Universitätsklinikum Ulm Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Janni Sektion Gynäkologische Onkologie Leitung: Frau Prof. Dr. Lisa Wiesmüller

# KRAS Mutationen und DNA Reparaturfunktion in Nichtkleinzelligen-Lungenkarzinomzellen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Nikola Anna Luise Mattschas geboren in München vorgelegt im Jahr 2016 Amtierender Dekan: Herr Prof. Dr. Thomas Wirth

1.Berichterstatter: Frau Prof. Dr. Lisa Wiesmüller

2.Berichterstatter: Frau Prof. Dr. Tatiana Syrovets

Tag der Promotion: 14.12.2017

# Inhaltsverzeichnis

AbkürzungsverzeichnisIII
1 Einleitung1
1.1. Die DNA-Reparatur1
1.2. Die DSB-Reparatur2
1.3. Weitere Reparaturwege6
1.4. Die kleine GTPase KRAS11
1.5. Das Nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (NSCLC)14
1.6. Das Chemotherapeutikum Cisplatin17
1.7. Fragestellung18
2 Material und Methoden20
2.1. Materialien20
2.2. Methoden
3 Ergebnