7 Zellen) für den Assay zu erhalten. Die Vorbehandlung mit den jeweiligen Wirkstoffen erfolgte sechs Stunden vor Beginn des Protokolls. Zuerst wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde mit 100 μ l eisgekühltem D2HG Buffer resuspendiert und für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde die Probe erneut bei 10.000 rpm für fünf Minuten bei einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde nun in neue Eppendorf Gefäße überführt. Plattiert wurde der Versuch in 96-well Platten. Für jede zu untersuchende Zelllinie wurden sechs Wells benötigt, so dass man drei unbehandelte Wells (ctrl) und drei mit Behandlung (z.B. CTPi2) hatte. Zusätzlich zu den vorbereiteten Proben benötigte man den Reaction Mix sowie den Background Control Mix, welche man für jeden Versuch neu aus den einzelnen Bestandteilen des Kits herstellt (Tab. 3).

Tabelle 3 Die verschieden zusammengesetzten Kit-Bestandteile für die jeweiligen Wells

Well	Zusammensetzung
Reaction Mix	46 μ l D2HG Assay Buffer
	2 μ l D2HG Enzyme
	2 μ l D2HG Substrate Mix
Background Control Mix	48 μ l D2HG Assay Buffer

	2µl D2HG Substrate Mix
Standard	2µl Zellsuspension 48µl D2HG Assay Buffer 50 µl Reaction Mix
Spiked (Internal Standard)	2µl Zellsuspension 43µl D2HG Assay Buffer 50 µl Reaction Mix 5µl 2mM D2HG standard
External Standard	30µl Assay Buffer 50µl Reaction Mix 20µl 1mM D2HG standard
Reagent Background	50µl Assay Buffer 50µl Background control Mix

Nach Zusammenpipettieren der verschiedenen Wells wurde die Platte für 15 Sekunden auf einen Schüttler gestellt und anschließend für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach konnte man die Platten mithilfe des ELISA Readers bei 450 nm auslesen. Um die D2HG Konzentrationen aus den gemessenen Werten zu errechnen, benutzte man die in Abbildung 6 gezeigte Formel.

$$D2HG \text{ conc.} = \frac{\left(\frac{OD_{sample \text{ (corrected)}}}{OD_{spiked \text{ sample}} - OD_{sample \text{ (corrected)}}} \right) * 5}{Sample \text{ volume added into reaction well}}$$

Abbildung 6 Formel zur Berechnung der D2HG Konzentrationen in den Proben.

3.2.6 Bestimmung des Langzeitüberlebens mittels Koloniebildungsassay (CFA)

Um das Langzeitüberleben der Zellen unter verschiedenen Bedingungen, wie z.B. keine Behandlung, Bestrahlung, pharmakologische Behandlung oder Kombinationstherapie, zu vergleichen, benutzten wir den Koloniebildungsassay. Bei diesem Assay werden verschiedene Zellzahlen pro Well ausgesät. Außerdem ist es möglich, verschiedene Platten mit unterschiedlichen Strahlendosen zu bestrahlen. Aus den daraus resultierenden Werten lassen sich Überlebensfraktionen der einzelnen Behandlungsintensitäten berechnen und so die Effektivität der jeweiligen Behandlung veranschaulichen. Für die Plattierung der Zellen gibt es einen direkten und einen indirekten Weg. Da wir in unseren Versuchen nur direktes Plattieren angewandt haben, wird das indirekte Plattieren nur der Vollständigkeit halber angesprochen.

3.2.6.1 Direktes Plattieren

Die Zellen wurden in unterschiedlicher Zellzahl in 6 Well Platten plattiert. Dabei enthielten 3 Wells immer die gleiche Zellzahl sowie die gleiche Behandlung. Die bei uns gewählten Zellzahlen waren 200, 400, 800, 1600 und 3200 Zellen/Well. Nach Plattierung wurden die Zellen für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Darauf folgte für die Zellen entweder eine Behandlung mit dem jeweiligen Wirkstoff oder keine Behandlung (Kontrollgruppe). Bei sämtlichen Platten wurde jedoch unabhängig von der Behandlung ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach zwei weiteren Stunden Inkubation wurden die Platten mit verschiedener Gray (Gy) Zahl (0, 2, 5, und 8) bestrahlt. Um die mit Protonen einhergehende hohe Abklingzeit der Platten in einem umsetzbaren Bereich zu halten, wurde bei diesem Aufbau die Strahlendosis auf 0, 2, 4 und 6 Gy reduziert. Danach schloss sich eine Inkubation der Zellen für acht bis zehn Tage an, um die Bildung von Kolonien zu ermöglichen. Dabei wurden die Platten regelmäßig makroskopisch untersucht, um ausreichend große Kolonien zu erhalten, die Platten durften jedoch auch keine Zellrasen bilden, da dies eine Zählung massiv erschwert. Zur Färbung wurde bei allen Platten der Überstand verworfen und die Zellen für zehn Minuten mit Formaldehyde (3,7%) fixiert. Nach weiteren zehn Minuten in Ethanol (70%) wurden die Zellen vorsichtig mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend in Coomassie Färbelösung für 60 Minuten gefärbt. Es erfolgte ein erneuter Waschgang mit destilliertem Wasser, bevor die Zellen bei Raumtemperatur getrocknet wurden. Die Auswertung der Kolonien wurde in

zwei Schritten durchgeführt. Im Ersten wurde jede Platte eingescannt. Dies geschah mit dem *Colony Counter GelCount* von Oxford Optronix. Diese Bilder wurden dann mithilfe der *GelCount Software* gescannt, welche die gebildeten Kolonien erkennt und sie automatisch zählt. Aus diesen Zahlen ließ sich dann die Überlebensfraktion nach jeweiliger Behandlung errechnen und mittels *GraphPad Prism 5* auch optisch darstellen.

3.2.6.2 Indirektes Plattieren

Das indirekte Plattieren unterscheidet sich dahingehend vom direkten, dass die Zellen noch in der Flasche behandelt und zwei Stunden später bestrahlt werden, bevor sie anschließend, 24 Stunden später, in die 6-Well Platten plattiert werden. Dabei wird der Wirkstoff nach 24 Stunden beim Plattieren entfernt und die Zellen, wie unter 3.2.6.1 beschrieben, für acht bis zehn Tage inkubiert.

3.2.7 Western Blot Analyse

Beim Western Blot überträgt man die zuvor mit Elektrophorese aufgeteilten Proteine auf eine Trägermembran. Auf dieser können dann mittels Antikörper verschiedene Proteine nachgewiesen werden. Dies war bei uns dahingehend von Interesse, um die Expression von SLC25A1 nach Behandlung zu untersuchen und um die benutzten Knock-Out Zellen auch als solche zu verifizieren.

Die Zellen wurden in 6-Well Platten mit 300.000 Zellen/Well plattiert und für 24 Stunden inkubiert. Je nach Behandlung haben wir die Zellen nur zwei Stunden vor Bestrahlung mit Wirkstoff behandelt (z.B. siRNA) oder direkt bestrahlt mit einer Dosis von 0 oder 5 Gy. Die Zellen wurden 24 Stunden und 48 Stunden nach Bestrahlung gesammelt. Es folgte eine Zentrifugation der so gesammelten Zellen bei 4.000 rpm für fünf Minuten. Anschließend wurde das Medium verworfen und das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bei -20°C konnte dieses Pellet bis zur Benutzung gelagert werden.

Für die Proteinisolation wurde das Pellet aufgetaut und mit 80µl RIPA Buffer für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei 4°C, 13.000 rpm über 15 Minuten wurde erneut ein Überstand erzeugt. Dieser enthielt nun die Proteine und wurde in ein neues 1.5ml Mikrozentrifugierröhrchen überführt. Um die Proteinkonzentration der Lysate zu bestimmen, wurde das *DC Protein Assay Kit* benutzt. Dies war nötig, um eine gleiche Menge an Proteinen zu gewährleisten, welche für die Elektrophorese auf das Gel

geladen wird. Die Durchführung erfolgte wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben. Entsprechend der Konzentrationen wurden die Lysate nun mit RIPA Buffer und Ladepuffer (viermal) vermenget. Zur Denaturierung wurden die Lysate anschließend bei 95°C aufgeköcht. Für die Auftrennung der nun fertigen Proben wurden diese auf die bereits vorbereiteten und in die Elektrophoresekammer eingespannten Gele (5% Stapelgel und 12% Laufgel) aufgetragen. Die Gele liefen bei einem Strom von 30 Volt über Nacht. Zur Übertragung des Gels auf eine PVDF Membran wurden Gel und Membran für 90 Minuten bei 4°C und 1,5 Ampere erneut in ein elektrisches Feld eingespannt. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt. Zum Blocken benutzten wir 1xRotiBlock, welches für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubierte. Anschließend wurde der in RotiBlock-TBS (1xRotiBlock in 1x TBS 1:3) oder in Bovinem Serum Albumin (BSA) verdünnte Antikörper über Nacht bei 4°C zugegeben. Die Membran wurde dann dreimal mit 1x TBS mit 0,1% Tween (TBS-T) gewaschen, bevor der Sekundärantikörper in TBS-T oder Magermilch verdünnt bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubierte. Es folgten drei weitere Waschgänge mit TBS-T.

Die Bilder wurden mithilfe des *Fusion Solo* erzeugt, nachdem die Membranen mit 500µl *ECL Select* oder *ECL Prime* versetzt wurden.

3.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mithilfe von GraphPad Prism 5 durchgeführt, die Berechnungen von verschiedenen Formeln mit Microsoft Excel 2016. Die Experimente wurden dreimal wiederholt. Unter Annahme einer Normalverteilung wurden statistische Signifikanzen berechnet. Dafür nutzten wir entweder den ungepaarten *Students t-test* oder den *Two Way ANOVA* (Varianzanalyse, Mittelwert-Vergleichstest) mit einem post-hoc Test nach Bonferroni. Das Konfidenzintervall betrug 95 %. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha = 0,05$ (5 %) festgelegt. Das heißt, dass der Unterschied zwischen zwei Datensätzen signifikant ist, wenn der p-Wert kleiner oder gleich 0,05 ist. Die Markierung der Signifikanzen erfolgte in den Abbildungen mittels Sternen (*). Dabei steht * $p < 0,05$ für signifikant, ** $p < 0,01$ für hoch signifikant und *** $p < 0,001$ für extrem signifikant.

4 Ergebnisse

4.1 Verifizierung der BTA-induzierten Effekte auf der Ebene von SLC25A1

Vorherige Arbeiten zeigten bereits, dass eine pharmakologische Inhibierung des SLC25A1 Transporters zu einer Sensibilisierung der Krebszellen für die zytotoxischen Wirkungen der Strahlentherapie führt (Hlouschek et al., 2018).

Das Ziel der nun vorliegenden Arbeit war es zum einen zu untersuchen, ob mit einem alternativen, spezifischen Wirkstoff (CTPi2), als auch durch eine genetische Herunterregulation der SLC25A1 Expression mittels siRNA-Technologie die zuvor gesehenen Effekte wiederholt oder sogar verstärkt werden können. Des Weiteren sollten die zugrundeliegenden Mechanismen der durch SLC25A1 Inhibition induzierten Verlangsamung der DNA-Reparatur weiter untersucht werden, welche möglicherweise zu der erhöhten Strahlensensibilisierung nach SLC25A1 Inhibition beitragen könnten. Ein weiterer Teil der Arbeit untersuchte die Übertragung des Konzeptes auf vier Zelllinien, die neben zwei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom Zelllinien auch zwei Glioblastom Zelllinien beinhalteten.

4.1.1 Effekt der CTPi2 Inhibition auf die Zellvitalität und Zellproliferation

Um die Auswirkungen der CTPi2 Inhibition auf die Zellviabilität/Proliferation der behandelten Zellen zu untersuchen, führten wir eine Kristallviolett-färbung durch. Diesem Versuch liegt das Prinzip zugrunde, dass der Farbstoff an DNA und Proteine bindet. Die toten und nicht anhaftenden Zellen werden anschließend gewaschen, so dass bei der Messung nur die lebenden, angehafteten Zellen erfasst werden. So führt eine höhere Anzahl vitaler Zellen zu höheren gemessenen Werten als eine Vergleichsgruppe mit vielen abgestorbenen Zellen. Insgesamt zeigte sich, dass ein Effekt der CTPi2-Behandlung innerhalb der ersten 24 Stunden mit Ausnahme der NCI-H460 Zelllinie eine geringere Auswirkung auf die Zahl der lebenden Zellen hatte. Nach 48 und 72 Stunden hingegen zeigt sich in allen vier Zelllinien ein deutlicher Abfall der gemessenen Absorptionen und somit ein deutlicher Abfall der Zahl der lebenden Zellen bei zunehmenden Konzentrationen von CTPi2. Anhand der Effekte auf die Zahl der lebenden Zellen nach Behandlung mit steigenden CTPi2-Konzentrationen wurde eine Konzentration von 200µM für die funktionellen Assays in Kombination mit Bestrahlung ausgewählt. Diese Konzentration zeigte bei den Zellen eine geringe

(Lungenadenokarzinom Zelllinien A549 und NCI-H460) bis starke (Glioblastom-Zelllinien T98G und U87MG) Reduzierung der Zellviabilität.

Die Auswertung sowie die Darstellung der so gewonnenen Daten wurden mithilfe von Graph Pad Prism 5 erstellt und sind in Abbildung 7 dargestellt.

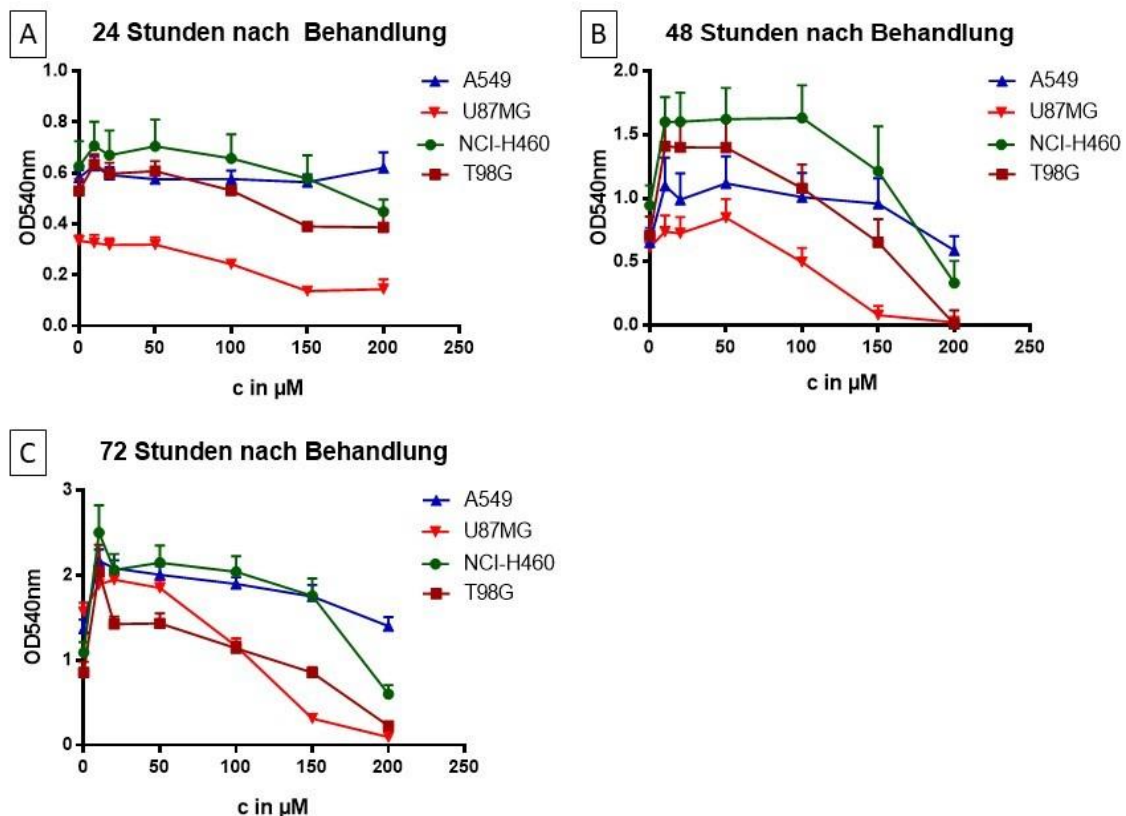


Abbildung 7 Auswirkungen auf die Zellviabilität der Zellen nach Inhibition des SLC25A1 Transporter mit CTPi2

Die Zelllinien A549, NCI-H460, T98G und U87MG wurden mit CTPi2 Konzentrationen zwischen $0\mu\text{M}$ und $200\mu\text{M}$ behandelt. Nach zwei Stunden Inkubationszeit wurden sie zusätzlich mit 2 Gy Photonen bestrahlt und entsprechend ihrer geplanten Inkubationszeit weitere 24 Stunden (A), 48 Stunden (B) oder 72 Stunden (C) inkubiert. Anschließend wurde eine Kristallviolett-färbung durchgeführt und die Absorption bei 540 nm gemessen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ($\pm\text{SEM}$) aus drei unabhängigen Experimenten ($N=3$).

4.1.2 CTPi2 induzierte Effekte auf den Zelltod, ROS-Bildung und Apoptose

Um zu untersuchen, ob dieser spezifische CTP Inhibitor ähnliche Effekte zeigt wie zuvor der BTA Inhibitor, führten wir zunächst eine Durchflusszytometrie durch. Hierbei

wurden insgesamt vier Gruppen von Bedingungen verglichen: ohne jede Behandlung (ctrl), Monotherapie mit CTPI2 (CTPI2, 200 μ M), Monotherapie mit Photonenstrahlung (XRT) und eine Kombinationsbehandlung mit Inhibitor und Strahlentherapie (CTPI2 + XRT). Bei der zuletzt genannten Gruppe wurde zwei Stunden vor der Bestrahlung der Wirkstoff CTPI2 zu den Zellen hinzugefügt.

Bereits hier konnten wir zeigen, dass eine Vorbehandlung der Zellen zwei Stunden vor der geplanten Bestrahlung dazu führt, dass sich sowohl die ROS Induktion (Abb. 8 A), die Apoptose Fraktion (Abb. 8 B), als auch der induzierte Zelltod (Abb. 8 C) in nahezu allen Zelllinien 48 Stunden nach Behandlung signifikant erhöhen. Besonders die Kombinationsbehandlung von CTPI2 (200 μ M) und Bestrahlung (10Gy) führte zu einer Sensitivierung der untersuchten Zelllinien gegenüber den toxischen Kurzzeiteffekten einer Bestrahlung. Dies zeigte sich im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen, aber auch im Vergleich zu den beiden monotherapeutisch (CTPI2, 200 μ M) behandelten Gruppen.

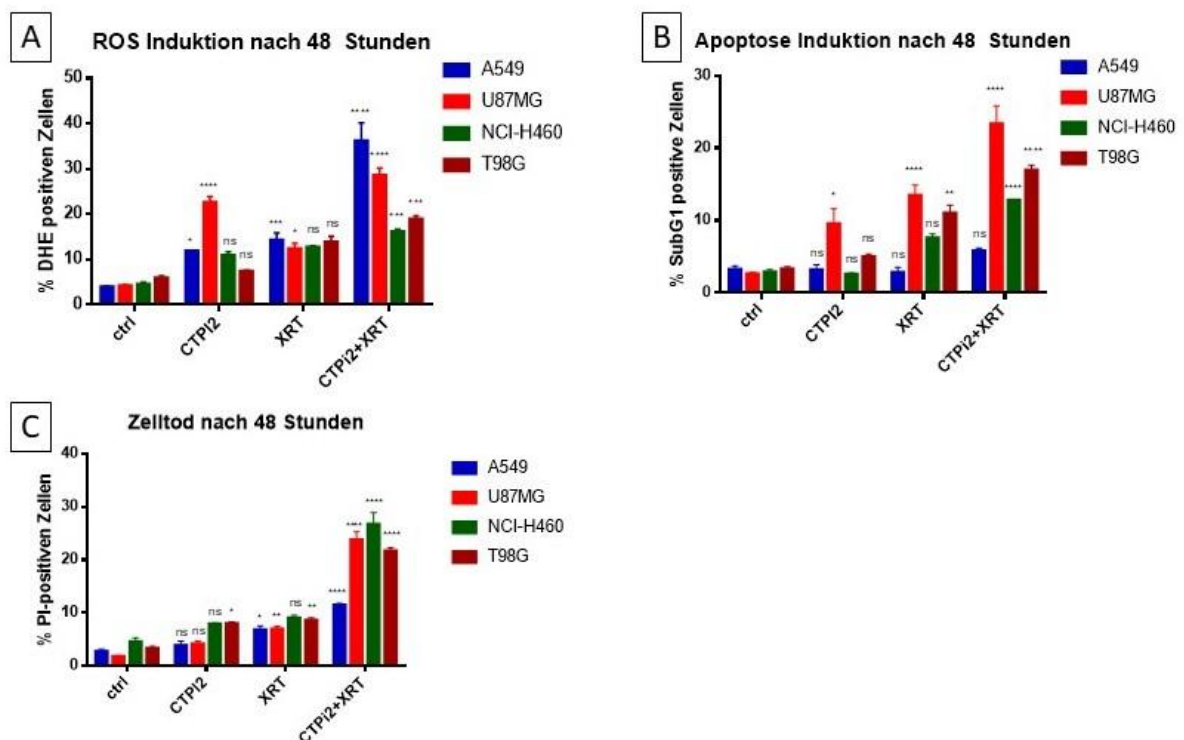


Abbildung 8 Anstieg der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) -Induktion, Apoptose-Induktion und Zelltod 48 Stunden nach verschiedenen Vorbehandlungen

Die beiden Nicht-kleinzelligen Lungenkrebs Zelllinien A549 und NCI-H460 sowie die beiden Glioblastom Zelllinien U87MG und T98G wurden zunächst in vier verschiedenen Gruppen kultiviert. Zwei Stunden vor der geplanten Bestrahlung wurden dann zwei Gruppen mit CTPi2 behandelt. Eine dieser Gruppen sowie eine der nicht vorbehandelten Gruppen wurden anschließend mit 10 Gy Photonen (X-Rays) bestrahlt. Anschließend wurden alle vier Gruppen für weitere 48 Stunden kultiviert. Zur durchflusszytometrischen Auswertung wurden die Zellen anschließend mit DHE (A), der sogenannten Nicoletti -Färbung (B) beziehungsweise ExPI (C) gefärbt und untersucht. Dabei zeigten mit Ausnahme der A549 Reihe in (B) nach Kombinationstherapie alle Zelllinien einen signifikanten Anstieg der ROS-Level, der Apoptose-Induktion und des Zelltodes 48 Stunden nach Kombinationsbehandlung. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte (\pm SEM) aus drei unabhängigen Experimenten (N=3). Statistische Signifikanz: Two-Way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post-test. Ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

4.1.3 Behandlung mit CTPi2 induzierte eine Akkumulation von D2HG

Ebenfalls fanden Hlouschek et al. (2018) nach der Inhibition von SLC25A1 mittels BTA erhöhte Konzentrationen des Onkometaboliten D2-Hydroxyglutarat. Die Akkumulation des Onkometaboliten in Zellen mit onkogenen IDH1/2 Mutationen wurde, wie bereits in 2 beschrieben, mit einer Verzögerung der DNA-Reparatur in Verbindung gebracht (Sulkowski et al., 2017). Es sollte also nun getestet werden, ob auch bei einer Inhibierung mit einem spezifischen Inhibitor von SLC25A1 mittels CTPi2 ein Anstieg der D2HG Werte zu beobachten ist. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

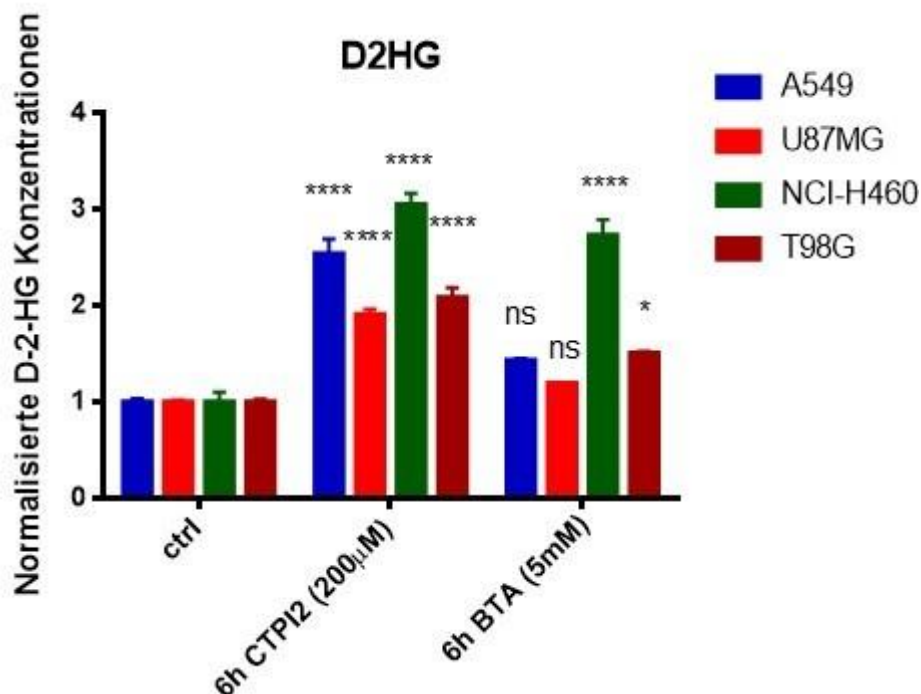


Abbildung 9 D2HG Level-Induktion nach SLC25A1 Inhibition mittels CTPi2 oder BTA

Untersuchung der Entwicklung der gemessenen D2HG Level nach einer Behandlung mit CTPi2 bzw. mit BTA für sechs Stunden. Dafür wurden die Zellen gemäß Protokoll kultiviert und vorbereitet (vgl. 3.2.5). Für eine direkte Vergleichbarkeit erstellten wir dafür drei Gruppen. Eine Kontrollgruppe ohne Behandlung, eine mit BTA behandelte und eine dritte mit CTPi2 behandelte Gruppe und betrachteten diese nach sechs Stunden. Sowohl die CTPi2- als auch die BTA-Behandlung führte zu einer deutlichen Induktion der D2HG Level im Vergleich zu der Kontrollgruppe (ctrl). Je nach Zelllinie führt die Inhibition mit CTPi2 zu signifikant höheren Werten im Vergleich zu einer BTA Behandlung, lediglich die NCI-H460 erscheinen weniger sensitiv für das CTPi2 Verfahren. Die Ergebnisse wurden dabei auf die Ergebnisse der Kontrollgruppen normalisiert. Die Daten repräsentieren drei unabhängige Experimente mit jeder Zelllinie (N=3). Statistische Signifikanz: Two-Way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post-test. Ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Nach einem ersten Durchlauf fügten wir außerdem eine vierte Gruppe hinzu, welche 24 Stunden vor Untersuchung mit siRNA behandelt wurde und so schon auf genetischer Ebene den SLC25A1 Transporter ausschaltete. Wie sich zeigte, führte die Nutzung von CTPi2 zu einer signifikant höheren Wirkung im Vergleich zu einer BTA Behandlung. Dabei zeigten sich die Zellreihen A549, U87MG und T98G als sehr sensitiv, die NCI-H460 als weniger sensitiv auf das CTPi2. Auch zeigte sich auf genetischer Ebene der direkte Zusammenhang zwischen SLC25A1 Inhibierung und der Induktion von D2HG. Die Daten (Abb. 10) zeigen dabei eine deutliche Steigerung der D2HG Konzentrationen in der Gruppe, welche mit siRNA behandelt wurde, im Vergleich zu der Kontrollgruppe (ctrl). Insgesamt zeigt sich, dass eine genetische Inhibition mittels siRNA noch einmal zu einem deutlichen Anstieg der D2HG Konzentrationen führt im Vergleich zu einer pharmakologischen Inhibition mittels CTPi2.

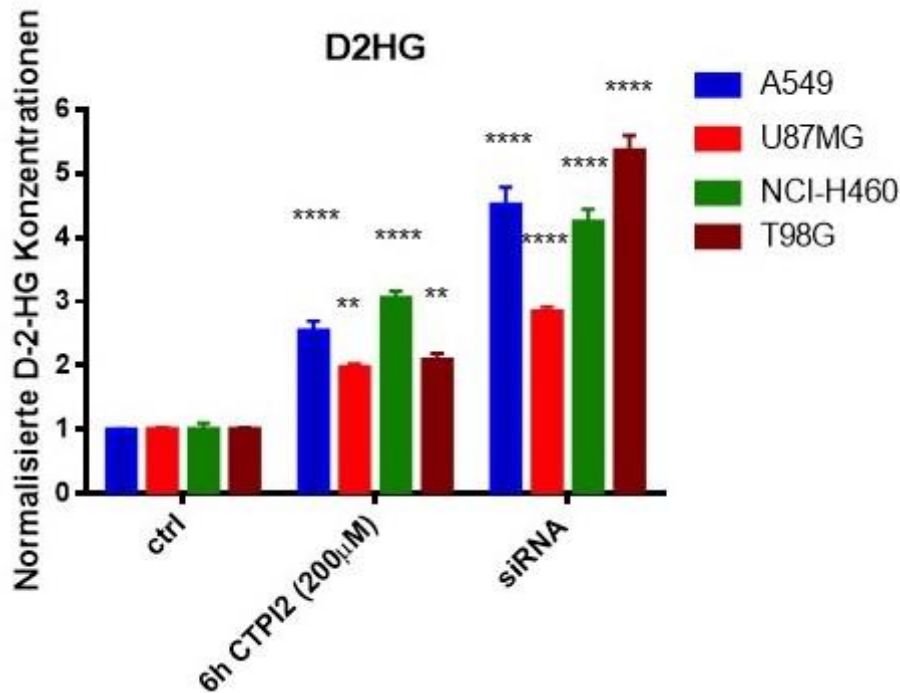


Abbildung 10 Entwicklung der D2HG Konzentrationen nach SLC25A1 Inhibition mittels CTPi2 oder siRNA.

Untersuchung der Zelllinien A549, U87MG, NCI-H460 und T98G auf die Entwicklung der D2HG Werte nach einer Vorbehandlung mit CTPi2 sechs Stunden vor der Messung bzw. mit siRNA 24 Stunden vor der Messung. Die Ergebnisse wurden dabei auf die Ergebnisse der Kontrollgruppen normalisiert. Die Daten repräsentieren drei unabhängige Experimente mit jeder Zelllinie (n=3). Statistische Signifikanz: Two-Way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post-test. Ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

4.1.4 Auswirkungen der SLC25A1 Inhibition auf die DNA-Reparatur

Zur Untersuchung der Auswirkung der SLC25A1 Inhibition auf die DNA-Reparatur untersuchten wir die Effekte auf die Kinetik der Phosphorylierung von H2A.X foci (γ H2AX-foci). Die Phosphorylierung vom Histon H2AX ist schon innerhalb kürzester Zeit nach einer erfolgten DNA-Schädigung nachweisbar. Außerdem korreliert die Konzentration an γ H2AX-foci stark mit der Kinetik der DNA-Reparatur, sodass man ebenfalls Aussagen über die Dauer und damit die Effektivität der Reparatur treffen kann. Die Zellen wurden hierbei zunächst in zwei Gruppen aufgeteilt. Beide Gruppen erhielten eine Vorbehandlung mit CTPi2, jedoch wurde nur eine nach zwei Stunden mit Photonen in einer Dosis von 5 Gy bestrahlt. Um einen zeitlichen Verlauf der Kinetik der DNA-Reparatur zu erkennen, wurden die Zellen nach mehreren Zeitpunkten fixiert und nach anschließender Färbung mit einem, direkt an ein fluoreszierendes Molekül gekoppelten, fluoreszierenden Antikörper gegen das phosphorylierte Histon γ H2AX angefärbt. Von jeder Bedingung und jedem Zeitpunkt wurden mindestens 50 Zellen mikroskopiert und

fotografiert. Diese Bilder konnten anschließend mittels Imaris Software ausgewertet und durch Graph Pad Prism 5 als zeitlicher Verlauf in Graph veranschaulicht werden (siehe Abb. 11 und 12). Auch hierbei nutzten wir anschließend erneut siRNA, um das Experiment auf genetischer Ebene zu wiederholen. Der Vorgang hierbei war nahezu identisch mit dem vorherigen, jedoch erhöhte sich auch hier die Vorbehandlungszeit von zwei Stunden auf 24 Stunden, um einen Effekt der siRNA sehen zu können. Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, führte auch die reine Herunterregulation von SLC25A1 mit siRNA ohne weitere Therapie besonders in den U87MG, NCI-H460 als auch in der T98G Zelllinien zu einer Akkumulation der γ H2AX-foci, gerade zu Beginn, also nach 30 Minuten, und somit zu einer verlangsamten Kinetik der DNA-Reparatur. Diese Akkumulation fällt dann im weiteren zeitlichen Verlauf unterschiedlich schnell ab, nach 24 Stunden zeigen sich dann vermehrt residuale Schäden. Deutlich stärker ist der γ H2AX-foci Anstieg jedoch nach Bestrahlung und noch einmal höher nach Kombinationstherapie aus siRNA und Bestrahlung.

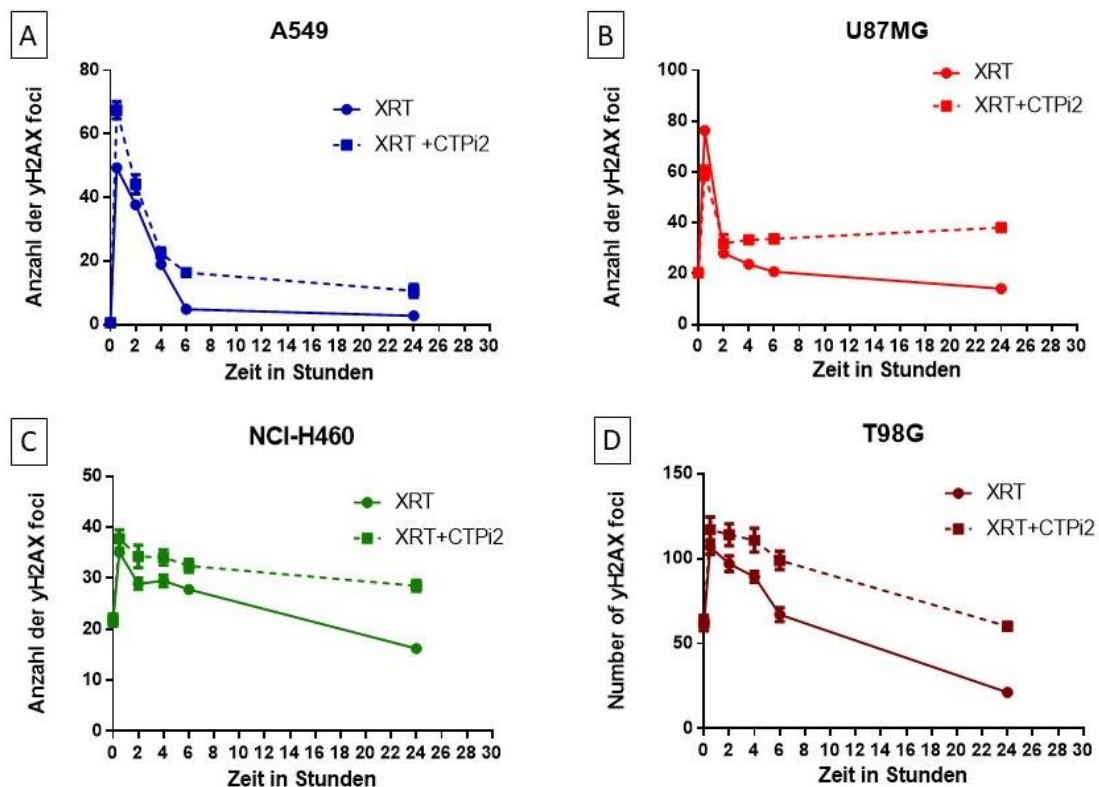


Abbildung 11 Effekt einer Vorbehandlung mittels CTPi2 vor der Strahlenbehandlung auf die Kinetik der γ H2AX-foci

Untersuchung der Kinetik der γ H2AX-foci in den Zellen mit Vorbehandlung mit CTPi2 und ohne CTPi2 vor der Strahlenbehandlung (XRT) bei A549 (A), U87MG (B), NCI-H460 (C) und T98G (D). Es wurden bei jeder Zelllinie zwei Stunden vor Bestrahlung 200 μ M CTPi2 hinzugefügt. Die untersuchten Zeitpunkte waren 0,5, 2, 4, 6 und 24 Stunden nach Bestrahlung. Es zeigten sich anschließend in allen untersuchten Zelllinien eine konstant höhere Anzahl der foci mit Ausnahme der U87MG (B), bei welcher 0.5 Stunden nach der Bestrahlung noch die alleinige Bestrahlung höhere Werte lieferte. Jedoch blieben die vorbehandelten Werte danach länger im erhöhten Bereich. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte (\pm SEM) aus drei unabhängigen Experimenten (N=3).

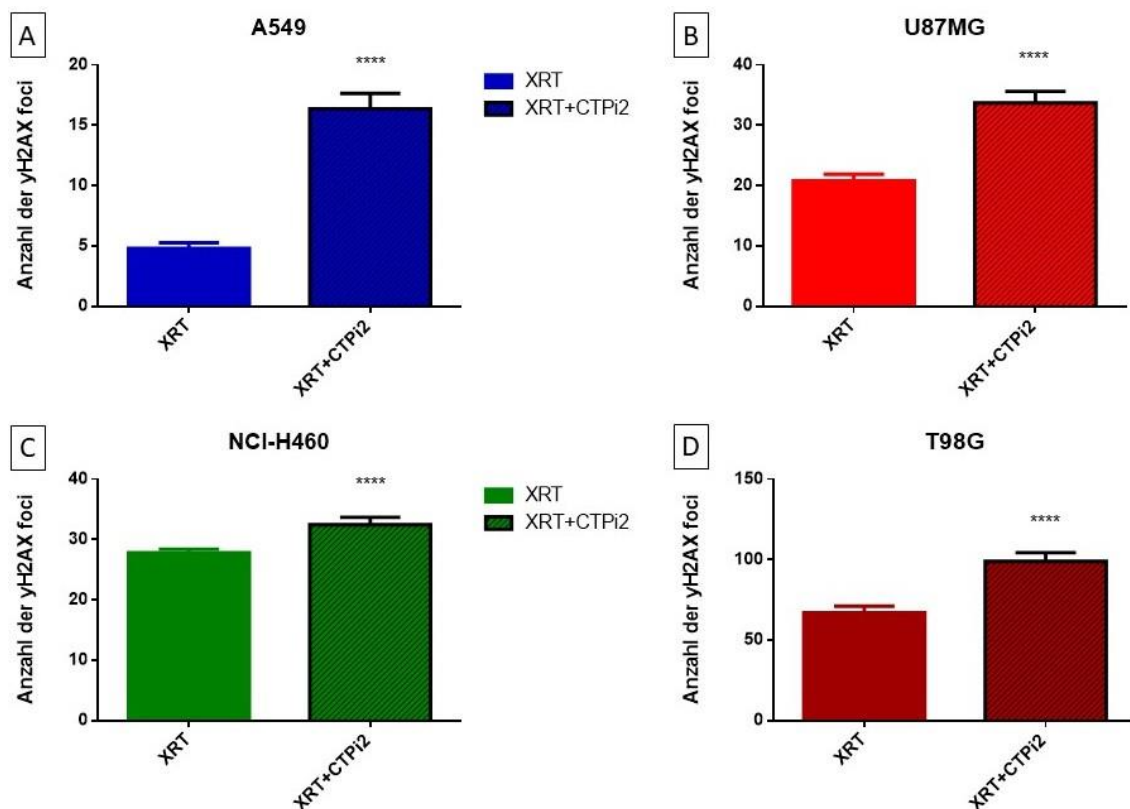


Abbildung 12 Effekt einer Vorbehandlung mittels CTPi2 vor der Strahlenbehandlung auf die γ H2AX-foci zum Zeitpunkt t=6h

Untersuchung der Kinetik der γ H2AX-foci in den Zellen mit Vorbehandlung mit CTPi2 und ohne CTPi2 vor der Strahlenbehandlung (XRT) bei A549 (A), U87MG (B), NCI-H460 (C) und T98G (D) sechs Stunden nach Bestrahlung. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte (\pm SEM) aus drei unabhängigen Experimenten (N=3). Statistische Signifikanz: Mittels nicht-parametrischem ungepaartem t-test. Ns p > 0,05, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

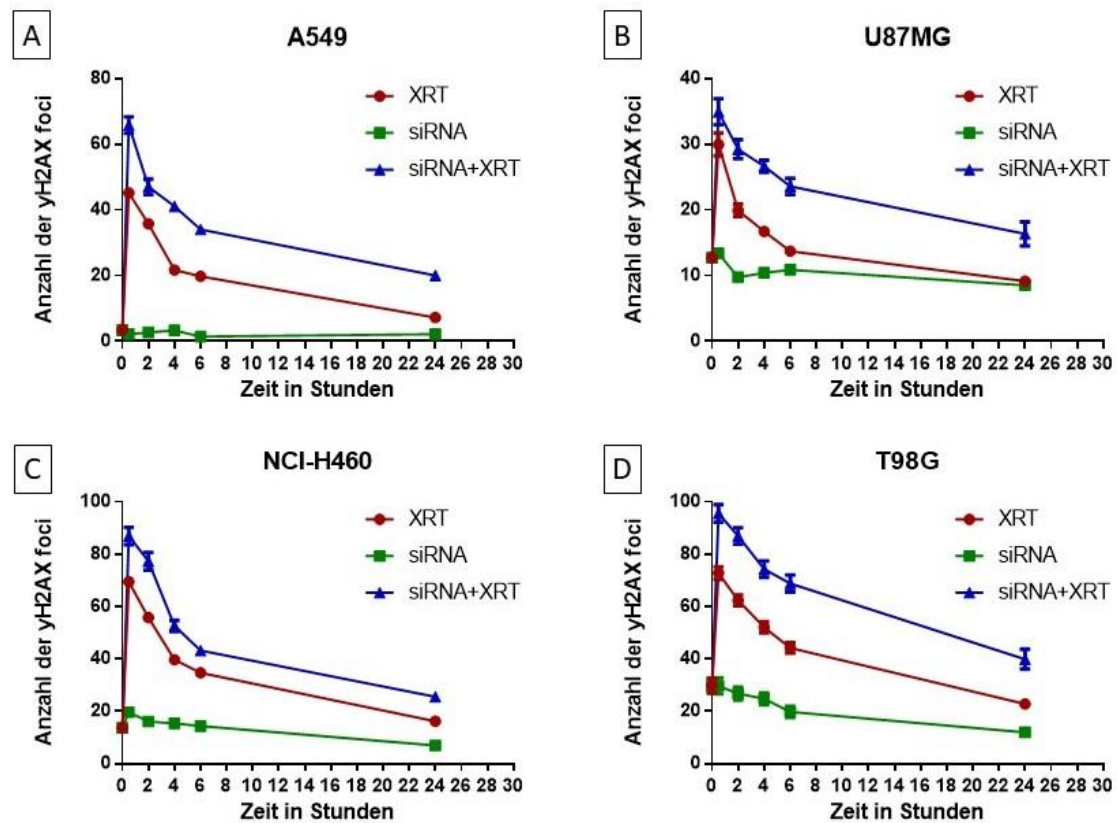


Abbildung 13 Eine genetische Herabregulation der SLC25A1-Expression mittels siRNA vor Strahlentherapie zeigt einen längeren und höheren Anstieg an γ H2AX-foci

Untersuchung des Verlaufs der Akkumulation der γ H2AX-foci in den Zellen mit Vorbehandlung mit siRNA und ohne siRNA vor der Bestrahlung (XRT) bzw. nur siRNA Vorbehandlung ohne Strahlenbehandlung bei A549 (A), U87MG (B), NCI-H460 (C) und T98G (D). Es wurden bei jeder Zelllinien 24 Stunden vor Bestrahlung 200 μ M siRNA hinzugefügt. Die untersuchten Zeitpunkte waren 0, 2, 4, 6 und 24 Stunden nach Bestrahlung. Es zeigten sich anschließend in allen untersuchten Zelllinien eine konstant höhere Anzahl der foci, mit Ausnahme der U87MG (B), bei welcher direkt nach der Bestrahlung bei einer halben Stunde noch die Monotherapie höhere Werte lieferte. Die vorbehandelten Werte blieben jedoch danach länger im erhöhten Bereich. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte (\pm SEM) aus drei unabhängigen Experimenten (N=3).

Beide Experimente zeigten uns, dass sowohl die pharmakologische als auch die genetische Inhibition des SLC25A1 Transporters zu einem deutlichen Anstieg der γ H2AX-foci, als auch zu einem längeren Anhalten der Anzahl IR-induzierter γ H2AX-foci führte verglichen mit der alleinigen Bestrahlung.

4.2 Überprüfen der bisherigen Erkenntnisse in genetisch veränderten Zelllinien

Die bis hierher erhaltenen Ergebnisse zeigten deutlich, dass eine Vorbehandlung mit SLC25A1 Inhibitoren zu einem deutlichen Anstieg von residualen γ H2AX-foci besonders vier bis sechs Stunden nach Bestrahlung führt. Die Akkumulation der residualen γ H2AX-foci korreliert dabei hoch mit dem Anstieg der 2HG-Level nach der pharmakologischen oder genetischen Inhibition von SLC25A1 (siehe Abb. 10). Des Weiteren sollten diese Beobachtungen in isogenen Zelllinien mit spezifischen Defekten in ihren DNA-Reparaturwegen weiter erforscht und bestätigt werden. Dafür wurden die sogenannten Maus-Embryonen-Fibroblasten, kurz MEF-Zelllinien, mit einem Defekt in der Homologen Rekombination (MEF Rad54 $-/-$, homologer genetischer Knockout im Rad54 Gen), mit einem Defekt in der Nicht-homologen Endverknüpfung (MEF Lig IV $-/-$) und eine MEF ctrl Zelllinie als Kontrollgruppe ohne genetische Veränderung in den DNA-Reparaturwegen genutzt.

4.2.1 Einfluss der SLC25A1 Inhibition mit CTPI2 auf die D2HG Produktion in isogenen MEF Zelllinien mit Defekten in Haupt-DNA-Reparaturwegen

Zunächst wurden zur Bestätigung der Hypothese die D2HG Level nach einer pharmakologischen Inhibition von SLC25A1 mit CTPI2 in den isogenen MEF Zelllinien untersucht. Dazu wurden die Zelllinien erneut mit CTPI2 in einer Konzentration von 200 μ M für sechs Stunden behandelt.

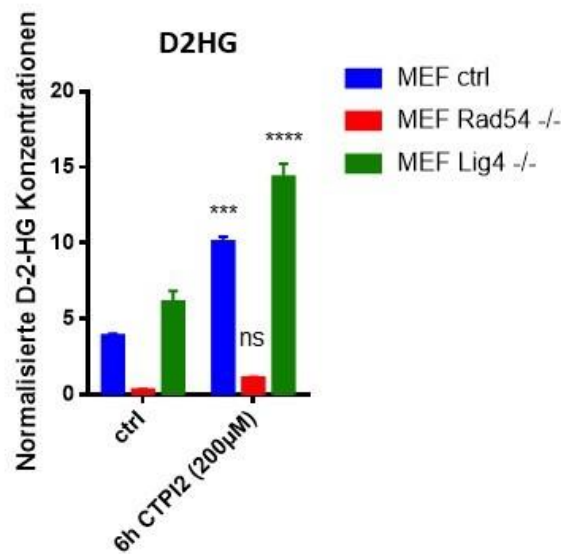


Abbildung 14 Entwicklung der D2HG Konzentrationen nach SLC25A1 Inhibition in den MEF Zelllinien

Untersuchung der Entwicklung des D2HG Werte nach einer Vorbehandlung mit CTPi2 sechs Stunden vor der Messung. Die Daten zeigen dabei große Unterschiede in den Werten abhängig davon, ob kein Gendefekt vorliegt (blau), ein Defekt in der HRR vorliegt (rot) oder ob ein Defekt in der NHEJ vorliegt (grün). Die Ergebnisse wurden dabei auf die Ergebnisse der Kontrollgruppen normalisiert. Die Daten repräsentieren drei unabhängige Experimente mit jeder Zelllinie (n=3). Statistische Signifikanz: Two---Way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post---test. Ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0.0001$.

Die Untersuchung der isogenen MEF Zelllinien mit genetischen DNA-Reparaturdefekten zeigte, dass die Inhibierung des SLC25A1 in Rad 54-defizienten MEF-Zelllinie nahezu keinen Anstieg der D2HG Werte verursacht. Hingegen war ein deutlicher Anstieg der gemessenen D2HG Werte bei der Kontrollgruppe und der Ligase IV-defizienten Zelllinie zu beobachten.

4.2.2 Effekte einer CTPi2 Behandlung auf die ROS-Produktion, den Zelltod und die Apoptosefraktion bei gentechnisch veränderten MEF-Zelllinien

Anschließend wurden die Auswirkungen einer CTPi2-Behandlung auf die ROS-, Apoptose-Induktion sowie die Zelltod-Level in isogenen MEF Zelllinien mit gentechnischen defekten in den Haupt-DNA-Reparatursignalwegen untersucht. Dafür wurden die MEF-Zelllinien in vier Gruppen (Unbehandelt (ctrl), CTPi2 (200µM), Bestrahlt (XRT, 10Gy), XRT+CTPi2) unterteilt und kultiviert. Zwei Stunden vor der geplanten Bestrahlung wurden die Zellen entsprechend ihrer Gruppe mit CTPi2 behandelt und anschließend je nach Gruppe zusätzlich bestrahlt oder ausschließlich bestrahlt.

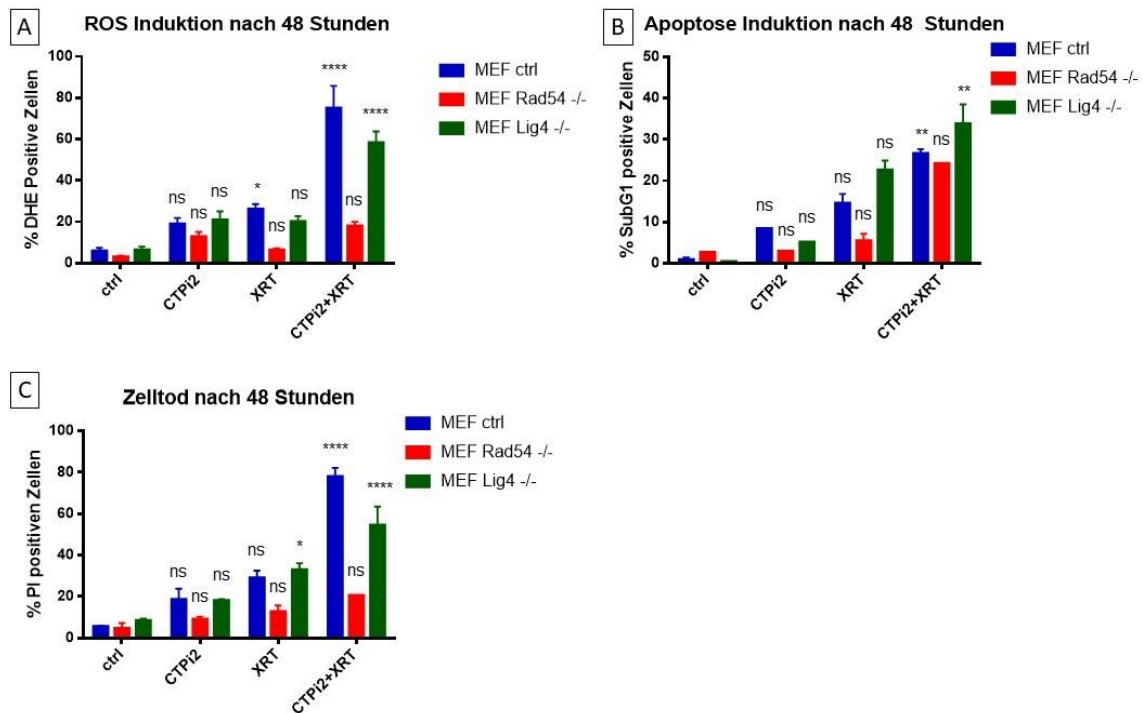


Abbildung 15 Anstieg der ROS-, Apoptose- und Zelltod-Level 48 Stunden nach verschiedenen Vorbehandlungen

Die drei Zelllinien MEF ctrl, MEF Rad 54 -/- und MEF Lig IV -/- wurden zunächst in vier verschiedenen Gruppen kultiviert. Zwei Stunden vor der geplanten Bestrahlung wurden dann zwei Gruppen mit CTPi2 behandelt. Eine dieser Gruppen sowie eine der nicht vorbehandelten Gruppen wurden anschließend mit 10 Gy Photonen bestrahlt. Anschließend wurden alle vier Gruppen für weitere 48 Stunden kultiviert. Zur durchflusszytometrischen Auswertung wurden die Zellen anschließend mit DHE (A), Nicoletti (B) beziehungsweise ExPI (C) gefärbt und untersucht. Dabei zeigten alle Zelllinien einen signifikanten Anstieg der ROS-Level, der Apoptose-Induktion und des Zelltodes 48 Stunden nach Kombinationsbehandlung, mittels CTPi2 und XRT, verglichen mit einer jeweiligen Monotherapie mit CTPi2 oder XRT alleine. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte (\pm SEM) aus drei unabhängigen Experimenten (N=3). Statistische Signifikanz: Two-Way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post-test. Ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Die Kombinationsbehandlung (XRT+CTPi2) der Kontroll- (ctrl) und der Ligase IV-defizienten Zellen führte zu einem signifikanten Anstieg der gemessenen ROS- und Zelltod-Level 48 Stunden nach Behandlung gegenüber den Rad54-defizienten Zellen. Dieser Anstieg war nicht in den Rad 54-defizienten MEF-Zelllinie zu beobachten und deckt sich mit den erhaltenen D2HG Ergebnissen (Abb. 14 und 15). Interessanterweise führte die Kombinationsbehandlung zu einem signifikanten Anstieg der Apoptose-Level in allen MEF Zelllinien unabhängig vom DNA-Reparatur defekt.

4.2.3 Auswirkungen der SLC25A1 Inhibition auf die Zellviabilität von genetisch veränderten Zellen

Anschließend wurde auch der Einfluss der pharmakologischen SLC25A1-Inhibition auf die Zahl der lebenden Zellen bei den genetisch veränderten MEF Zelllinien untersucht. Dafür wurden diese entsprechend ihrer Gruppe mit verschiedenen CTPi2 Konzentrationen behandelt. In Abbildung 16 sind die Ergebnisse zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung (24, 48, 72 Stunden) dargestellt.

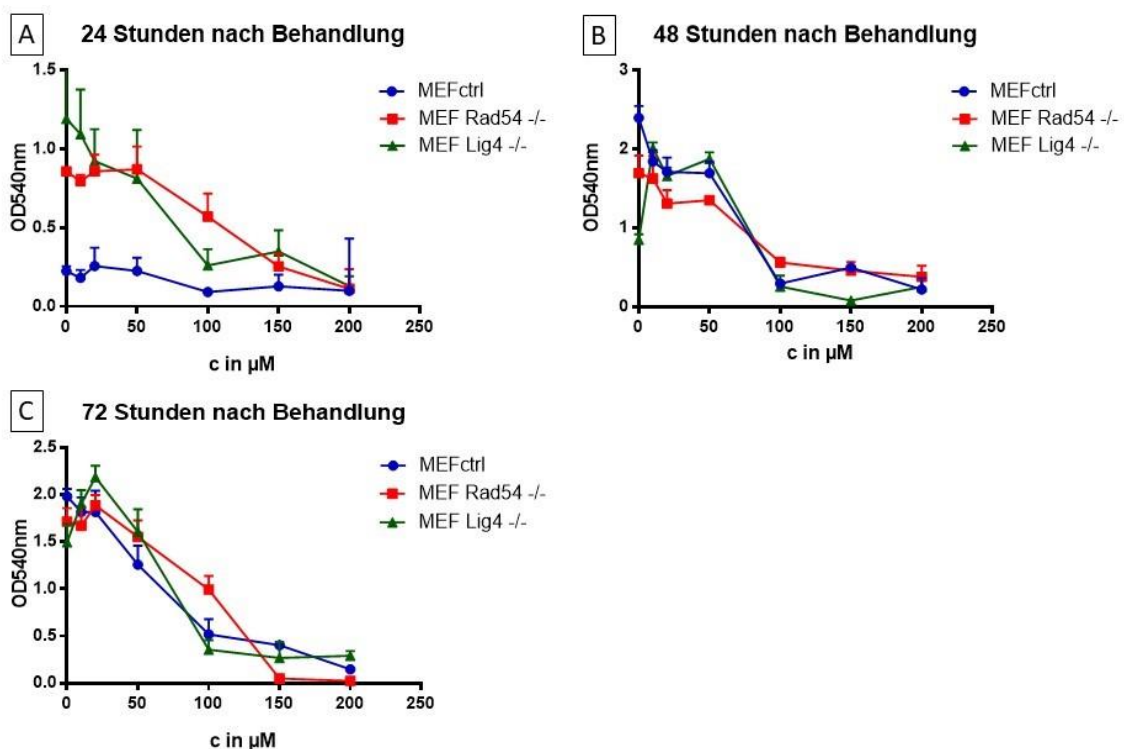


Abbildung 16 Auswirkungen der Inhibition des SLC25A1 Transporter mit CTPi2 auf die Zellviabilität der MEF Zellen

Die drei Zelllinien MEF ctrl, MEF Rad 54 -/- und MEF Lig IV -/- wurden mit CTPi2 Konzentrationen zwischen 0µM und 200µM behandelt und entsprechend ihrer Einteilung weitere 24 Stunden (A), 48 Stunden (B) oder 72 Stunden (C) inkubiert. Anschließend wurde eine Kristallviolett-Färbung durchgeführt und die Absorption bei 540 nm gemessen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte (\pm SEM) aus drei unabhängigen Experimenten (N=3).

In allen drei MEF-Zelllinien zeigte sich eine konzentrationsabhängige Reduktion der Zahl der lebenden Zellen mit Ausnahme der MEF ctrl Gruppe nach 24 Stunden. Vor allem nach 48 und 72 Stunden zeigte sich jedoch die generalisierte Abnahme der gemessenen KV Adsorption ohne große Unterschiede zwischen den verschiedenen MEF Zellen. Eine

Konzentration von CTPI2 zwischen 100-200 μ M führte zu einer konstanten Reduktion der Zellviabilität/Proliferation 48 und 72 Stunden nach Behandlung.

4.2.4 Verringerung des Langzeitüberlebens der Zellen nach vorheriger SLC25A1 Inhibition

Schließlich wurde auch der quantitative und langfristige Einfluss der CTPI2-Behandlung auf die isogenen MEF-Zelllinien mit genetischen Defekten der DNA-Reparatur mittels Koloniebildungsassays untersucht. Ziel dieser Experimente war die Analyse der Fähigkeit der Zellen, über eine bestimmte Zeitdauer hinweg Kolonien zu bilden. Dabei verglichen wir zwei Gruppen von jeder Zelllinie (Bestrahlt (XRT), Bestrahlt und mit CTPI2 behandelt(XRT+CTPI2)), von denen zwar beide bestrahlt, jedoch nur eine mit CTPI2 vorbehandelt wurde. Außerdem wurde die Überlebensfraktion (englisch: Survival fraction, kurz SF) der Zellen über ansteigende Strahlenwerte von 0 (nicht bestrahlt) bis 8 Gy berechnet und gegen die Strahlung in Gy aufgetragen (Abb. 17).

Diese Ergebnisse demonstrieren erneut, dass die Inhibierung von SLC25A1 einen strahlensensitivierenden Effekt auf die in Homologer Rekombination (HRR)-profizienten MEF Zelllinien (ctrl, Lig IV $-/-$) aufweist (Abb. 17 A und B). Dahingegen zeigte die Kombinationsbehandlung von CTPI2 und Bestrahlung keinen Radiosensitivierenden Effekt in der HRR-defizienten MEF Zelllinie (Rad54 $-/-$, Abb. 17 C). Somit bestätigen die mithilfe der isogenen MEF-Zelllinien mit Defekten in DNA Reparaturwegen erhaltenen Ergebnisse die aufgestellte Hypothese, dass SLC25A1-Inhibition in Zellen mit Akkumulation von D2HG die Homologe Rekombination negativ beeinflusst und somit eine Möglichkeit zur Radiosensitivierung von Tumorzellen ohne Defekte in der HRR-DNA-Reparaturweg bietet. Dies zeigt sich auch, da die Rad54-defizienten Zellen nicht radiosensitiviert werden konnten. Hier kann nicht ausgeschlossen werden, dass dies daran liegt, dass in diesen Zellen keine 2HG Akkumulation beobachtet werden konnte.

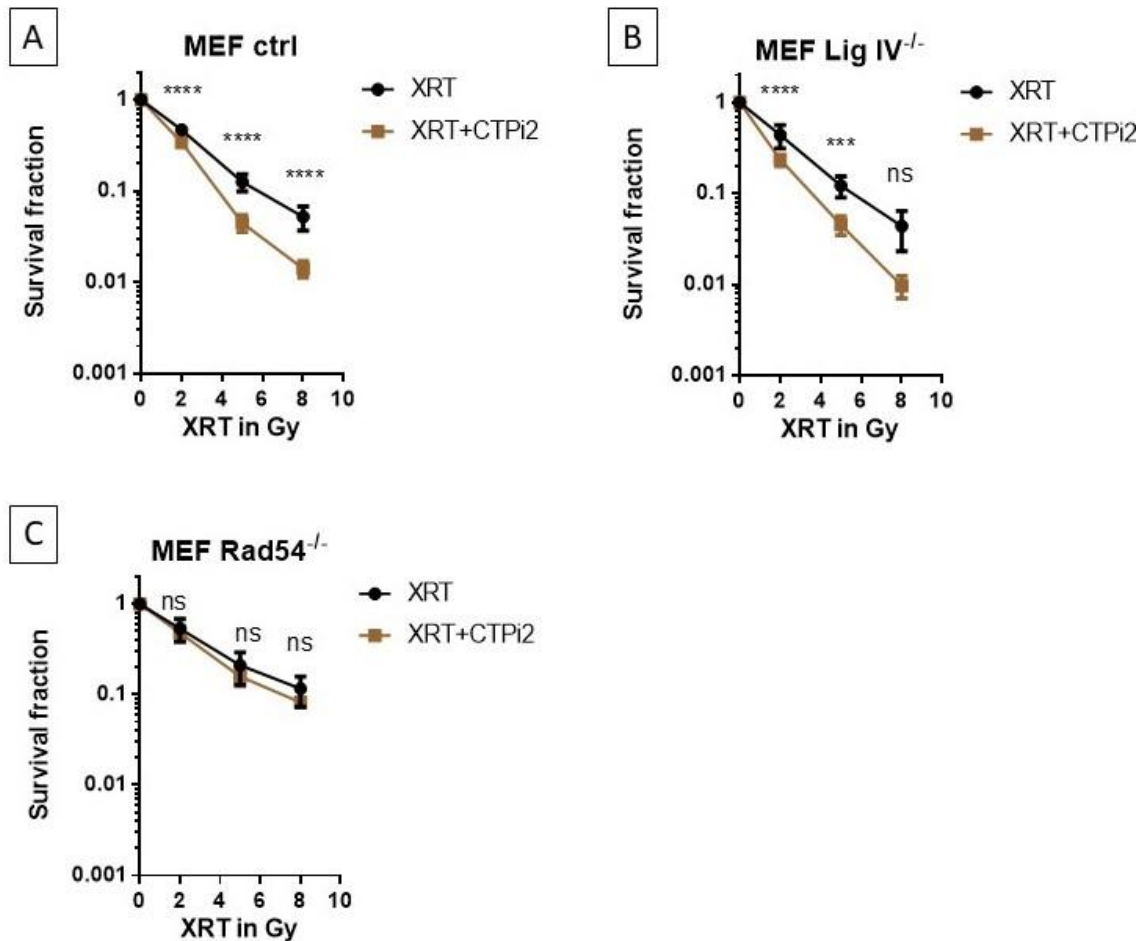


Abbildung 17 Langzeitüberleben von gentechnisch veränderten Zellen nach CTPi2 und Strahlenbehandlung

Gentechnisch veränderte Zellen und Kontrollzellen wurden bestrahlt und mit oder ohne CTPi2 vorbehandelt, für die Standard-Koloniebildungs-Experimente ausgesät, acht bis zehn Tage inkubiert, mit Coomassie-Lösung blau gefärbt und mittels Software (Gel Count) ausgewertet. Danach wurde die Anzahl der gebildeten Kolonien identischer Bestrahlung verglichen und die daraus errechnete Überlebensfraktion (SF) gegen die Strahlendosis aufgetragen. Es zeigte sich eine deutlich verringerte SF durch CTPi2 Behandlung in den MEF ctrl (A) und den MEF Lig IV^{-/-} (B) Zelllinien, hingegen kein signifikanter Effekt von CTPi2 in den MEF Rad 54^{-/-} (C) Zellen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (N=3). Statistische Signifikanz: Two-Way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post-test. Ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

4.2.5 Einfluss der Behandlung von gentechnisch veränderten MEF Zellen mit spezifischen Inhibitoren des EJ-Signalweges auf die DNA-Reparatur

Zur weiteren Bestätigung der bisherigen Ergebnisse wurde die Kinetik der γ H2AX-foci in den isogenen MEF-Zelllinien mit DNA-Reparaturdefekten in Kombination mit Inhibitoren des EJ-Signalweges (PJ34 (PARPi), NU7441 (DNAPKi)) und CTPi2-

Behandlung untersucht. Die verwendeten Inhibitoren des EJ-Signalweges (PARP Inhibitor (PJ34, 4 μ M), DNA-PK Inhibitor (NU7441, 2,5 μ M)) inhibieren an unterschiedlichen Stellen den EJ-Signalweg und werden zum Teil bereits klinisch genutzt, z.B. in der Behandlung von Mammakarzinomen. Dabei lag diesem Experiment folgende Überlegung zugrunde: Erstens sollte in einer Zelllinie mit einem Defekt einer der beiden Hauptreparaturwege, also HRR oder NHEJ, ein Inhibitor des jeweils anderen Reparaturweges einen Effekt auf die Anzahl der Residualen γ H2AX-foci zeigen, da dadurch beide DNA-Reparaturwege ausgeschaltet werden. Zweitens sollte sich, wenn eine Zelllinie mit einem Defekt einer der beiden Hauptreparaturwege hingegen mit einem Inhibitor gegen den bereits ausgeschalteten DNA-Reparaturweg behandelt wird, kein Effekt auf die Anzahl der residualen γ H2AX-foci zeigen. Die Ergebnisse unserer Versuche sind in Abbildung 18 graphisch dargestellt.

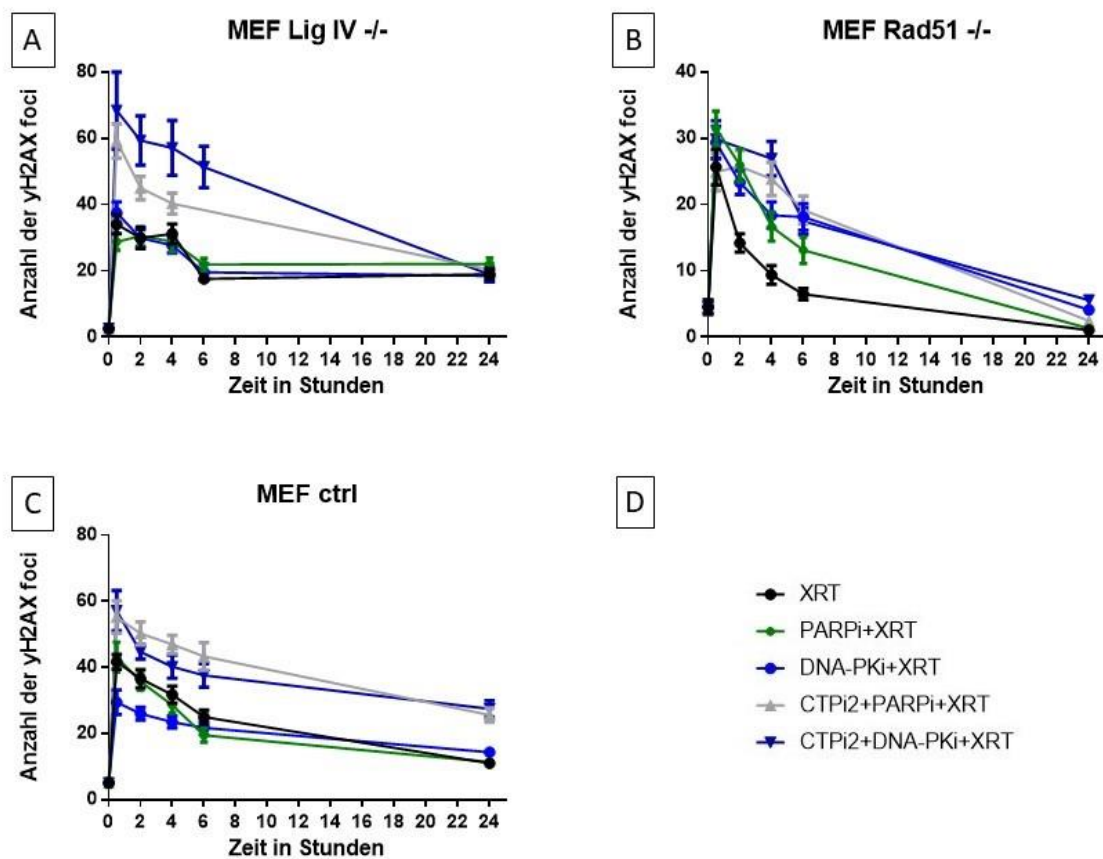


Abbildung 18 Effekt der Kombination verschiedener DNA Reparatur Inhibitoren auf die γ H2AX Kinetik bei gentechnisch veränderten Zellen

Untersuchung der Kinetik der γ H2AX-foci in den Zelllinien MEF ctrl, MEF Lig IV -/- und MEF Rad51 -/- mit verschiedener Vorbehandlung. Dabei wurden die Wirkstoffe PARPi, DNA-PKi und CTPi2 zum Teil kombiniert und

die Zellen anschließend bestrahlt (XRT). Die untersuchten Zeitpunkte waren 0,5, 2, 4, 6 und 24 Stunden nach Bestrahlung. Der Index (D) gilt dabei sowohl für die MEF Lig IV *-/-* (A), MEF Rad 54 *-/-* (B) als auch für die MEF ctrl (C). Sämtliche Zellen wurden mit 5 Gy bestrahlt und entsprechend ihrer Gruppe nur mit DNA-PK Inhibitoren (grün), nur mit PARP Inhibitoren (blau, Kreis) oder in Kombination mit CTPi2 (graues und blaues Dreieck) behandelt. Es zeigen sich deutliche Unterschiede der γ H2AX Kinetik in den MEF Zelllinien abhängig davon, welcher Wirkstoff bzw. welche Wirkstoff-Kombination als Vorbehandlung hinzugegeben wurde. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (N=3).

Auch dieses Experiment stärkte unsere Annahme, dass sich die Inhibierung von SLC25A1 durch den Anstieg der D2HG Level auf den HRR-DNA Reparaturweg auswirkt. So zeigte sich in den MEF Lig IV *-/-* Zellen kaum ein Effekt auf die Anzahl der residualen γ H2AX-foci nach Applikation der EJ Inhibitoren (PJ34, NU7441) alleine, sondern erst bei der zusätzlichen Kombination mit CTPi2. Währenddessen konnte eine zusätzliche Applikation vom CTPi2 in Kombination zu den EJ Inhibitoren (PJ34, NU7441) in den MEF Rad 54 *-/-* Zellen keinen signifikanten Anstieg der residualen γ H2AX-foci bewirken. Spannenderweise erhöhte die Kombinationsbehandlung von CTPi2 mit EJ Inhibitoren die Anzahl der residualen γ H2AX-foci in der MEF-Kontrollzelllinie. Diese Beobachtung bestärkte die Vermutung, dass es möglich sein könnte, durch die Kombination von EJ-Inhibitoren (DNA-PKi und PARPi) und CTPi2 jeweils zwei wichtige DNA-Reparatursignalwege zu inhibieren, um so eine synthetische Letalität zu schaffen.

4.3 Die Erzeugung einer synthetischen Letalität

Die grundsätzlichen Überlegungen, ob es bei einer Kombination von Wirkstoffen, die die Homologe Rekombination bzw. die Nicht-homologe Endverknüpfung inhibieren, dazu führen, dass wir eine synthetische Letalität erzeugen, wurden bereits unter 1.4 beschrieben. Diese Vermutung wurde in dieser Arbeit sowohl mithilfe des Koloniebildungsassay als auch mithilfe des γ H2AX-Assay überprüft. Im nachfolgenden Abschnitt wird neben dem ersten Hit, der Strahlung, und dem zweiten Hit, der Inhibition von SLC25A1 durch eine Behandlung mit CTPi2 und Erzeugung einer metabolisch-induzierten HRR-defizienz, nun ein dritter Hit durch eine Inhibition von klassischem oder alternativem EJ durch DNA-PKi oder PARPi appliziert (Abb. 19).

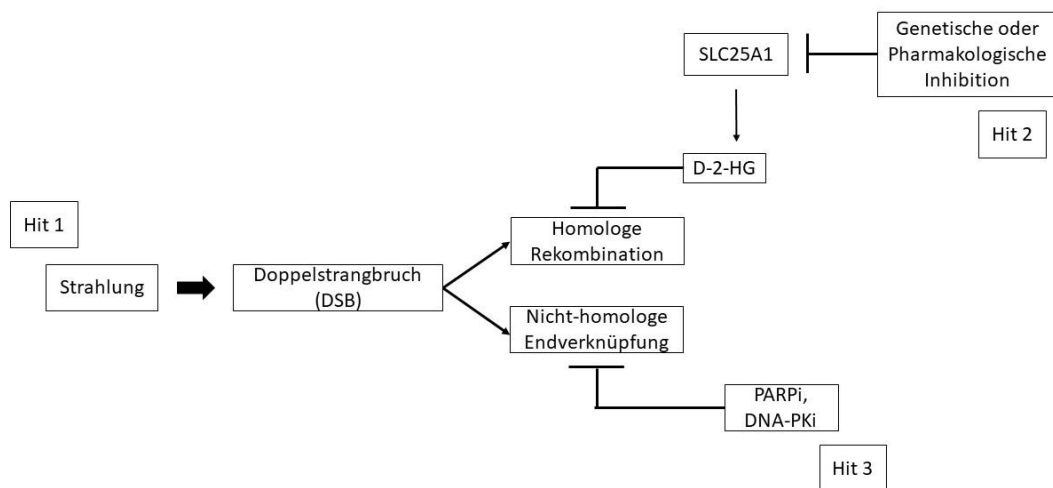


Abbildung 19 Schematische Darstellung der Erzeugung einer synthetischen Letalität mittels 3 Hits

Der durch Strahlung induzierte Doppelstrangbruch in der DNA der Zielzelle stellt den ersten Hit dar. Die Zelle hat nun zwei Hauptmöglichkeiten der DNA-Reparatur: Homologe Rekombination (HRR) oder die Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ). Letztes kann man bereits klinisch mit PARPi (alternatives Endjoining) oder aber mit DNA-PKi (klassisches Endjoining) unterdrücken. Da die Nutzung von CTPi2 bisher die Vermutung zulässt, dass über D2HG die HRR inhibiert wird, unterdrückt dieser Wirkstoff oder alternativ siRNA gegen SLC25A1 als genetische Möglichkeit die Reparatur strahleninduzierter DANN Doppelstrangbrüche über den HRR Reparatur (HRR)Weg.

4.3.1 Auswirkungen einer kombinierten Therapie von durch SLC25A1-Inhibition erzeugten HRR-Defizienz und der Applikation von EJ-Inhibitoren auf die Kinetik der γ H2AX-foci in Tumorzellmodellen der NSCLC (A549, NCI-H460) und GBM (T98G und U87MG)

Wie bereits unter zuvor beschrieben wurde der Effekt der Behandlung mit CTPi2 auf die Anzahl der strahleninduzierten γ H2AX-foci in den Zelllinien des NSCLC (A549 und NCI-H460) als auch in Glioblastom-Zelllinien (U87MG und T98G) getestet. Man erkennt, dass die Kombinationsbehandlung (CTPi2+PJ34 oder CTPi2+ NU7441) zu einer deutlichen Steigerung der γ H2AX-foci führt, im Vergleich zu einer singulären Behandlung mit CTPi2. Außerdem wird eine Abhängigkeit der Wirkung von der

Zellentität sichtbar. So reagieren A549 (A) und NCI-H460 (C) als NSCLC sehr gut auf DNA-PKi, jedoch kaum auf PARPi. In den Glioblastom Zelllinien U87MG (B) und T98G (D) war der Effekt von PARPi und DNA-PKi dagegen nahezu identisch (Abb. 20).

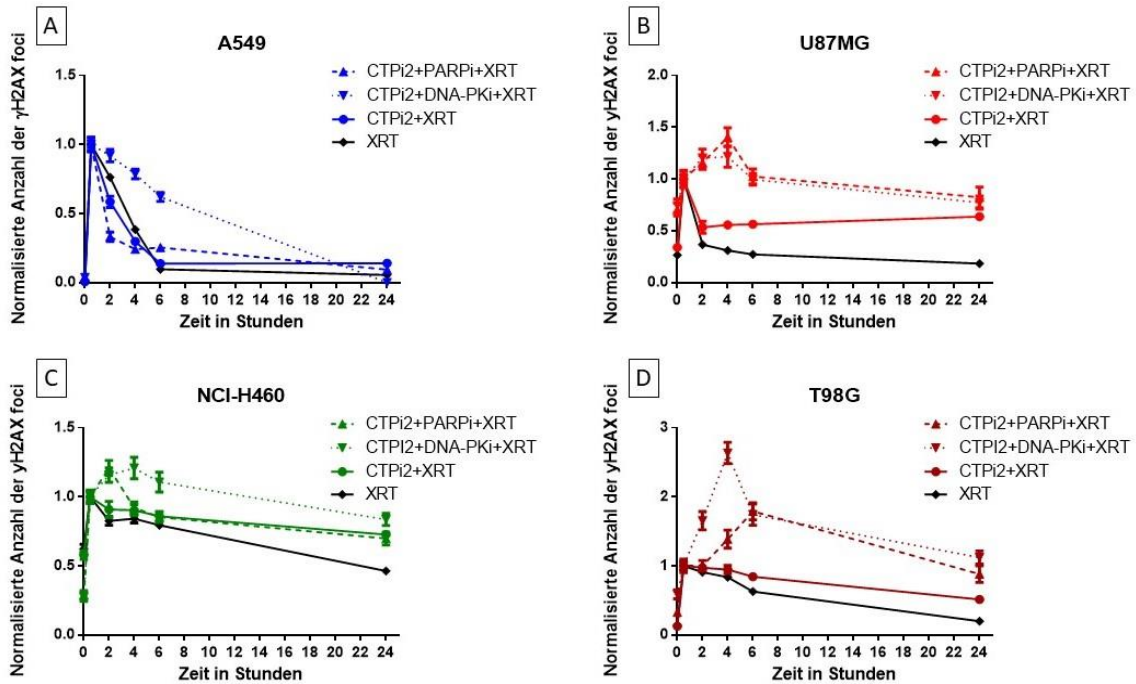


Abbildung 20 Effekt einer Kombinationsvorbehandlung mittels CTPi2 bzw. kombiniert mit PARPi oder DNA-PKi auf die Kinetik der γ H2AX-foci nach Bestrahlung mit einer Dosis von 5 Gy

Untersucht wurden die Zelllinien A549 (A), U87MG (B), NCI-H460 (C) und T98G (D) nach Bestrahlung (XRT) mit 5 Gy. Wir teilten jede Zelllinie in vier Gruppen ein, von denen eine Gruppe nur bestrahlt wurde, eine Gruppe zusätzlich mit CTPi2 vor der Bestrahlung vorbehandelt wurde und in der dritten bzw. vierten Gruppe zusätzlich zur Strahlung und CTPi2 ein PARP (PJ34, 4 μ M) oder DNA-PK (NU7441, 2,5 μ M) Inhibitor zugefügt wurden. Auch hierbei wurden die Zellen zwei Stunden vor der Bestrahlung mit den jeweiligen Wirkstoffen oder Wirkstoffkombinationen behandelt und entsprechend der geplanten Zeitpunkte nach 0,5, 2, 4, 6 und 24 Stunden fixiert. Die Werte wurden auf die Anzahl der γ H2AX-foci 30 Minuten nach Bestrahlung normalisiert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (N=3).

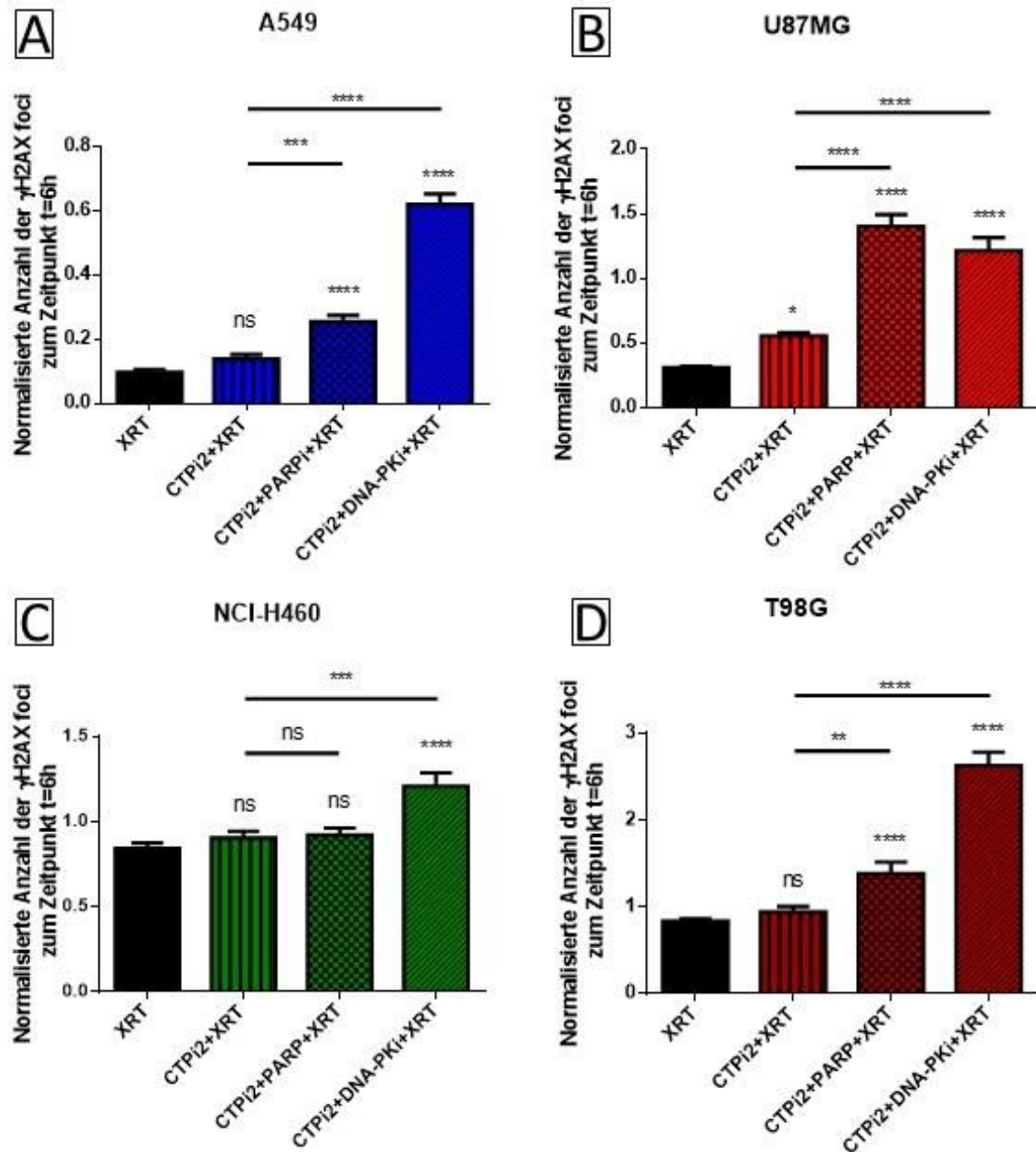


Abbildung 21 Effekt einer Kombinationsvorbehandlung mittels CTPi2 bzw. kombiniert mit PARPi oder dem DNA-PK Inhibitor NU7441 auf die Anzahl der residualen γ H2AX-foci nach Bestrahlung mit einer Dosis von 5 Gy zum Zeitpunkt t=6h

Darstellung der normalisierten Anzahl der γ H2AX foci in Zelllinien A549 (A), U87MG (B), NCI-H460 (C) und T98G (D) sechs Stunden nach Bestrahlung mit einer Dosis von 5 Gy alleine oder in Kombination mit PARP oder DNA-PK Inhibitoren. Dabei unterscheiden sich die Vorbehandlungen: Keine Vorbehandlung (XRT), Vorbehandlung mit CTPi2 (CTPi2+XRT), Vorbehandlung mit PARP Inhibitor (PJ34) und CTPi2 (CTPi2+PARPi+XRT) und Vorbehandlung mit dem DNA-PK Inhibitor (NU7441) und CTPi2 (CTPi2+DNA-PKi+XRT). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte (\pm SEM) aus drei unabhängigen Experimenten (N=3). Statistische Signifikanz: One-

Way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post-test. Ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

In einem nächsten Schritt wurden die Effekte der Kombinationsbehandlungen auf die Kinetik der Zu- bzw. Abnahme von γ H2AX foci analysiert (siehe Abb. 21). Es ist deutlich zu erkennen, dass sich in jeder der vier untersuchten Zelllinien die Kinetik der γ H2AX-foci verändert und die Anzahl der residualen γ H2AX-foci nach einer Kombinationsbehandlung (CTPi2+EJ-inhibitor) auch im Vergleich zu den zuvor durchgeführten Versuchen mit der alleinigen Behandlung mit CTPi2 erhöht wird. Da eine Steigerung der Anzahl der residualen γ H2AX-foci bei gleichzeitiger Benutzung von EJ-inhibitoren (PARPi oder DNA-PKi) erreicht wird, unterstützt dieses Experiment weiterhin die Hypothese, dass CTPi2 einen Effekt auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels HRR hat und somit eine Art "HRR-Defizienz" induziert.

4.3.2 Auswirkungen von kombinierter Inhibition von SLC25A1 und PARP bzw. DNA-PK auf das Überleben der Zellen

Um den Effekt einer kombinierten Behandlung auf das Überleben der Zellen zu untersuchen, führten wir erneut ein Koloniebildungsassays durch. Dieses Mal wurden die Zelllinien in sechs Gruppen (1. Bestrahlung (XRT), 2. XRT+CTPi2, 3. XRT+PARPi, 4. XRT+DNA-PKi, 5. XRT+CTPi2+PARPi, 6. XRT+CTPi2+DNA-PKi.), in Abhängigkeit von den verwendeten Behandlungen, eingeteilt. Bestrahlt wurde jede der Gruppen. Die Ergebnisse der berechneten Überlebensfraktionen (SF) in Abhängigkeit von der Strahlendosis sind in Abbildung 22 und 23 dargestellt.

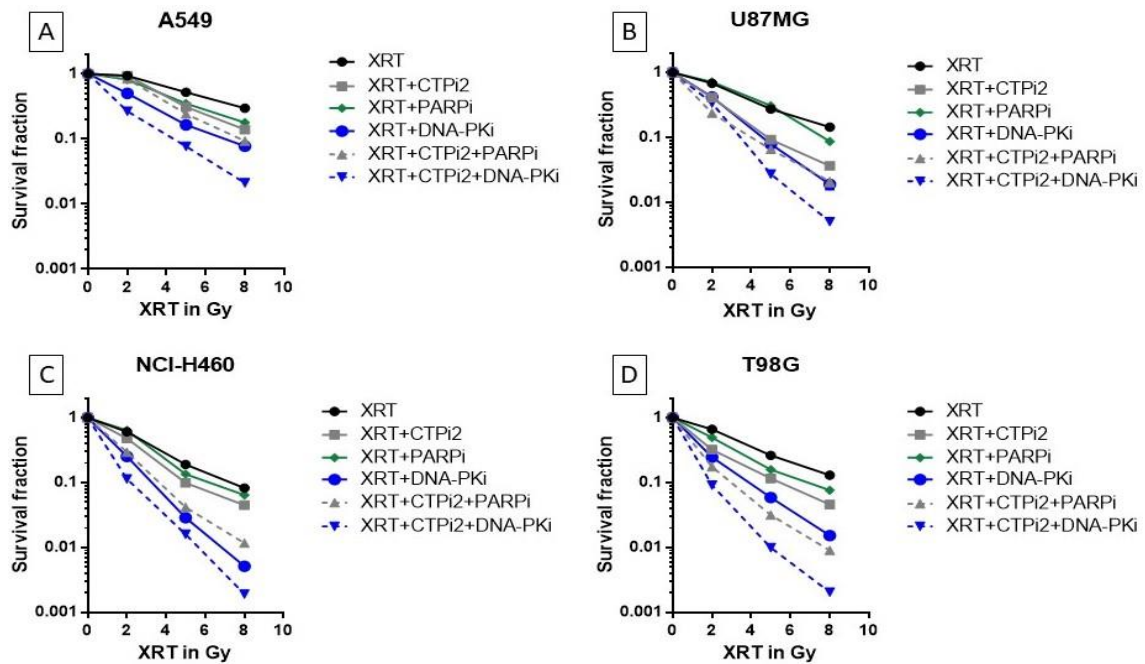


Abbildung 22 Überleben von vier Zelllinien nach Kombinationsbehandlung von CTPi2 mit PJ34 oder NU7441

Die Zelllinien A549 (A), U87MG (B), NCI-H460 (C) und T98G (D) wurden direkt plattiert und mit verschiedenen Kombinationen aus CTPi2, PARPi und DNA-PKi vorbehandelt und zwei Stunden später bestrahlt. Acht bis zehn Tage lang wurden diese anschließend inkubiert, mit Coomassie-Lösung blau gefärbt und mittels Software (Gel Count) ausgewertet. Danach wurde die Anzahl der gebildeten Kolonien identischer Bestrahlung verglichen und die daraus errechnete Überlebensfraktion (Survival fraction) gegen die Strahlendosis aufgetragen. Es zeigte sich eine signifikant verringerte SF in den Gruppen, welche kombiniert behandelt wurden im Vergleich zu einer nur aus einem Wirkstoff bestehenden Therapie. Es zeigte sich auch hier wieder eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Zellen gegenüber den Inhibitoren der EJ-Signalwege. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (N=3).

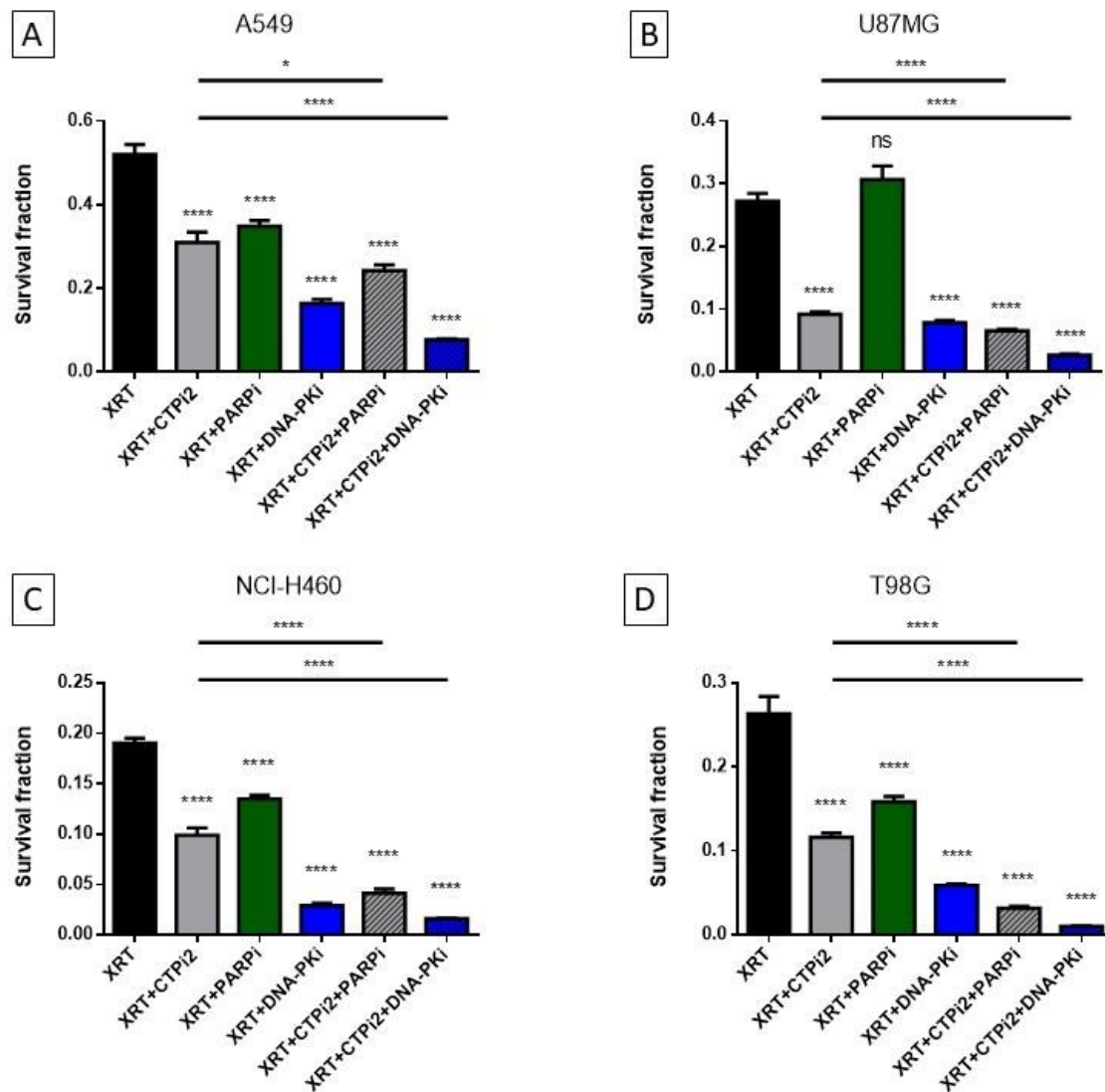


Abbildung 23 Überlebensfraktion von vier Zelllinien nach Kombinationsbehandlung von CTPi2 mit PJ34 oder NU7441, dargestellt für die Bestrahlung mit einer Dosis von 5 Gy

Die Zelllinien A549 (A), U87MG (B), NCI-H460 (C) und T98G (D) wurden direkt plattiert und mit verschiedenen Kombinationen aus CTPi2, PARPi (PJ34) und DNA-PKi (NU7441) vorbehandelt und zwei Stunden später bestrahlt. Acht bis zehn Tage lang wurden diese anschließend inkubiert, mit Coomassie-Lösung blau gefärbt und mittels Software (Gel Count) ausgewertet. Danach wurde die Anzahl der gebildeten Kolonien mit einer Bestrahlung von 5 Gy verglichen und die daraus errechnete Überlebensfraktion (Survival fraction) gegen die Strahlendosis aufgetragen. Es zeigte sich eine signifikant verringerte SF in den Gruppen, welche kombiniert behandelt wurden im Vergleich zu einer nur aus einem Wirkstoff bestehenden Therapie. Es zeigte sich auch hier wieder eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Zellen gegenüber den Inhibitoren der EJ-Signalwege. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte (\pm SEM) aus drei unabhängigen Experimenten (N=3). Statistische Signifikanz: One-Way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post-test. Ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Die durchschnittliche Reduzierung der Überlebensfraktion (SF) nach Kombinationstherapie von XRT, CTPi2 und DNA-PKi (NU7441) betrug 90,4% verglichen mit einer Monotherapie der Zellen mit CTPi2 vor der Bestrahlung. Diese Ergebnisse zusammen mit denen der vorherigen Experimente liefern uns nicht nur weitere Hinweise dafür, dass es sich bei der Wirkweise von CTPi2 um eine Inhibition der Homologen Rekombination handelt, sondern auch, dass eine Kombination von SLC25A1 inhibierenden Wirkstoffen mit Endverknüpfung-Inhibitoren eine synthetische Letalität und somit eine Sensitivierung gegenüber der zytotoxischen Wirkung einer Strahlentherapie erzeugen kann. Interessant ist aber auch weiterhin, dass es deutlich abhängig von der Tumorentität zu sein scheint, auf die Inhibition welcher der Endverknüpfung-Signalwege die Zelle in Kombination mit CTPi2 sensibler reagiert.

4.4 Inhibition von SLC25A1 zur Sensibilisierung gegenüber der Bestrahlung mit Protonen

Die bisher erzeugten Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass SLC25A1 Inhibition über eine Erhöhung der 2HG-Level zu einer negativen Beeinflussung der HRR-DNA-Reparatur führt und somit die Tumorzelllinien sensitiver gegenüber Inhibitoren der EJ-Signalwege macht. Diese Hypothese lässt sich auch in Verbindung mit der Protonenbestrahlung testen. Wie bereits unter 2 beschrieben wird vermutet, dass Protonen-Bestrahlung eine komplexere Form von DNA-Schäden (Doppelstrangbrüchen) in den Zellen auslöst als eine Therapie mit Photonen (X-Rays), und daher wahrscheinlich eine höhere Abhängigkeit von einer Reparatur mithilfe der Homologen Rekombination aufweisen (Grosse et al., 2014; Szymonowicz et al. 2020). Somit stellt sich die Frage, ob die Inhibition von SLC25A1 mittels CTPi2, die zur Verminderung der HRR-vermittelten DNA-Reparatur führt, nach der Bestrahlung mit Protonen zu einem Anstieg der γ H2AX-foci und zu einer verstärkten Sensitivierung gegenüber Protonenbestrahlung führt. Um dies zu untersuchen, führten wir erneut einige bereits zuvor genutzte Experimente durch, indem wir die Effekte der Protonenbestrahlung in Kombination mit SLC25A1-Inhibition mittels CTPi2 auf das Kurz- und Langzeitüberleben der Zellen sowie deren Reparaturkinetik von DSBs untersucht haben.

4.4.1 Auswirkungen auf das Langzeitüberleben der Zellen bei Nutzung eines Protonenstrahls und einer Vorbehandlung mit CTPi2

Um eine Vergleichbarkeit der Effekte von Photonen gegenüber Protonen-Bestrahlung zu erreichen, wiederholten wir das Koloniebildungsassay mit den zuvor beschriebenen NSCLC- (A549, NCI-H460) und Glioblastom-Zelllinien (T98G, U87MG). Dafür teilten wir diese in jeweils zwei Gruppen auf, von denen beide bestrahlt, jedoch nur eine Gruppe zwei Stunden vor geplanter Bestrahlung mit CTPi2 behandelt wurde. Da eine Protonenstrahlung eine ungleich höhere Aktivierung der Umgebung im Vergleich zur konventionellen Photonentherapie bewirkt, wurde die Strahlendosis auf 2, 4 und 6 Gy reduziert, da bei einer noch höheren Dosis es nicht möglich gewesen wäre, in späteren Experimenten die 0,5 und zwei Stunden Zeitpunkte rechtzeitig aufzuarbeiten und zu analysieren. Es wurde erneut die Überlebensfraktion der noch vorhandenen Kolonien (Survival fraction, SF) gegen die Strahlendosis in Gy aufgetragen. Die Daten sind in Abbildung 24 dargestellt.

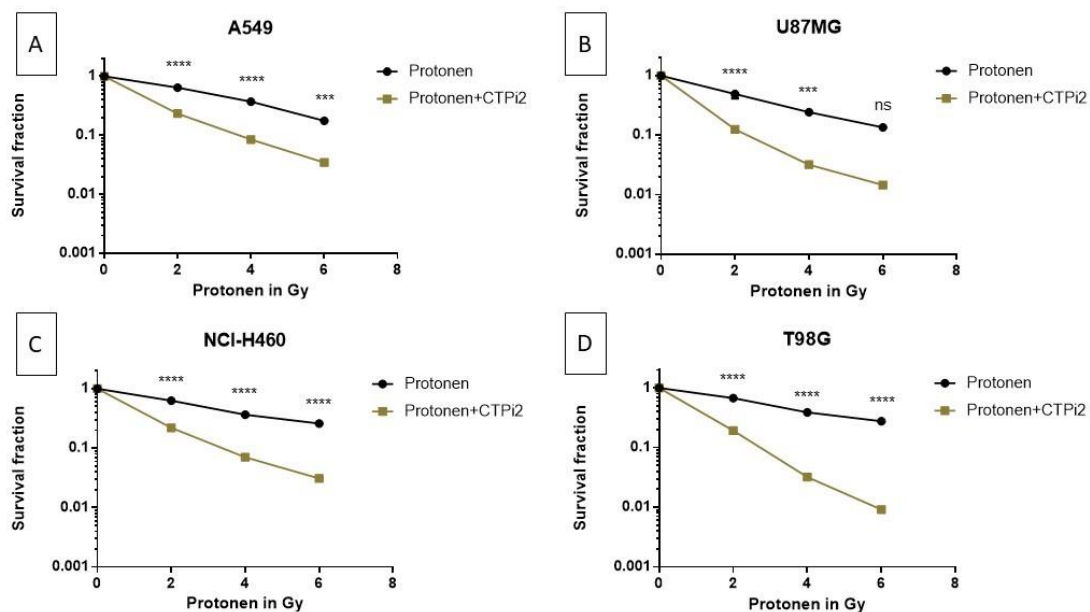


Abbildung 24 Langzeitüberleben von vier verschiedenen Tumor-Zelllinien in Abhängigkeit der Vorbehandlung mit CTPi2 und anschließender Protonenbestrahlung

Zu sehen sind die Zelllinien A549 (A), U87MG (B), NCI-H460 (C) und T98G(D), welche direkt plattiert wurden und in jeweils einer Gruppierung mit CTPi2 Vorbehandlung und ohne. Die jeweils behandelten Zellen wurden mit CTPi2 vorbehandelt und zwei Stunden später mit 0-6 Gy Bragg-peak Protonen bestrahlt. Acht bis zehn Tage lang wurden diese anschließend inkubiert, mit Coomassie-Lösung blau gefärbt und mittels Software (Gel Count) ausgewertet.

Danach wurde die Anzahl der gebildeten Kolonien identischer Bestrahlung verglichen und die daraus errechnete Überlebensfraktion (SF) gegen die Strahlendosis (2, 4 und 6 Gy) aufgetragen. Es zeigte sich in allen Zelllinien eine signifikante Reduzierung der Überlebensfraktion, wenn die Zelllinien mit CTPI2 vorbehandelt wurden im Vergleich zu einer einfachen Behandlung mit Protonen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (N=3).

Die Inhibition von SLC25A1 mittels CTPI2 in Kombination mit der Protonentherapie zeigt eine deutliche Reduzierung der Überlebensfraktion gegenüber der Behandlung mit Photonen und somit eine Sensitivierung gegenüber der Bestrahlung mit Protonen. Vor allem ist zu erkennen, dass es zumindest in den von uns betrachteten Entitäten, NSCLC und Glioblastom Zellen, keine großen Unterschiede in der Sensitivität gegenüber der Kombinationsbehandlung von CTPI2 und Protonenbestrahlung gab. Die verwendeten Zelllinien zeigten bereits bei einer Protonendosis von 4 Gy eine Reduktion der Überlebensfraktion.

Um einen besseren Vergleich zwischen der Bestrahlung mit Photonen oder Protonen auf die Zelllinien zu zeigen, wurden exemplarisch die Überlebensfraktionen der NCI-H460 und A549 Zelllinien aus dem vorherigen Koloniebildungsassay (Abb. 22) nach der Bestrahlung mit Photonen mit denen nach der Bestrahlung mit Protonen verglichen. Dieser Vergleich ist in Abbildung 25 dargestellt.

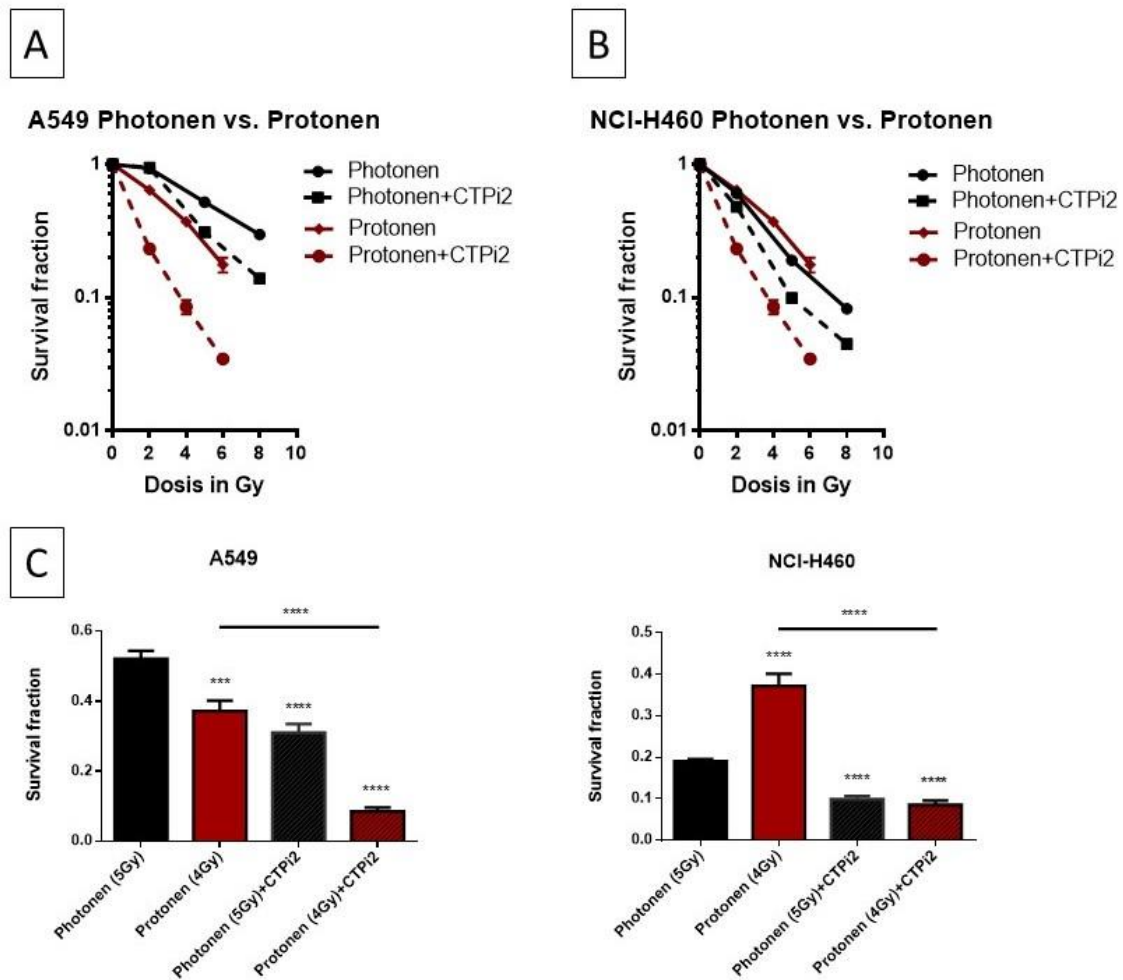


Abbildung 25 Vergleich der Radiosensitivität von mit CTPI2 und Protonen vs. Photonen behandelten Zelllinien

Die Darstellung der Überlebensfraktionen (SF) der mit Photonen (5 Gy) oder Protonen (4 Gy), mit oder ohne Behandlung mit CTPI2, bestrahlten Zelllinien A549 (A) und NCI-H460 (B). Die Bestrahlung mit 4 Gy bzw. 5 Gy wird gesondert als Balkendiagramm dargestellt (C). Dabei repräsentieren die schwarzen Linien die SF nach der Bestrahlung mit Photonen und die rotbraunen Linien die SF nach Protonenbestrahlung. Dabei wurde von beiden Strahlenformen jeweils die Gruppe mit reiner Bestrahlung und die mit vorheriger CTPI2 Behandlung aus Abbildung 22 übernommen. Aufgetragen wurde die Strahlendosis (A+B) bzw. die Strahlendosis inklusive Vorbehandlung (C) gegen die SF. Beide Zelllinien zeigen eine signifikant verringerte SF nach einer Kombinationsbehandlung mit CTPI2 und Bestrahlung mit Protonen verglichen mit Photonen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte (\pm SEM) aus drei unabhängigen Experimenten (N=3). Statistische Signifikanz: One-Way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post-test. Ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Interessant ist, dass Unterschiede der Sensitivität in den Zelllinien gegenüber der verwendeten Strahlungsform zu beobachten waren. So war die SF bei den A549 insgesamt bereits deutlich geringer nach der alleinigen Bestrahlung mit Protonen im Vergleich zur Photonenbestrahlung. Die Inhibition von SLC25A1 führte bei beiden Strahlenarten zu einer Radiosensitivierung. Allerdings war die Sensitivierung bei der Protonenbestrahlung deutlicher ausgeprägt als bei der Photonenbestrahlung, obwohl eine geringere Protonendosis (4 Gy) verwendet wurde (Photonendosis 5 Gy). Bei der NCI-H460 Zelllinie hingegen zeigten die Bestrahlung mit Photonen und Protonen ähnliche Effekte auf das klonogene Zellüberleben. Auch in diesen Zellen wurde die SF durch die Kombinationsbehandlung mit CTPi2 deutlicher nach Protonenbestrahlung reduziert, als nach einer Bestrahlung mit Photonen.

4.4.2 Auswirkungen der Kombination von CTPi2 mit Protonentherapie auf die DNA-Reparatur

Auch die Kinetik der DNA-Reparatur wurde nach Bestrahlung mit Protonen mit und ohne Behandlung mit CTPi2 mittels der Detektion von γ H2AX-foci untersucht, um Unterschiede zwischen Photonen- und Protonentherapie nach CTPi2 Behandlung festzustellen. Der Versuchsaufbau und Ablauf war dabei genau wie bereits zuvor beschrieben (siehe 4.1.4). Es erfolgte eine Aufteilung der vier verwendeten Zelllinien in zwei Gruppen, von denen eine nur bestrahlt und die zweite zwei Stunden vor Bestrahlung mit CTPi2 behandelt wurde. Außerdem gab es eine Kontrollgruppe, welche nur mit CTPi2 behandelt wurde. Zu den Zeitpunkten 0,5, 2, 4, 6 und 24 Stunden nach Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und anschließend gefärbt, mikroskopiert und mit der Imaris-Software ausgewertet. Die entstandenen Daten sind in den Abbildungen 26 und 27 zu

finden.

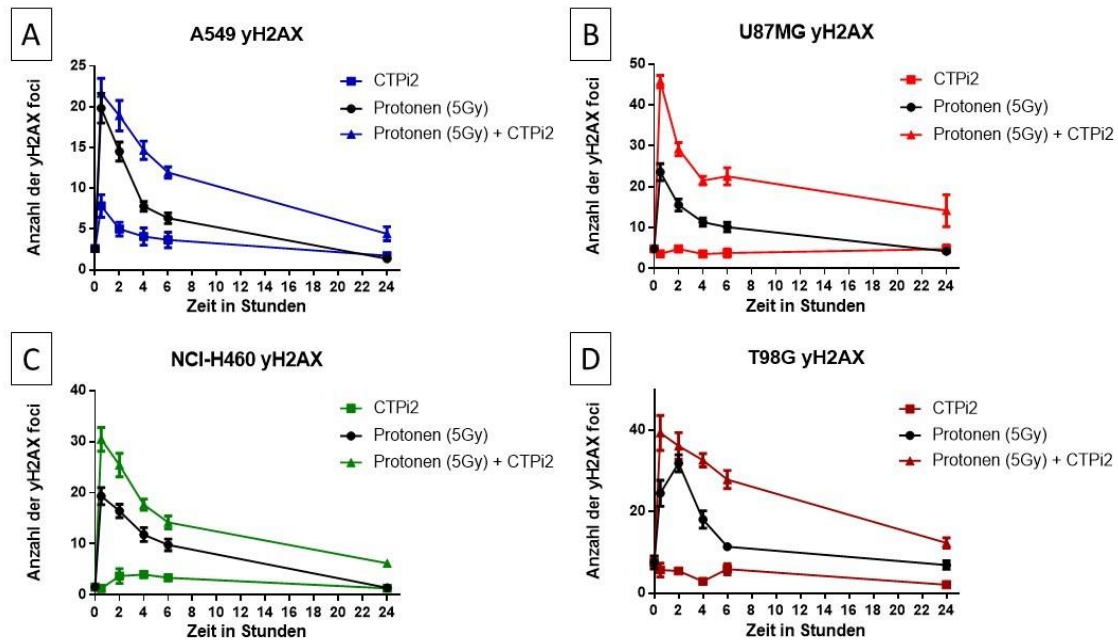


Abbildung 26 Effekte der Strahlentherapie mit Protonen nach Vorbehandlung mit CTPi2 auf die Reparatur der DNA-Schäden

Untersuchung der Kinetik der γ H2AX-foci in den Zellen mit Vorbehandlung mit CTPi2 und ohne CTPi2 vor einer Strahlenbehandlung mittels Protonen (5 Gy) bei den Zelllinien A549 (A), U87MG (B), NCI-H460 (C) und T98G (D). Es wurden bei jeder Zelllinie zwei Stunden vor Bestrahlung 200 μ M CTPi2 hinzugefügt. Die untersuchten Zeitpunkte waren 0, 5, 2, 4, 6 und 24 Stunden nach Bestrahlung, dabei wurde die Anzahl der γ H2AX-foci mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Dabei erkennt man einen geringen Effekt von CTPi2 alleine, einen deutlichen Effekt nach Bestrahlung mit Protonen und den in allen vier Zelllinien stärksten Effekt bei der Kombinationstherapie mit CTPi2 und Protonen auf die Anzahl der γ H2AX-foci. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (N=3).

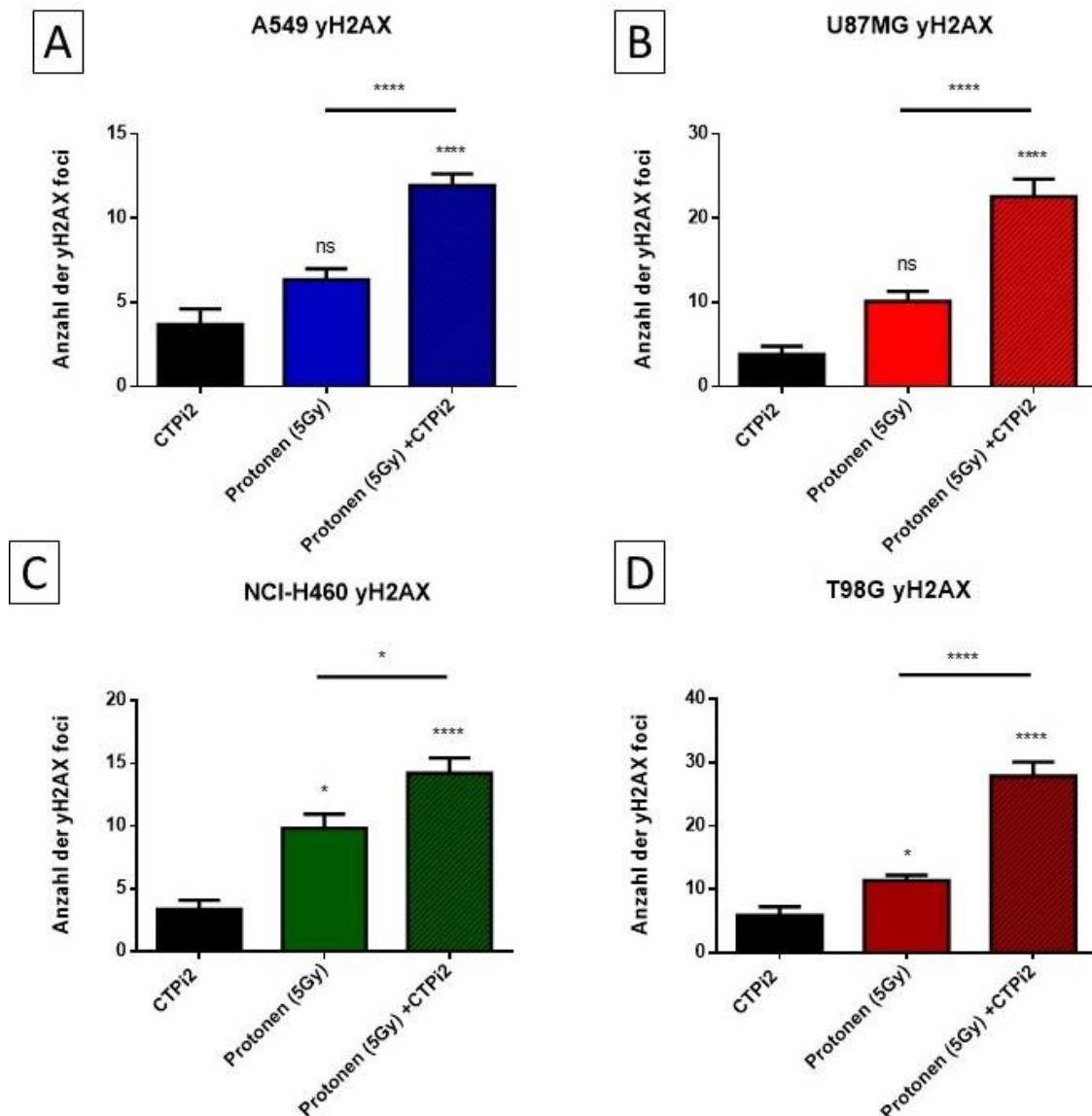


Abbildung 27 Effekte der Strahlentherapie mit Protonen nach Vorbehandlung mit CTPi2 auf die Reparatur der DNA-Schäden und die Auswirkungen auf die γ H2AX-foci zum Zeitpunkt t=6 Stunden

Die Zelllinien A549 (A), U87MG (B), NCI-H460 (C) und T98G (D) wurden entweder mit 200 μ M CTPi2 vorbehandelt und belassen oder 2 Stunden später mit einer Protonenbestrahlung von 5 Gy behandelt oder ohne vorherige CTPi2 Behandlung mit Protonen behandelt. Anschließend wurde zu den Zeitpunkten 0, 5, 2, 4, 6 und 24 Stunden nach Bestrahlung, die γ H2AX-foci mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Hier zu sehen ist der Vergleich der 3 Gruppen zum Zeitpunkt 6 Stunden nach der Bestrahlung. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (N=3). Statistische Signifikanz: One-Way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post-test. ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Es zeigte sich erneut, dass CTPi2 den Effekt einer Strahlentherapie mit Protonen steigert. Dabei lag die Anzahl der γ H2AX-foci in den getesteten Zelllinien unter der Anzahl, die nach Photonentherapie gemessen wurde (siehe Abb. 11).

Anschließend wurde die HRR-vermittelte DNA-Reparatur mittels Rad51-foci gemessen. Dieses Experiment sollte den Effekt von CTPi2 auf die HRR-vermittelte DNA-Reparatur bekräftigen.

Die Färbung mit RAD51-Antikörper wurde zeitgleich mit der γ H2AX-Färbung durchgeführt. Die Durchführung ist unter 3.2.4.1.2 beschrieben. Ebenfalls wurden diese Zellen in drei Gruppen aufgeteilt und entsprechend nur mit CTPi2, nur mit Protonenstrahl oder kombiniert mit Protonen und CTPi2 behandelt. Die Zeitpunkte liegen ebenfalls wieder bei 0, 5, 2, 4, 6 und 24 Stunden nach Bestrahlung mit 5 Gy. Zu beachten ist außerdem die veränderte Kinetik von Rad51-foci im Vergleich zu der der γ H2AX-foci. Der Anstieg erfolgt langsamer und später, wodurch Höhepunkte erst im Bereich von vier bis sechs Stunden nach Bestrahlung und nicht direkt nach 30 Minuten zu sehen sind. Dies erklärt sich über die Spezifität der Rad51-foci für die HRR. Da die HRR-vermittelte DNA-Reparatur erst in der S-Phase des Zellzyklus der Zelle stattfinden kann, und dadurch genauer aber auch langsamer ist, beginnt sie erst nachdem die Zellen die S-Phase erreicht haben. In Abbildung 28 und 29 sind nun die Daten des Versuchs präsentiert.

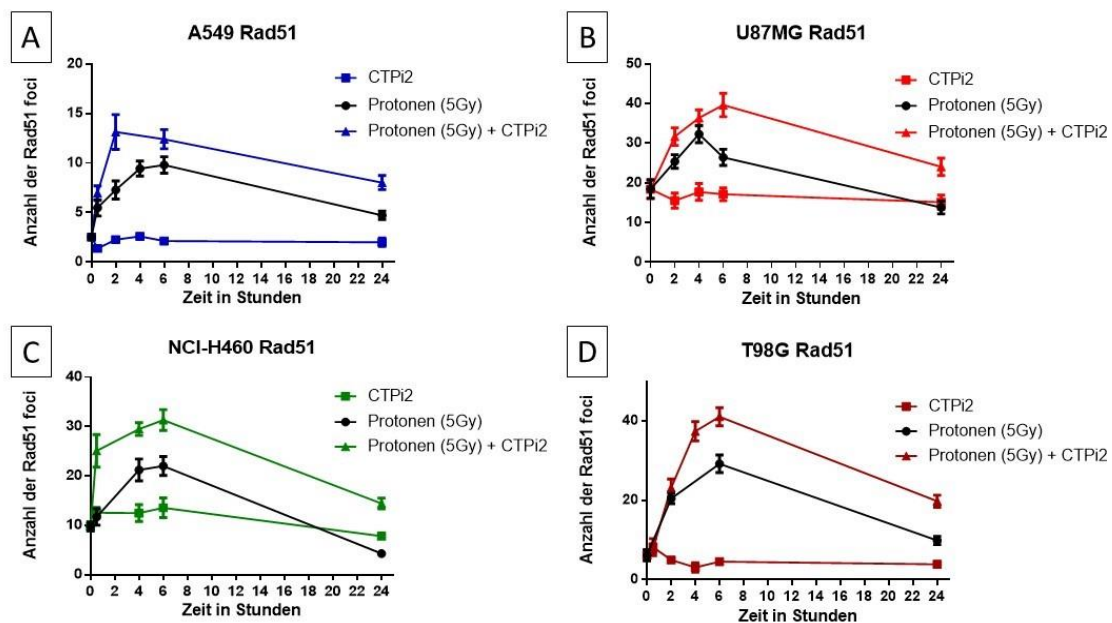


Abbildung 28 Effekte der Strahlentherapie mit Protonen nach Vorbehandlung mit CTPi2 auf die Rad51 Kinetik in verschiedenen Tumorzelllinien

Die Zelllinien A549 (A), U87MG (B), NCI-H460 (C) und T98G (D) wurden entweder mittels CTPi2 vorbehandelt und 2 Stunden später mit 5 Gy Protonen bestrahlt oder belassen, oder sie wurden ohne vorherige Vorbehandlung bestrahlt. Zu den Zeitpunkten 0, 5, 2, 4, 6 und 24 Stunden nach Protonen-Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und anschließend mit dem Rad 51 Antikörper gefärbt. Anschließend wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht und gegen die dabei gemessene Anzahl an Rad51-foci aufgetragen. Man sieht einen signifikanten Anstieg der Rad51-foci durch Kombinationstherapie mit CTPi2 und Protonen-Bestrahlung im Vergleich zur einfachen Bestrahlung. Deutlich zu erkennen ist jedoch auch in (B) und (C), dass CTPi2 selbst ohne Bestrahlung einen Einfluss auf die Rad51 Kinetik hat. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (N=3).

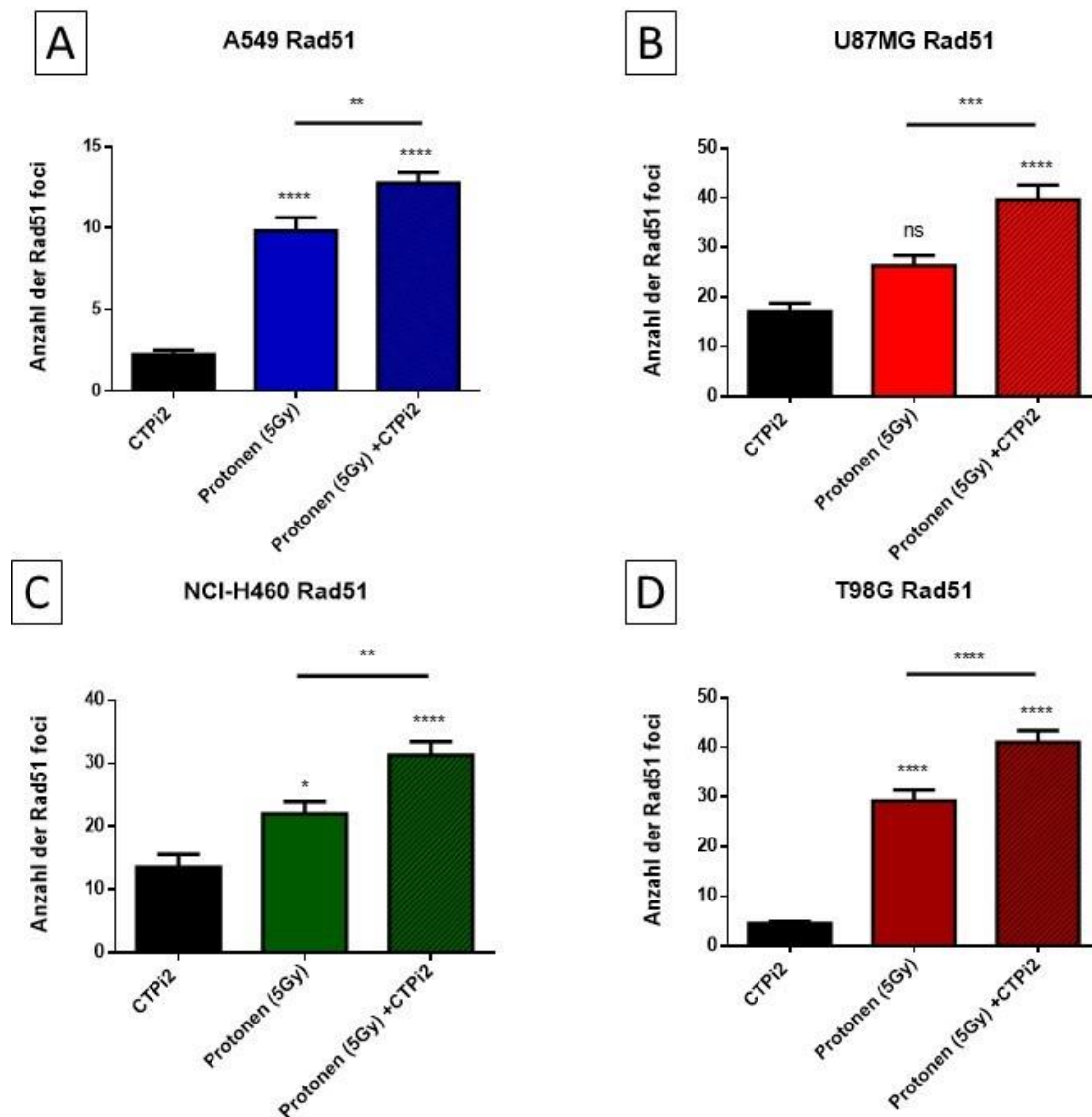


Abbildung 29 Effekte der Strahlentherapie mit Protonen nach Vorbehandlung mit CTPi2 auf die Rad51 Kinetik in verschiedenen Tumorzelllinien zum Zeitpunkt t=6 Stunden

Die Zelllinien A549 (A), U87MG (B), NCI-H460 (C) und T98G (D) wurden zu dem Zeitpunkt sechs Stunden nach Protonen-Bestrahlung untersucht und gegen die dabei gemessene Anzahl an Rad51-foci aufgetragen. Die Daten

repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (N=3). Statistische Signifikanz: One-Way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post-test. Ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Die Ergebnisse des Versuchs unterstützen noch einmal unsere Hypothese, dass durch SLC25A1-Inhibitor eine Störung der Homologen Rekombination hervorruft, und dass hierfür wahrscheinlich Effekte verantwortlich sind, die durch D2HG ausgelöst werden. Diese Hypothese wurde in dieser Arbeit durch unterschiedliche Untersuchungen unter Verwendung der Tumorzellen A549, U87MG, NCI-H460 und T98G, als auch gentechnisch veränderter MEF Zellen bestätigt. Auch die Nutzung unterschiedlicher Ansätze zur Inhibition von SLC25A1, ob pharmakologisch oder genetisch, bestätigte die Induktion von D2HG und eine damit einhergehende Beeinflussung der DNA-Reparatur auf dem Niveau von SLC25A1. Aufgrund dieser Daten scheint sich die weitere Untersuchung von SLC25A1 als unterstützende Behandlung bei Strahlungstherapien als wichtig und wertvoll für potenzielle spätere Patienten zu gestalten.

5 Diskussion

Die Krebsbehandlung besteht heute aus multimodalen Therapiemodellen, die ineinandergreifen, um den Patienten die optimale Behandlung zukommen zu lassen. Dabei stehen nach wie vor chirurgische wie auch strahlentherapeutische Ansätze im Vordergrund. Je wichtiger dabei die Behandlung mit Strahlung wird, desto größer werden jedoch auch die Probleme, welche sich aus der Heterogenität des Tumors und des Mikromilieus ergeben. Diese können zu einer direkten Resistenz der Tumorzellen gegenüber der Bestrahlung führen, z.B. durch genetische Aktivierung von DNA-Reparatur oder onkogenbedingten Veränderungen im Tumormetabolismus, und so die Gesamtbehandlung enorm erschweren (Hlouschek et al., 2018). Außerdem hat ein veränderter Tumormetabolismus häufig einen direkten Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung und die Aggressivität der Tumorzellen, da solche Veränderungen sich oft in Form einer schnelleren Proliferation und verbessertem Überleben der Krebszellen äußern (Hanahan & Weinberg, 2011). Des Weiteren können sowohl die Behandlung von Tumorzellen als auch ein ungünstiges Tumormikromilieu zur Adaptation der Tumorzellen und dadurch erworbene Resistenzen führen (Matschke et al., 2016; Matschke et al., 2016; Hlouschek et al., 2018; Hlouschek et al., 2018). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die molekularen Mechanismen der SLC25A1-regulierten Inhibition der HRR-vermittelten DNA-Reparatur sowie deren Einfluss auf das Tumorzellüberleben nach kombinierter Behandlung mit herkömmlichen DNA-Reparaturinhibitoren und Strahlentherapie zu erforschen.

Ich konnte im Laufe dieser Arbeit zeigen, dass eine pharmakologische oder genetische Inhibition des Citrat Transporters SLC25A1 in Kombination mit einer Bestrahlung sowohl das Kurz- als auch das Langzeitüberleben verschiedener Tumorzelllinien reduziert und somit den Effekt der Strahlentherapie verstärkt. Es zeigte sich auch, dass der durch SLC25A1-Inhibition ausgelöste Anstieg der D2HG-Level eine Störung der HRR-vermittelten DNA-Reparatur hervorruft und somit die Tumorzelllinien sensitiv gegenüber Inhibitoren der EJ-vermittelten DNA-Reparatur macht. In einem innovativen Ansatz gelang es darüber hinaus, die mittels Inhibition von SLC25A1 induzierte HRR-Defizienz in Kombination zu nutzen, um Tumorzellen gezielt gegenüber einer Protonenbestrahlung zu sensitivieren, und dadurch den Effekt der Protonentherapie zu verbessern.

5.1 Sensibilisierung der Tumorzelllinien für die Bestrahlung durch Inhibition von SLC25A1

Bereits in vorherigen Studien wurde gezeigt, dass eine Inhibition des mitochondrialen Transporters SLC25A1 mit einer Erhöhung der Strahlensensibilität in Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom-Zellen, den NCI-H460, einhergeht (Fernandez et al., 2018; Hlouschek et al., 2018). Des Weiteren wurden die Transportfunktionen des SLC25A1 mit Energie-Metabolismus, der Redox Homöostase und der DNA-Reparatur in Verbindung gebracht (Catalina-Rodriguez et al., 2012; Hlouschek et al., 2018; Sulkowski et al., 2017). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit sollten diese Befunde auf ihre Eignung zur Modulation der zytotoxischen Effekte einer Strahlentherapie in einem breiteren Panel an Zelllinien getestet werden. Dazu wurde ein effektiver pharmakologischer Inhibitor des Citrat Transporters, CTPI2, genutzt, und dessen Wirkung auf der Ebene von SLC25A1 mithilfe von siRNA in mehreren NSCLC- und GBM-Zelllinien bestätigt. Die Ergebnisse der Kurzzeit-Assays bestätigten eine zytotoxische Wirkung von CTPI2 in Kombination mit Bestrahlung durch die Reduktion der Zellviabilität, dem Anstieg der ROS-Produktion sowie von Apoptose- und Zelltod-Leveln. Diese Effekte waren zum Teil bereits bei einer jeweils alleinigen Therapie mit CTPI2 oder Strahlung vorhanden, jedoch signifikant niedriger ausgeprägt als bei einer Kombinationsbehandlung von CTPI2 und Bestrahlung. Die Ergebnisse bestätigen auch noch einmal die dokumentierte Bedeutung des SLC25A1 für die Redox Homöostase (Hlouschek et al., 2018). Allerdings waren die beobachteten Effekte nach der Inhibition von SLC25A1 nicht nur auf die gestörte Redox-Homöostase zurückzuführen. SLC25A1-Inhibition führte zum Anstieg von D2-Hydroxyglutarat (D2HG). Dabei ist D2HG als ein Onkometabolit beschrieben worden (Hlouschek et al., 2018; Xiang et al., 2020).

Es wurde bereits gezeigt, dass die Anhäufung der 2HG-Enantiomere L2HG oder D2HG unter bestimmten Bedingungen entweder als pathologische Metaboliten in hypoxischen Krebszellen, die durch Lactatdehydrogenase (LDH) oder Malatdehydrogenase (MDH) (Intlekofer et al., 2015; Oldham et al., 2015; Intlekofer et al., 2017) entstehen, oder als sogenannte "Onkometaboliten" infolge von Gain-of-Function-Mutationen in den Genen auftreten können, welche für die Isocitratdehydrogenase 1 oder 2 (IDH1 oder IDH2) kodieren (Dang et al., 2009; Losman, J.-A., & Kaelin, W. G., 2013). Hohe zelluläre 2HG-Spiegel wurden jedoch mit bösartiger Progression und Strahlensensitivität assoziiert

(Molenaar et al., 2018; Sulkowski et al., 2017), vermutlich durch Hemmung von α KG-abhängigen Dioxigenasen (Losman et al., 2013; Gagné et al., 2017; Rose et al., 2011; Xiang et al., 2020).

Interessanterweise wirken die oben beschriebenen Onkometaboliten 2HG, Succinat und Fumarat als kompetitive Inhibitoren der α KG-abhängigen Dioxigenasen (α KGDD) (Kolukula et al., 2014). Die Familie der α KGDDs verwendet Sauerstoff (O_2) und α KG als Co-Faktoren, wie in Abbildung 30 schematisch dargestellt, um eine Reihe von Oxidationsreaktionen durchzuführen, z. B. die Modifikation von Chromatin oder Regulation der Proteinstabilität (de Vissar & Kumar, 2011). Die Akkumulation von Oncometaboliten wirkt sich auf die DNA-Reparatur durch Hemmung der α -KG-abhängigen Histon-Lysin-Demethylase (KDM) und Translokations-DNA-Demethylasen (TET) aus und führt so zu einer DNA/Histon-Hypermethylierung (Bajo et al., 2018; Young et al., 2013; Sulkowski et al., 2018; Xiao et al., 2012). Da DNA-Schäden und die DNA-Schadensantwort innerhalb der Chromatin-Umgebung stattfinden, beeinflussen post-translationale Modifikationen des Chromatins (z.B. Methylierung von Histon-Lysin) die wichtigsten DNA-Reparaturwege und könnten sogar an der DNA-Reparaturwahl beteiligt sein (Gong et al., 2019; Wei et al. 2018; Agarwal et al. 2016). So könnte die metabolische Regulation von α KG-abhängigen Dioxigenasen im Zusammenhang mit der epigenetischen Modulation der DNA-Reparatur neue spannende Ansätze für die Radiosensibilisierung bieten (Xiang et al., 2020).

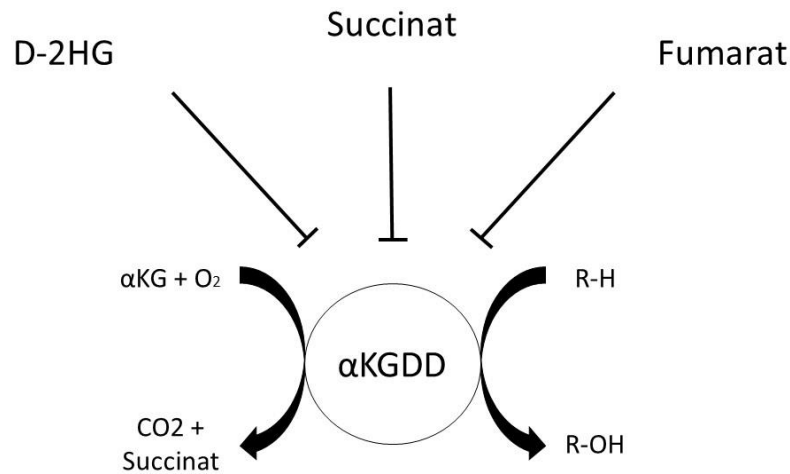


Abbildung 30 Schematische Darstellung der Inhibitoren der αKetoglutarat-abhängigen dioxygenase (αKGDDs)

2HG, Succinat und Fumarat sind Inhibitoren der KGDD. Dabei nutzt die αKGDD Sauerstoff (O₂) und αKG für eine Reihe von Oxidationsreaktionen, um Succinat, CO₂ und hydroxylierte Zielmoleküle dazuzugewinnen. Modifiziert nach (Xiang et al., 2020).

Krebszellen mit mutierter IDH und begleitender 2HG-Akkumulation erhöhten die Empfindlichkeit gegenüber DNA-schädigenden Behandlungen, z.B. IR- oder Alkylierungsmitteln (Dang et al., 2009; Wang et al., 2015). Beispielsweise führte die Akkumulation von 2HG zu einem Defekt in der HRR, der die jeweiligen Zellen anfällig für PARP-Inhibitoren machte, was an BRCA1/2-Mangel-Tumoren erinnert. Interessanterweise konnten andere Forscher diesen Effekt mit der Hemmung von αKG-abhängigen Dioxygenasen der Lysindemethylase-Familie, KDM4A und KDM4B und damit der epigenetischen Regulation von DSB Reparatur verknüpfen (Sulkowski et al., 2017; Gagné et al., 2017). Vorherige Studien verknüpften die Funktion von KDMs mit der Regulation von HRR und Radioresistenz von Lungenkrebspatienten (Bayo et al., 2018; Young et al., 2013; Kuo et al., 2018). Allerdings hemmte die 2HG-Akkumulation auch ALKBH-DNA-Reparaturenzyme, was zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Alkylierungsmitteln führte (Young et al., 2013; Wang et al., 2015). Die

molekularen Mechanismen hinter der 2HG-Akkumulation und der Radiosensibilität sind jedoch Gegenstand aktueller Untersuchungen. Allerdings lassen die Arbeiten der vorliegenden Promotionsschrift den Schluss zu, dass der genetische Hintergrund einer Zelle auch die metabolische Umprogrammierung der Zelle bestimmen kann. Beispielsweise könnte die Identifikation von durch somatische Mutationen angetriebenen metabolischen Subtypen die Entwicklung präzisionsmedizinischer Ansätze in der klinischen Strahlentherapie erlauben (Matschke et al., 2021).

Forschungen haben bereits einen Effekt der D2HG Level auf die Homologe Rekombination und damit auf einen der wichtigsten Wege der DNA-Reparatur gezeigt (Sulkowski et al., 2017; Xu et al., 2011; Young et al., 2013). In dieser Arbeit konnte die Akkumulation von 2HG nach einer pharmakologischen Inhibition mit einem small molecule Inhibitor, dem CTPI2, als auch auf der Ebene von SLC25A1 durch die genetische Herunterregulation der SLC25A1-Expression mit siRNA gezeigt werden.

Die Ergebnisse waren vergleichbar und im Falle von siRNA sogar effizienter für die Induktion der 2HG-Akkumulation im Vergleich zu dem zuvor beschriebenen SCL25A1-Inhibitor BTA (Hlouschek et al., 2018). Das lässt den Schluss zu, dass effizientere Inhibitoren von SLC25A1 entwickelt werden sollten, damit die maximale 2HG-Akkumulation erreicht werden kann, um die HRR-vermittelte DNA-Reparatur zu hemmen.

Diese Annahme wurde weiter untersucht, in dem mittels Fluoreszenzfärbung die Entwicklung der γ H2AX-foci in den behandelten Zellen mit denen einer nicht vorbehandelten Kontrollgruppe verglichen wurde. Genetische als auch pharmakologische Inhibition des SLC25A1 Transporters zeigte dabei den Anstieg der foci, welche auch nach 24 Stunden im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung noch messbar waren. Dies bedeutet, dass die DNA-Reparatur nicht nur in den ersten wichtigen Minuten gestört wird, sondern sich die Zelle auch nach einem Tag noch nicht von der SLC25A1 Inhibition erholt hat.

Um zu untersuchen, ob die durch SLC25A1 induzierte Effekte auch das Langzeitüberleben der Zellen beeinflusst, wurden Koloniebildungsassays durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen bestätigte die aufgestellte Hypothese, dass die SLC25A1-Inhibition zu einer Akkumulation von D2HG führt, und dass dies mit einer Hemmung der Reparatur mittels Homologer Rekombination einhergeht. Diese Effekte

könnten unter Bedingungen, die eine Reparatur strahleninduzierter DNA Schäden mittels HRR erfordern, die Möglichkeit zur Radiosensitivierung, auch im Rahmen einer Protonentherapie von Tumorzellen, bieten.

Um diese Mechanismen weiter zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit zusätzlich MEF Zellen mit Defekten in wichtigen DNA Reparaturenzymen untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen zeigten, dass CTPi2 keinen Effekt bei die HRR-defekten Zellen (RAD54^{-/-}), jedoch deutliche Unterschiede bei den NHEJ defekten Zellen (Lig4^{-/-}) erzeugt.

Um zu überprüfen, ob der durch CTPi2 erzeugte Defekt in der Reparatur strahleninduzierter Doppelstrangbrüche mittels HRR zur Etablierung einer synthetischen Letalität mit Inhibitoren komplementärer DNA Reparaturwege ermöglicht, wurden als nächsten Schritt die Effekte einer Kombination aus CTPi2 mit Inhibitoren der DNA-Reparaturenzyme PARP beziehungsweise DNA-PK Inhibitoren geprüft.

Diese ersten Experimente lieferten bereits wichtige Ergebnisse, welche zum einen die Effekte von CTPi2 als SLC25A1 Inhibitor bestätigte, zum anderen die Effekte der Inhibition des Citrat Transporters auf die DNA-Reparatur und das Langzeitüberleben nach Bestrahlung verdeutlichte. Durch diese an Tumorzellen, und gentechnisch veränderten MEFs erzielten Ergebnisse, ergab sich die Frage, ob sich die Tumorzellen durch weitere Unterbindung der DNA-Reparatur, mittels PARP- oder DNA-PK-Inhibition, noch weiter in der Effektivität der DNA-Reparatur stören lassen und zu testen, ob sich das Langzeitüberleben noch weiter reduzieren lässt.

In diesem Zusammenhang zeigte eine veröffentlichte Studie einige mechanistische Aspekte des Zusammenhangs zwischen 2HG- Akkumulation und DSB-Reparatur: Die Autoren wiesen nach, dass 2HG die KDM4B vermittelte Histon-3-Lysin-9-Tri-methylierung (H3K9me3) in der Nähe von DNA-Brüchen verändert (Sulkowski et al., 2020). Dabei führte die 2HG vermittelte KDM4B-Hemmung zu einem Anstieg von H3K9me3 an den Loci um die DNA-Brüche herum. Die Veränderung der Histonmarker störte die korrekte Wiederholung von TIP60 und ATM, wodurch die Endresektion reduziert und die nachgelagerte DNA-Reparatur beeinträchtigt wurde (Sulkowski et al., 2020). Diese Studie unterstreicht die zentrale Rolle der 2HG vermittelten Suppression der HRR und liefert eine stichhaltige Erklärung für den Zusammenhang zwischen Onkometaboliten, DNA-Schadensantwort und DSB-Reparatur (Sulkowski et al., 2020).

Es wäre für zukünftige Arbeiten interessant zu untersuchen, ob diese Veränderungen auch nach CTPi2 Behandlung auftreten.

5.2 Therapeutische Möglichkeiten zur Strahlensensitivierung über die metabolische Induktion einer HRR-Defizienz

Betrachtet man die Inhibition von SLC25A1 mittels CTPi2 nun als Inhibitor der Homologen Rekombination, so hätte man einen der beiden wichtigsten Reparaturmechanismen der Zelle, nach Schädigung der DNA durch zum Beispiel Strahlung, ausgeschaltet. Es bliebe noch die Nicht-homologe Endverknüpfung. Wie zuvor beschrieben gibt es bereits Wirkstoffe, welche über eine Störung der Basenexzisionsreperatur, welche z.B. nach einem DNA-Einzelstrangbruch benötigt wird (Caldecott et al., 1996), die Nicht-homologe Endverknüpfung blockieren. Dazu gehören z.B. die PARPi oder die DNA-PKi.

Die Experimente dieser Arbeit bestätigten zunächst, dass man die Auflösung der γ H2AX-foci noch weiter verschlechtern kann, wenn man zusätzlich zu CTPi2 noch einen PARP-Inhibitor oder einen DNA-PK-Inhibitor zur Vorbehandlung hinzufügt. Außerdem war es möglich, mittels Koloniebildungsassay zu bestätigen, dass diese Effekte auch das Langzeitüberleben der Zellen verschlechtern. Beide Experimente zeigten eine deutliche Sensibilisierung gegenüber der anschließenden Strahlenbehandlung, verglichen mit Strahlenbehandlung allein. Jedoch zeigte sich auch erneut die große Vielfalt der verschiedenen Tumorzelllinien. Zwar war eine multimodale Therapie aus Strahlung, CTPi2 und DNA-PK Inhibitoren in nahezu allen Experimenten am effektivsten, betrachtet man jedoch verschiedene Kombinationen der anteiligen Ansätze, ergeben sich signifikante Unterschiede. So waren zum Beispiel in den Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom-Zelllinien die PARP-Inhibitoren den DNA-PK-Inhibitoren klar unterlegen. Eine Kombination aus Strahlung, CTPi2 und PARPi erreichte nicht den gleichen Effekt wie eine Therapie nur mit Strahlung und DNA-PK-Inhibitoren. Dieses Bild zeigte sich sowohl im Langzeitüberleben als auch in den γ H2AX Versuchen. Anders bei den Glioblastom Zelllinien: Dort erreichen die Versuchsgruppen mit PARP-Inhibitoren vor allem in Bereich der γ H2AX-Kinetik häufig ähnliche Werte wie die DNA-PKi behandelten Gruppen.

Es lässt sich also abschließend sagen, dass es in den Versuchen der vorliegenden Arbeit möglich war, eine synthetische Letalität mittels Kombination aus HRR-Inhibitoren in Form von CTPi2 und NHEJ-Inhibitoren in Form von PARPi und DNA-PKi zu erzeugen. Die Effektivität hängt jedoch ganz entscheidend von der Wahl des Wirkstoffes ab und muss außerdem auf die Art der Tumorzellen abgestimmt sein. Eine optimale Behandlung des Patienten setzt also molekulares Wissen zu den vorhandenen Tumorzellen voraus, z.B. deren genetischen Hintergrund und die metabolische Umprogrammierung, sowie hinreichende Daten bezüglich der Effektivität der verschiedenen Wirkstoffe und deren Kombinationen, die in spezifischen molekularen Subtypen von Tumorzellen eingesetzt werden können.

5.3 Verstärkte Strahlensensitivität nach Bestrahlung mit Protonen

Wie zu Beginn beschrieben wurde zusätzlich untersucht, ob CTPi2 eine verstärkte Sensitivierung gegenüber einer Bestrahlung mit Protonenstrahlen im Vergleich zu Photonebestrahlung erlaubt. Die zugrundeliegende Hypothese besagt, dass eine Bestrahlung mit Protonen zu DNA-Schäden führt, die vermehrt die HRR benötigt.

Die Versuche zur Kombination von CTPi2 und Protonenstrahl lieferten verschiedene interessante Ergebnisse. So war es im Koloniebildungsassay sehr deutlich zu sehen, dass die Nutzung eines Protonenstrahls im Vergleich zum konventionellen Photonenstrahl das Langzeitüberleben der Zellen noch einmal reduzierte (siehe Abb. 25). Teilweise war es sogar möglich, mit einfacher Kombination von CTPi2 und Protonenstrahlen die gleichen Werte wie bei einer Kombination von Photonen mit CTPi2 und PARP bzw. DNA-PK-Inhibitoren zu erreichen.

Durch zusätzliche Analyse der Reparatur von Rad51 foci konnte ich noch einmal untermauern, dass es sich bei den beobachteten Effekten um Störungen in der Homologen Rekombination handelte, da Rad51 in der HRR für die Induzierung des D-loops benötigt wird (siehe 1.4).

Anders stellten sich die Ergebnisse jedoch bei der Analyse der γ H2AX-Foci dar: Zwar war es auch hier möglich, mit CTPi2 Vorbehandlung eine Veränderung der γ H2AX-Kinetik im Vergleich zu einer einfachen Strahlentherapie mittels Protonen zu erreichen, jedoch konnten insgesamt, im Vergleich zu den Experimenten mit Photonenbestrahlung

(Abb. 11), nur ein deutlich geringerer Anstieg der γ H2AX foci als in den Vorversuchen mit Photonenstrahl beobachtet werden (Abb. 26). Dabei war nicht nur der erste Anstieg der foci nach 30 Minuten geringer ausgeprägt, sondern auch die Dauer des Anstieges nach 24 Stunden erreichte nicht die gleichen Werte wie nach einer Photonenbestrahlung. Es stellt sich also die Frage, wieso vor allem das Langzeitüberleben der mit Protonen behandelten Zellen stärker beeinflusst wurde, während die Kinetik der DNA-Reparatur-Marker nur leichte Veränderungen zeigte.

Es erscheint also auf den ersten Blick so, dass sich die Kombination SLC25A1-Inhibition mit Protonentherapie in Hinblick auf das Outcome, in unserem Fall das Langzeitüberleben als Marker für das Absterben der Tumorzellen, durchaus für weiterführende Untersuchungen anbietet. Dies würde zu bisherigen Studienergebnissen passen, welche bereits Unterschiede in der Induktion und Verarbeitung von DSB zeigten, abhängig davon ob Protonen- oder Photonenstrahlen benutzt wurden (Oeck et al., 2018). Gerade in Hinsicht auf die Inhibition der Homologen Rekombinationsreparatur durch SLC25A1 zeigten bereits *In-vitro*-Studien, dass der HRR-Reparaturweg für die Reparatur der DSBs nach einer Bestrahlung mit Protonen wichtiger ist als nach einer Bestrahlung durch Photonen (Szymonowicz et al., 2020; Grosse et al., 2014; Fontana et al., 2015).

Aus den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnissen leiten sich neue Fragestellungen ab: Insbesondere sollte die Frage nach dem Einfluss des genetischen Hintergrunds der Zellen weiter untersucht werden. Dass die Auswirkungen der Inhibition anhängig von der verwendeten Zelllinie zum Teil erhebliche Unterschiede aufweisen, konnte zum Beispiel in den D2HG-Versuchen beobachtet werden. Die bisher erzielten Ergebnisse zeigen, dass durch gezielte Eingriffe in den Metabolismus der Zellen, ein DNA-Reparatur-Defekt erwirkt werden kann. Umgekehrt könnte ein DNA-Reparatur-Defekt auch einen veränderten Metabolismus in den Zellen zur Folge haben. Der genetische Hintergrund jeder Zelle würde sich dann wiederum in der Effektivität einer Behandlung mit SLC25A1 Inhibitoren widerspiegeln. Ein besseres Verständnis und die Erforschung des Zusammenhangs zwischen metabolischen Phänotypen, der Radioresistenz und der metabolischen Anpassungsreaktionen von Krebszellen, die einer Strahlentherapie unterzogen werden, bieten zukünftige Wege zur biologischen Individualisierung und Optimierung der Strahlentherapie (Matschke et al., 2021).

Auch wäre ein wichtiger nächster Schritt die Nutzung von gesunden Zellen und wie sich die Behandlung auf diese auswirkt, um so die Grundlage für Versuche am Tier zu schaffen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Inhibition von SLC25A1 in Kombination mit Strahlung zu signifikant besseren Ergebnissen in nahezu jedem von uns durchgeführten Experiment führt und somit die Nutzung dieses Transporters neue Möglichkeiten im Bereich der Krebstherapie als auch der Tumorforschung bietet.

6 Zusammenfassungen

6.1 Deutsche Zusammenfassung

Die Strahlentherapie leistet einen weitreichenden Beitrag zur Krebsbehandlung, allein und in kombinierten Behandlungsstrategien. Die intrinsische und mikroumgebungsbedingte Strahlenresistenz von soliden Tumoren bleibt jedoch ein wesentliches Hindernis für eine erfolgreiche Strahlentherapie.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl die small interfering ribonucleic acid (siRNA) Technologie als auch ein verbesserter niedermolekularer Inhibitor des solute carrier family 25 member 1 (SLC25A1) allein oder in Kombination mit Bestrahlung verwendet und die Auswirkungen der genetischen oder pharmakologischen SLC25A1-Hemmung allein oder in Kombination mit Bestrahlung auf die Zellfunktion, Radiosensibilität und deoxyribonucleic acid (DNA)-Reparaturkinetik in Tumorzellen bestimmt. Der Nachweis von Hauptexperimenten wurde in isogenen mouse embryo fibroblast (MEF)-Zelllinien mit Defekten in homologen Rekombinations- (HRR) oder nicht-homologen Endverbindungswegen (NHEJ) durchgeführt. Das Potenzial dieser Behandlungen zur Erhöhung der zytotoxischen Wirkung einer Strahlentherapie in Kombination mit klinisch relevanten Inhibitoren der DNA-Reparatur (Inhibitoren der Poly(ADP-ribose) – Polymerase (PARP) oder der katalytischen Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK)) wurde getestet. Darüber hinaus wurde der Effekt der SLC25A1-Hemmung auf die DNA-Reparatur und das Überleben von Tumorzellen auf Protonen im Vergleich zur Photonenstrahlung getestet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die genetische und pharmakologische Hemmung von SLC25A1 die Lebensfähigkeit verschiedener Tumorzellen verringerte, reactive oxygen species (ROS)-Bildung induzierte und Apoptose- und Zelltodwerte erhöhte, sowie das Langzeitüberleben verringert. Dies ging mit einer Erhöhung der D-2-Hydroxyglutarat (D2HG)-Werte und einer Beeinträchtigung der Auflösung von H2A histone family member X (H2AX)-foci einher. Es gelang, durch Kombination der SLC25A1-Hemmung mit NHEJ-Hemmstoffen die Kinetik der Reparatur strahleninduzierter DNA Schäden weiter zu verschlechtern. Außerdem sensibilisierte die Hemmung von SLC25A1 Lungen- und Glioblastomzelllinien stärker für die zytotoxische Wirkung von Protonen im Vergleich zur Photonenstrahlung.

6.2 Englische Zusammenfassung

Introduction: Radiation therapy makes a far-reaching contribution to cancer treatment, alone and in combination treatment strategies. However, the intrinsic and microenvironmental radiation resistance of solid tumours remains a major obstacle to successful radiation therapy.

Methods: In the present work, both the small interfering ribonucleic acid (siRNA) technology and an improved low molecular weight inhibitor of solute carrier family 25 member 1 (SLC25A1) alone or in combination with irradiation were used to determine the effects of genetic or pharmacological SLC25A1 inhibition alone or in combination with irradiation on cell function, radiosensitivity and deoxyribonucleic acid (DNA) repair kinetics in tumor cells. The detection of main experiments was performed in isogenic mouse embryo fibroblast (MEF) cell lines with defects in homologous recombination (HRR) or non-homologous terminal pathways (NHEJ). The potential of these treatments to increase the cytotoxic effect of radiotherapy in combination with clinically relevant inhibitors of DNA repair (inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) or the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase (DNA-PK)) has been tested. In addition, the effect of SLC25A1 inhibition on DNA repair and survival of tumor cells on protons compared to photon radiation was tested.

Results: The results of the present study show that the genetic and pharmacological inhibition of SLC25A1 decreased the viability of various tumor cells, induced reactive oxygen species (ROS) formation, increased apoptosis and cell death, and decreased long-term survival. This was associated with an increase in D-2-hydroxyglutarate (D2HG) levels and impaired resolution of H2A histone family member X (H2AX)-foci. Interestingly, by combining SLC25A1 inhibition with PARP or DNA-PK inhibitors, the kinetics of radiation-induced DNA damage repair were further deteriorated. In addition, the inhibition of SLC25A1 lung and glioblastoma cell lines made them more sensitive to the cytotoxic effect of protons compared to photon radiation.

7 Verzeichnisse

7.1 Literaturverzeichnis

1. Agarwal, P., & Miller, K. M. (2016). The nucleosome: Orchestrating DNA damage signaling and repair within chromatin. *Biochemistry and Cell Biology*, *94*(5), 381–395. doi:10.1139/bcb-2016-0017
2. Ahnesorg, P., Smith, P., & Jackson, S. P. (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*, *124*(2), 301-313. doi: 10.1016/j.cell.2005.12.031.
3. Andres, S. N., Vergnes, A., Ristic, D., Wyman, C., Modesti, M., Junop, M. (2012). A human XRCC4-XLF complex bridges DNA. In *Nucleic acids research*, *40* (4), pp. 1868–1878. doi: 10.1093/nar/gks022.
4. Barcellos-Hoff, M. H., Park, C., & Wright, E. G. (2005). Radiation and the microenvironment–tumorigenesis and therapy. *Nature Reviews Cancer*, *5*(11), 867-875. doi: 10.1038/nrc1735.
5. Baskar, R., Balajee, A. S., Geard, C. R., & Hande, M. P. (2008). Isoform-specific activation of protein kinase c in irradiated human fibroblasts and their bystander cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *40*(1), 125-134. doi: 10.1016/j.biocel.2007.07.002.
6. Baskar, R., Dai, J., Wenlong, N., Yeo, R., & Yeoh, K. W. (2014). Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Frontiers in molecular biosciences*, *1*, 24. doi: 10.3389/fmolb.2014.00024.
7. Bayo, J., Tran, T. A., Wang, L., Peña-Llopis, S., Das, A. K., & Martinez, E. D. (2018). Jumonji inhibitors overcome radioresistance in cancer through changes in H3K4 methylation at double-strand breaks. *Cell reports*, *25*(4), 1040-1050.e5. doi:10.1016/j.celrep.2018.09.081
8. Bernier, J., Hall, E. J., & Giaccia, A. (2004). Radiation oncology: a century of achievements. *Nature Reviews Cancer*, *4*(9), 737-747. doi: 10.1038/nrc1451.
9. Bernstein, N. K., Williams, R. S., Rakovszky, M. L., Cui, D., Green, R., Karimi-Busheri, F., Mani, R. S., Galicia, S., Koch, C. A., Cass, C. E., Durocher, D., Weinfeld, M., Glover, J. N. M. (2005). The Molecular Architecture of the

- Mammalian DNA Repair Enzyme, Polynucleotide Kinase. In *Molecular Cell*, 17(5), 657–670. doi:10.1016/j.molcel.2005.02.012
10. Brown, J. M., & Wilson, W. R. (2004). Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nature Reviews Cancer*, 4(6), 437–447. doi:10.1038/nrc1367
 11. Caldecott, K. W., Aoufouchi, S., Johnson, P., & Shall, S. (1996). XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase β and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular ‘nick-sensor’ in vitro. *Nucleic acids research*, 24(22), 4387-4394..
 12. Cannavo, E., & Cejka, P. (2014). Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11–Rad50–Xrs2 to resect DNA breaks. *Nature*, 514(7520), 122-125. doi: 10.1038/nature13771.
 13. Catalina-Rodriguez, O., Kolukula, V. K., York Tomita, A. P., Palmieri, F., Wellstein, A., Byers, S., Giaccia, A. J., Glasgow, E., Albanese, C., Avantiaggiati, M. L. (2012). The mitochondrial citrate transporter, CIC, is essential for mitochondrial homeostasis. In *Oncotarget* 3 (10), pp.1220–1235. doi: 10.18632/oncotarget.714.
 14. Chakrabarti, G. (2015). Mutant KRAS associated malic enzyme 1 expression is a predictive marker for radiation therapy response in non-small cell lung cancer. *Radiation Oncology*, 10(1). doi:10.1186/s13014-015-0457-x
 15. Chen, R., & Wold, M. S. (2014). Replication protein A: single-stranded DNA's first responder: dynamic DNA-interactions allow replication protein A to direct single-strand DNA intermediates into different pathways for synthesis or repair. *Bioessays*, 36(12), 1156-1161. doi: 10.1002/bies.201400107.
 16. Critchlow, S. E., Bowater, R. P., & Jackson, S. P. (1997). Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Current Biology*, 7(8), 588-598.
 17. Dang, L., White, D. W., Gross, S., Bennett, B. D., Bittinger, M. A., Driggers, E. M., Fantin, V. R., Jang, H. G., Jin, S., Keenan, M. C., Marks, K. M., Prins, R. M., Ward, P. S., Yen, K. E., Liau, L. M., Rabinowitz, J. D., Cantley, L. C., Thompson, C. B., Vander Heiden, M. G., Su, S. M. (2009). Cancer-associated IDH1

- mutations produce 2-hydroxyglutarate. In *Nature* 462 (7274), pp. 739–744. doi: 10.1038/nature08617.
18. Davis, A. J. & Chen, D. J. (2013). DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. In *Trans Cancer Res* 2 (3), pp. 130-143. doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.02.
19. De Vissar, S. P. & Kumar, D. (2011). Iron-Containing Enzymes: Versatile Catalysts of Hydroxylation Reactions in *Nature*. Royal Society of Chemistry, pp. 1-41. doi: 10.1039/9781849732987-FP001
20. Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C., & Barton, M. (2005). The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 104(6), 1129-1137. doi: 10.1002/cncr.21324.
21. Domínguez, O., Ruiz, J. F., Laín de Lera, T., García-Díaz, M., González, M. A., Kirchhoff, T., Martínez-A, C., Bernad, A., Blanco, L. (2000). DNA polymerase mu (Pol mu), homologous to TdT, could act as a DNA mutator in eukaryotic cells. In *The EMBO journal* 19 (7), pp. 1731–1742. doi: 10.1093/emboj/19.7.1731.
22. Durante, M., & Loeffler, J. S. (2010). Charged particles in radiation oncology. *Nature reviews Clinical oncology*, 7(1), 37-43. doi: 10.1038/nrclinonc.2009.183.
23. Elledge, S. J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science*, 274(5293), 1664-1672.
24. Fernandez, H. R., Gadre, S. M., Tan, M., Graham, G. T., Mosaoa, R., Ongkeko, M. S., Kim, K. A., Riggins, R. B., Parasido, E., Petrini, I., Pacini, S., Cheema, A., Varghese, R., Ransom, H. W. Zhang, Y., Albanese, C., Üren, A., Paige, M., Giaccone, G., & Avantiaggiati, M. L. (2018). The mitochondrial citrate carrier, SLC25A1, drives stemness and therapy resistance in non-small cell lung cancer. *Cell Death & Differentiation*, 25(7), 1239-1258. doi: 10.1038/s41418-018-0101-z.

25. Fontana, A. O., Augsburger, M. A., Grosse, N., Guckenberger, M., Lomax, A. J., Sartori, A. A., Pruschy, M. N. (2015). Differential DNA repair pathway choice in cancer cells after proton- and photon-irradiation. *Radiotherapy and Oncology*, *116*(3), 374-380. doi: 10.1016/j.radonc.2015.08.014
26. Gagné, L. M., Boulay, K., Topisirovic, I., Huot, M. É., & Mallette, F. A. (2017). Oncogenic activities of IDH1/2 mutations: from epigenetics to cellular signaling. *Trends in cell biology*, *27*(10), 738-752. doi:10.1016/j.tcb.2017.06.002.
27. Gong, F., & Miller, K. M. (2019). Histone methylation and the DNA damage response. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *780*, 37-47. doi:10.1016/j.mrrev.2017.09.003
28. Grosse, N., Fontana, A. O., Hug, E. B., Lomax, A., Coray, A., Augsburger, M., Paganetti, H., Sartori, A. A., Pruschy, M. (2014). Deficiency in Homologous Recombination Renders Mammalian Cells More Sensitive to Proton Versus Photon Irradiation. In *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, *88*(1), 175–181. doi:10.1016/j.ijrobp.2013.09.041.
29. Grünler, J., Ericsson, J., & Dallner, G. (1994). Branch-point reactions in the biosynthesis of cholesterol, dolichol, ubiquinone and prenylated proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, *1212*(3), 259-277. doi: 10.1016/0005-2760(94)90200-3.
30. Guadagnolo, B. A., Liao, K. P., Elting, L., Giordano, S., Buchholz, T. A., & Shih, Y. C. T. (2013). Use of radiation therapy in the last 30 days of life among a large population-based cohort of elderly patients in the United States. *Journal of Clinical Oncology*, *31*(1), 80. doi: 10.1200/JCO.2012.45.0585.
31. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
32. Hass, C. S., Lam, K., & Wold, M. S. (2012). Repair-specific functions of replication protein A. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(6), 3908-3918. doi: 10.1074/jbc.M111.287441.

33. Heyer, W. D., Ehmsen, K. T., & Liu, J. (2010). Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annual review of genetics*, *44*, 113-139. doi:10.1146/annurev-genet-051710-150955.
34. Horsman, M. R., Mortensen, L. S., Petersen, J. B., Busk, M., & Overgaard, J. (2012). Imaging hypoxia to improve radiotherapy outcome. *Nature reviews Clinical oncology*, *9*(12), 674. doi:10.1038/nrclinonc.2012.171.
35. Hlouschek, J., Hansel, C., Jendrossek, V., & Matschke, J. (2018). The mitochondrial citrate carrier (SLC25A1) sustains redox homeostasis and mitochondrial metabolism supporting radioresistance of cancer cells with tolerance to cycling severe hypoxia. *Frontiers in oncology*, *8*, 170. doi: 10.3389/fonc.2018.00170.
36. Hlouschek, J., Ritter, V., Wirsdörfer, F., Klein, D., Jendrossek, V., & Matschke, J. (2018). Targeting SLC25A10 alleviates improved antioxidant capacity and associated radioresistance of cancer cells induced by chronic-cycling hypoxia. *Cancer letters*, *439*, 24-38.
37. Iacobazzi, V., Lauria, G., & Palmieri, F. (1997). Organization and sequence of the human gene for the mitochondrial citrate transport protein. *DNA sequence*, *7*(3-4), 127-139.
38. Intlekofer, A. M., Dematteo, R. G., Venneti, S., Finley, L. W. S., Lu, C., Judkins, A. R., Rustenburg A. S., Grinaway P. B., Chodera J. D., Cross J. R., Thompson, C. B. (2015). Hypoxia Induces Production of L-2-Hydroxyglutarate. *Cell Metabolism*, *22*(2), 304–311. doi:10.1016/j.cmet.2015.06.023
39. Intlekofer, A. M., Wang, B., Liu, H., Shah, H., Carmona-Fontaine, C., Rustenburg, A. S., Salah S., Gunner M. R., Chodera J. D., Cross J. R., Thompson, C. B. (2017). L-2-Hydroxyglutarate production arises from noncanonical enzyme function at acidic pH. *Nature Chemical Biology*, *13*(5), 494–500. doi:10.1038/nchembio.2307
40. Jensen, R. B., Carreira, A., & Kowalczykowski, S. C. (2010). Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature*, *467*(7316), 678-683. doi: 10.1038/nature09399.

41. Jiang, L., Shestov, A. A., Swain, P., Yang, C., Parker, S. J., Wang, Q. A., Terada, L. S., Adams, N. D., McCabe, M. T., Pietrak, B., Schmidt, S., Metallo, C. M., Dranka, B. P., Schwartz, B. & DeBerardinis, R. J. (2016). Reductive carboxylation supports redox homeostasis during anchorage-independent growth. *Nature*, 532(7598), 255-258. doi: 10.1038/nature17393.
42. Jiang, L., Boufersaoui, A., Yang, C., Ko, B., Rakheja, D., Guevara, G., Hu, Z. & DeBerardinis, R. J. (2017). Quantitative metabolic flux analysis reveals an unconventional pathway of fatty acid synthesis in cancer cells deficient for the mitochondrial citrate transport protein. *Metabolic engineering*, 43, 198-207. doi:10.1016/j.ymben.2016.11.004.
43. Knijnenburg, T. A., Wang, L., Zimmermann, M. T., Chambwe, N., Gao, G. F., Cherniack, A. D., Fan, H., Shen, H., Way, G. P., Greene, C. S., Liu, Y., Akbani, R., Feng, B., Donehower, L. A., Miller, C., Shen, Y., Karimi, M., Chen, H., Kim, P., Jia, P., Shinbrot, E., Zhang, S., Liu, J., Hu, H., Bailey, M. H., Yau, C., Wolf, D., Zhau, Z., Weinstein, J. N., Li, L., Ding, L., Mills, G. B., Laird, P. W., Wheeler, D. A., Shmulevich, I., The Cancer Atlas Research Network, Monnat, R. J. Jr., Xiao, Y., Wang, C., Greene, C. S. (2018). Genomic and molecular landscape of DNA damage repair deficiency across The Cancer Genome Atlas. *Cell reports*, 23(1), 239-254. doi:10.1016/j.celrep.2018.03.076.
44. Kolukula, V. K., Sahu, G., Wellstein, A., Rodriguez, O. C., Preet, A., Iacobazzi, V., D'Orazi, G., Albanese, C., Palmieri, F., Avantaggiati, M. L. (2014). SLC25A1, or CIC, is a novel transcriptional target of mutant p53 and a negative tumor prognostic marker. *Oncotarget*, 5(5), 1212. doi:10.18632/oncotarget.1831
45. Kuo, K.-T., Huang, W.-C., Bamodu, O. A., Lee, W.-H., Wang, C.-H., Hsiao, M., Wang, L.-S., Yeh, C.-T. (2018). Histone demethylase JARID1B/KDM5B promotes aggressiveness of non-small cell lung cancer and serves as a good prognostic predictor. *Clinical epigenetics*, 10(1), 1-12. doi:10.1186/s13148-018-0533-9
46. Lee, C.-T., Boss, M.-K., & Dewhirst, M. W. (2014). Imaging Tumor Hypoxia to Advance Radiation Oncology. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(2), 313–337. doi:10.1089/ars.2013.5759

-
47. Lieber, M. R. (2008). The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *Journal of Biological Chemistry*, 283(1), 1-5. doi: 10.1074/jbc.R700039200.
48. Lieber, M. R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual review of biochemistry*, 79, 181-211. doi: 10.1146/annurev.biochem.052308.093131.
49. Ljungkvist, A. S., Bussink, J., Kaanders, J. H. A. M., & van Der Kogel, A. J. (2007). Dynamics of tumor hypoxia measured with bioreductive hypoxic cell markers. *Radiation research*, 167(2), 127-145. doi:10.1667/rr0719.1
50. Lord, C. J., & Ashworth, A. (2016). BRCAness revisited. *Nature Reviews Cancer*, 16(2), 110. doi:10.1038/nrc.2015.21
51. Losman, J.-A., & Kaelin, W. G. (2013). What a difference a hydroxyl makes: mutant IDH, (R)-2-hydroxyglutarate, and cancer. *Genes & Development*, 27(8), 836–852. doi:10.1101/gad.217406.113
52. Ma, C. J., Gibb, B., Kwon, Y., Sung, P., & Greene, E. C. (2017). Protein dynamics of human RPA and RAD51 on ssDNA during assembly and disassembly of the RAD51 filament. *Nucleic acids research*, 45(2), 749-761. doi: 10.1093/nar/gkw1125.
53. Ma, Y., Lu, H., Tippin, B., Goodman, M. F., Shimazaki, N., Koiwai, O., Hsieh, C.-L., Schwarz, K. & Lieber, M. R. (2004). A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Molecular cell*, 16(5), 701-713. doi: 10.1016/j.molcel.2004.11.017.
54. Mahaney, B. L., Meek, K., & Lees-Miller, S. P. (2009). Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochemical Journal*, 417(3), 639-650. doi: 10.1042/BJ20080413.
55. Majd, H., King, M. S., Smith, A. C., & Kunji, E. R. (2018). Pathogenic mutations of the human mitochondrial citrate carrier SLC25A1 lead to impaired citrate export required for lipid, dolichol, ubiquinone and sterol synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1859(1), 1-7. doi: 10.1016/j.bbabi.2017.10.002.

-
56. Maloisel, L., Fabre, F., & Gangloff, S. (2008). DNA polymerase δ is preferentially recruited during homologous recombination to promote heteroduplex DNA extension. *Molecular and cellular biology*, 28(4), 1373-1382. doi: 10.1128/MCB.01651-07.
57. Mariotti, L. G., Pirovano, G., Savage, K. I., Ghita, M., Ottolenghi, A., Prise, K. M., & Schettino, G. (2013). Use of the γ -H2AX assay to investigate DNA repair dynamics following multiple radiation exposures. *PloS one*, 8(11), e79541. doi: 10.1371/journal.pone.0079541.
58. Markova, E., Schultz, N., & Belyaev, I. Y. (2007). Kinetics and dose-response of residual 53BP1/ γ -H2AX foci: Co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival. *International journal of radiation biology*, 83(5), 319-329. doi: 10.1080/09553000601170469.
59. Matschke J., Larafa, S., Jendrossek, V. (2021). Metabolic reprogramming of antioxidant defense: a precision medicine perspective for radiotherapy of lung cancer? *Biochemical Society Transactions*. doi: 10.1042/BST20200866
60. Matschke, J., Riffkin, H., Klein, D., Handrick, R., Lüdemann, L., Metzen, E., Shlomi, T., Stuschke, M., Jendrossek, V. (2016). Targeted Inhibition of Glutamine-Dependent Glutathione Metabolism Overcomes Death Resistance Induced by Chronic Cycling Hypoxia. In *Antioxidants & Redox Signaling*, 25(2), 89–107. doi:10.1089/ars.2015.658.
61. Matschke, J., Wiebeck, E., Hurst, S., Rudner, J., & Jendrossek, V. (2016). Role of SGK1 for fatty acid uptake, cell survival and radioresistance of NCI-H460 lung cancer cells exposed to acute or chronic cycling severe hypoxia. *Radiation Oncology*, 11(1). doi:10.1186/s13014-016-0647-1
62. Matsumoto, S., Yasui, H., Mitchell, J. B., & Krishna, M. C. (2010). Imaging Cycling Tumor Hypoxia. *Cancer Research*, 70(24), 10019–10023. doi:10.1158/0008-5472.can-10-2821
63. Mimitou, E. P., & Symington, L. S. (2009). DNA end resection: many nucleases make light work. *DNA repair*, 8(9), 983-995. doi: 10.1016/j.dnarep.2009.04.017.

-
64. Molenaar, R. J., Maciejewski, J. P., Wilmink, J. W., & van Noorden, C. J. F. (2018). Wild-type and mutated IDH1/2 enzymes and therapy responses. *Oncogene*, *37*(15), 1949–1960. doi:10.1038/s41388-017-0077-z
65. Nakashima, R., Goto, Y., Koyasu, S., Kobayashi, M., Morinibu, A., Yoshimura, M., Hiraoka, M., Hammond, E. M., Harada, H. (2017). UCHL1-HIF-1 axis-mediated antioxidant property of cancer cells as a therapeutic target for radiosensitization. *Scientific Reports*, *7*(1), 1-9 doi:10.1038/s41598-017-06605-1
66. Newsholme, E. A., Sugden, P. H., & Williams, T. H. E. L. M. A. (1977). Effect of citrate on the activities of 6-phosphofructokinase from nervous and muscle tissues from different animals and its relationships to the regulation of glycolysis. *Biochemical Journal*, *166*(1), 123-129. doi: 10.1042/bj1660123
67. Nicholls, David G. (2010). Mitochondrial ion circuits. In *Essays in biochemistry* *47*(1), 25. doi: 10.1042/bse0470025.
68. Oeck, S., Szymonowicz, K., Wiel, G., Krysztofiak, A., Lambert, J., Koska, B., Iliakis, G., Timmermann, B. & Jendrossek, V. (2018). Relating linear energy transfer to the formation and resolution of DNA repair foci after irradiation with equal doses of X-ray photons, plateau, or Bragg-peak protons. *International journal of molecular sciences*, *19*(12), 3779. doi: 10.3390/ijms19123779
69. Oldham, W. M., Clish, C. B., Yang, Y., & Loscalzo, J. (2015). Hypoxia-mediated increases in L-2-hydroxyglutarate coordinate the metabolic response to reductive stress. *Cell metabolism*, *22*(2), 291-303. doi:10.1016/j.cmet.2015.06.021
70. Paull, T. T., & Gellert, M. (1999). Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes & development*, *13*(10), 1276-1288.
71. Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M., & Bonner, W. M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology*, *10*(15), 886-895. doi:10.1016/s0960-9822(00)00610-2

72. Petukhova, G., Stratton, S., & Sung, P. (1998). Catalysis of homologous DNA pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins. *Nature*, *393*(6680), 91-94. doi: 10.1038/30037.
73. Pilić, P. G., Tang, C., Mills, G. B., & Yap, T. A. (2019). State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer. *Nature reviews Clinical oncology*, *16*(2), 81-104. doi:10.1038/s41571-018-0114-z
74. Prasun, P., Young, S., Salomons, G., Werneke, A., Jiang, Y. H., Struys, E., Paige, M., Avantaggiati, M. L. & McDonald, M. (2014). Expanding the clinical spectrum of mitochondrial citrate carrier (SLC25A1) deficiency: facial dysmorphism in siblings with epileptic encephalopathy and combined D, L-2-hydroxyglutaric aciduria. In *JIMD Reports, Volume 19* (pp. 111-115). Springer, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/8904_2014_378.
75. Raschle, M., Van Komen, S., Chi, P., Ellenberger, T., & Sung, P. (2004). Multiple interactions with the Rad51 recombinase govern the homologous recombination function of Rad54. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(50), 51973-51980. doi: 10.1074/jbc.M410101200.
76. Rose, N. R., McDonough, M. A., King, O. N., Kawamura, A., & Schofield, C. J. (2011). Inhibition of 2-oxoglutarate dependent oxygenases. *Chemical Society reviews*, *40*(8), 4364-4397. doi:10.1039/c0cs00203h
77. Rouschop, K. M., Dubois, L. J., Keulers, T. G., van den Beucken, T., Lambin, P., Bussink, J., van der Kogel, A. J., Koritzinsky, M. & Wouters, B. G. (2013). PERK/eIF2 α signaling protects therapy resistant hypoxic cells through induction of glutathione synthesis and protection against ROS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(12), 4622-4627. doi:10.1073/pnas.1210633110
78. Schipler, A., & Iliakis, G. (2013). DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice. *Nucleic acids research*, *41*(16), 7589-7605. doi:10.1093/nar/gkt556
79. Sonoda, E., Hohegger, H., Saberi, A., Taniguchi, Y., & Takeda, S. (2006). Differential usage of non-homologous end-joining and homologous

- recombination in double strand break repair. *DNA repair*, 5(9-10), 1021-1029. doi: 10.1016/j.dnarep.2006.05.022.
80. Srere, P. A. (1959). The citrate cleavage enzyme: I. Distribution and purification. *Journal of Biological Chemistry*, 234(10), 2544-2547.
81. Sulkowski, P. L.; Corso, Christopher D.; Robinson, Nathaniel D.; Scanlon, Susan E.; Purshouse, Karin R.; Bai, Hanwen; Liu, Yanfeng; Sundaram, Ranjini K.; Hegan, Denise C.; Fons, Nathan R.; Breuer, Gregory A.; Song, Yuanbin, Mishra-Gorur, Ketu; De Fexter, Henk; de Graaf, Robin A.; Surovtseva, Yulia V.; Kachman, Maureen; Halene, Stephanie; Günel, Murat; Glazer, Peter M.; Bindra, Ranjit S. (2017). 2-Hydroxyglutarate produced by neomorphic IDH mutations suppresses homologous recombination and induces PARP inhibitor sensitivity. In *Science translational medicine* 9 (375). doi: 10.1126/scitranslmed.aal2463.
82. Sulkowski, P. L.; Oeck, S.; Dow, J.; Economos, N. G.; Mirfakhraie, L.; Liu, Y.; Noronha, K.; Bao, X.; Li, J.; Shuch, B. M.; King, M. C.; Bindra, R. S. & Glazer, P. M. (2020). Oncometabolites suppress DNA repair by disrupting local chromatin signalling. *Nature*, 582(7813), 586–591. doi: 10.1038/s41586-020-2363-0
83. Sun, J., Aluvila, S., Kotaria, R., Mayor, J. A., Walters, D. E., & Kaplan, R. S. (2010). Mitochondrial and plasma membrane citrate transporters: discovery of selective inhibitors and application to structure/function analysis. *Molecular and cellular pharmacology*, 2(3), 101.
84. Sung, P., & Klein, H. (2006). Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(10), 739-750.
85. Szymonowicz, K., Kryzstofiak, A., Linden, J. V. D., Kern, A., Deycmar, S., Oeck, S., Squire, A., Koska, B., Hlouschek, J.; Vüllings, M., Neander, C., Siveke, J. T., Matschke, J., Pruschy, M., Timmermann, B.; & Jendrossek, V. (2020). Proton Irradiation Increases the Necessity for Homologous Recombination Repair Along with the Indispensability of Non-Homologous End Joining. *Cells*, 9(4), 889. doi: 10.3390/cells9040889.

-
86. Timson, D. J., Singleton, M. R., & Wigley, D. B. (2000). DNA ligases in the repair and replication of DNA. *Mutation Research/DNA Repair*, 460(3-4), 301-318.
87. Turner, N., Tutt, A., & Ashworth, A. (2004). Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nature reviews cancer*, 4(10), 814-819. doi:10.1038/nrc1457
88. Varga, T., & Aplan, P. D. (2005). Chromosomal aberrations induced by double strand DNA breaks. *DNA repair*, 4(9), 1038-1046. doi:10.1016/j.dnarep.2005.05.004.
89. Vaupel, P., & Harrison, L. (2004). Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *The oncologist*, 9, 4-9. doi:10.1634/theoncologist.9-90005-4.
90. Vitti, E. T., & Parsons, J. L. (2019). The radiobiological effects of proton beam therapy: Impact on DNA damage and repair. *Cancers*, 11(7), 946. doi:10.3390/cancers11070946.
91. Wang, P., Wu, J., Ma, S., Zhang, L., Yao, J., Hoadley, K. A., Wilkerson, M. D., Perou, C. M., Guan, K.-L., Ye, D. & Xiong, Y. (2015). Oncometabolite D-2-hydroxyglutarate inhibits ALKBH DNA repair enzymes and sensitizes IDH mutant cells to alkylating agents. *Cell reports*, 13(11), 2353-2361. doi:10.1016/j.celrep.2015.11.029
92. Watson, J. A., & Lowenstein, J. M. (1970). Citrate and the conversion of carbohydrate into fat: fatty acid synthesis by a combination of cytoplasm and mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 245(22), 5993-6002.
93. Wei, S., Li, C., Yin, Z., Wen, J., Meng, H., Xue, L., & Wang, J. (2018). Histone methylation in DNA repair and clinical practice: new findings during the past 5-years. *Journal of Cancer*, 9(12), 2072. doi:10.7150/jca.23427
94. Wu, P. Y., Frit, P., Meesala, S., Dauvillier, S., Modesti, M., Andres, S. N., Huang, Y., Sekiguchi, J., Calsou, P., Salles, B. & Junop, M. S. (2009). Structural and functional interaction between the human DNA repair proteins DNA ligase IV and XRCC4. *Molecular and cellular biology*, 29(11), 3163-3172. doi:10.1128/MCB.01895-08.

-
95. Xiang, K., Jendrossek, V., & Matschke, J. (2020). Oncometabolites and the response to radiotherapy. *Radiation Oncology*, *15*(1), 1-10. doi:10.1186/s13014-020-01638-9
96. Xiao, M., Yang, H., Xu, W., Ma, S., Lin, H., Zhu, H., Lio, L., Liu, Y., Yang, C., Xu, Y., Zhao, S., Ye, D., Xiong, Y., Guan, K.-L. (2012). Inhibition of α -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes & development*, *26*(12), 1326-1338. doi:10.1101/gad.191056.112
97. Xu, W., Yang, H., Liu, Y., Yang, Y., Wang, P., Kim, S. H., ... & Xiong, Y. (2011). Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer cell*, *19*(1), 17-30. doi: 10.1016/j.ccr.2010.12.014.
98. Yamamori, T., Yasui, H., Yamazumi, M., Wada, Y., Nakamura, Y., Nakamura, H., & Inanami, O. (2012). Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radical Biology and Medicine*, *53*(2), 260-270. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.033.
99. Young, L. C., McDonald, D. W., & Hendzel, M. J. (2013). Kdm4b histone demethylase is a DNA damage response protein and confers a survival advantage following γ -irradiation. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(29), 21376-21388. doi: 10.1074/jbc.M113.491514.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

aKG	a-Ketoglutarat,
aKGDDs	a-Ketoglutarat-abhängige Dioxygenase
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
APS	Ammoniumpersulfat
ATM	Ataxie Telangiectasie Mutation
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Basenexzisionsreperatur
BRCA2	Breast Cancer Gene 2
BSA	Bovines Serumalbumin
Bzw.	Beziehungsweise
CTPi2	Citrate transport protein inhibitor 2
D2HG	D2-Hydroxyglutarat
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DHE	Dihydroethidium
D-loop	Displacement loop
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxid
DNA	Desoyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)

DNA-PK(cs)	DNA abhängige Protein Kinase (Katalytische Untereinheit)
DSB	Doppelstrangbruch
DSBR	Doppelstrangbruch Reperatur
EDTA	Ethlendiamintetraessigsäure (Ethylenediaminetetraacetic acid)
FACS	Durchflusszytometer (Fluorescence-activated cell sorting)
FCS	Fetales Kalbsserum (Fetal calf serum)
Gy	Gray
H	Stunden (hours)
HRP	Horseradish peroxidase
HRR	Homologe Rekombinations Reperatur
IDH1/2	Isocitrate dehydrogenase ½
IF	Immunofluoreszenz
IR	Strahlung (Ionizing radiation)
KV	Kristallviolett
MEF	Maus Embryonen Fibroblasten (Mouse embryonic fibroblasts)
Min	Minuten (minutes)
MRN-Komplex	Mre11-Rad50-Nbs1-Komplex
NGS	Normales Ziegen Serum (Normal goat serum)
Nm	Nanometer

Ns	Nicht signifikant
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung (Non-homologous endjoining)
OD	Optische Dichte (Optical density)
P/S	Penicillin/Streptomycin
PARP	Poly ADP-Ribose Polymerase
PARPi	PARP Inhibitor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate-Buffered Saline)
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidium Iodid
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PVDF	Polyvinylidene fluoride
R	Zielmolekül
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive oxygen species)
RPA	Replication protein A
Rpm	Runden pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDSA	Synthesis-dependent strand annealing

SEM	Standardfehler des Mittelwerts (Standard error of the mean)
SF	Überlebensfraktion (Survival fraction)
siRNA	kleine eingreifende Ribonukleinsäure (small interfering Ribonucleinacid)
SLC25A1	solute carrier family 25 member 1
SSB	Einzelstrangbruch (Single strand break)
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter)
ssDNA	Einzelstrang DNA (Single-stranded DNA)
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline
TE	Trypsin-EDTA
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TG	Tris-Glycine
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
vgl.	vergleiche
XLF	XRCC4-like factor
XRCC4	X-Ray Repair Cross-Complementing Protein 4
XRT	Strahlentherapie (X-Ray Therapy)
z.B.	zum Beispiel
α KG	α -ketoglutarat

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Für die Zelllinien verwendete Medien.	28
Tabelle 2 Verwendete Wirkstoffe für die Vorbehandlung der Zellen	30
Tabelle 3 Die verschieden zusammengesetzten Kit-Bestandteile für die jeweiligen Wells	36

7.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung des Citratzyklus mit eingezeichnetem SLC25A1 Transporter.	10
Abbildung 2 Patientenüberleben in Abhängigkeit der Expression von SLC25A1.	11
Abbildung 3 Schematische Darstellung der beiden Hauptwege der DNA-Reparatur in einer Tumorzelle nach Bestrahlung (IR).	12
Abbildung 4 Verknüpfung durch NHEJ.	13
Abbildung 5 Schematische Darstellung der HRR.	16
Abbildung 6 Formel zur Berechnung der D2HG Konzentrationen in den Proben.	37
Abbildung 7 Auswirkungen auf die Zellviabilität der Zellen nach Inhibition des SLC25A1 Transporter mit CTPi2	42
Abbildung 8 Anstieg von ROS-Induktion, Apoptose-Induktion und Zelltod 48 Stunden nach verschiedenen Vorbehandlungen	43
Abbildung 9 D2HG Level-Induktion nach SLC25A1 Inhibition mittels CTPi2 oder BTA	44
Abbildung 10 Entwicklung der D2HG Konzentrationen nach SLC25A1 Inhibition mittels CTPi2 oder siRNA.	46
Abbildung 11 Effekt einer Vorbehandlung mittels CTPi2 vor der Strahlenbehandlung auf die Kinetik der γH2AX-foci	47
Abbildung 12 Effekt einer Vorbehandlung mittels CTPi2 vor der Strahlenbehandlung auf die Kinetik der γH2AX-foci zum Zeitpunkt t=6h	48
Abbildung 13 Eine genetische Herabregulation der SLC25A1-Expression mittels siRNA vor Strahlentherapie zeigt einen längeren und höheren Anstieg an γH2AX-foci	49
Abbildung 14 Entwicklung der D2HG Konzentrationen nach SLC25A1 Inhibition in den MEF Zelllinien	51
Abbildung 15 Anstieg der ROS-, Apoptose- und Zelltod-Level 48 Stunden nach verschiedenen Vorbehandlungen	52
Abbildung 16 Auswirkungen der Inhibition des SLC25A1 Transporter mit CTPi2 auf die Zellviabilität der MEF Zellen	53

Abbildung 17 Langzeitüberleben von gentechnisch veränderten Zellen nach CTPI2 und Strahlenbehandlung.....	55
Abbildung 18 Effekt der Kombination verschiedener DNA Reparatur Inhibitoren auf die γH2AX Kinetik bei gentechnisch veränderten Zellen	56
Abbildung 19 Schematische Darstellung der Erzeugung einer synthetischen Letalität mittels 3 Hits.....	58
Abbildung 20 Effekt einer Kombinationsvorbehandlung mittels CTPI2 bzw. kombiniert mit PARPi oder DNA-PKi auf die Kinetik der γH2AX-foci nach Bestrahlung mit einer Dosis von 5Gy	59
Abbildung 21 Effekt einer Kombinationsvorbehandlung mittels CTPI2 bzw. kombiniert mit PARPi oder dem DNA-PK Inhibitor NU7441 auf die Anzahl der residualen γH2AX-foci nach Bestrahlung mit einer Dosis von 5Gy zum Zeitpunkt t=6h	60
Abbildung 22 Langzeitüberleben von vier Zelllinien nach Kombinationsbehandlung von CTPI2 mit PJ34 oder NU7441	62
Abbildung 23 Überlebensfraktion von vier Zelllinien nach Kombinationsbehandlung von CTPI2 mit PJ34 oder NU7441, dargestellt für die Bestrahlung mit einer Dosis von 5Gy	63
Abbildung 24 Langzeitüberleben von vier verschiedenen Tumor-Zelllinien in Abhängigkeit der Vorbehandlung mit CTPI2 und anschließender Protonenbestrahlung.....	65
Abbildung 25 Vergleich der Radiosensitivität von mit CTPI2 und Protonen vs. Photonen behandelten Zelllinien.....	67
Abbildung 26 Effekte der Strahlentherapie mit Protonen nach Vorbehandlung mit CTPI2 auf die Reparatur der DNA-Schäden	69
Abbildung 27 Effekte der Strahlentherapie mit Protonen nach Vorbehandlung mit CTPI2 auf die Reparatur der DNA-Schäden zum Zeitpunkt t=6 Stunden.....	70
Abbildung 28 Effekte der Strahlentherapie mit Protonen nach Vorbehandlung mit CTPI2 auf die Rad51 Kinetik in verschiedenen Tumorzelllinien.....	71
Abbildung 29 Effekte der Strahlentherapie mit Protonen nach Vorbehandlung mit CTPI2 auf die Rad51 Kinetik in verschiedenen Tumorzelllinien zum Zeitpunkt t=6 Stunden.....	72

Abbildung 30 Schematische Darstellung, der Inhibitoren der α Ketoglutarat-abhängigen dioxygenase (aKGDDs) 77

8 Lebenslauf

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht
enthalten.**

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht
enthalten.**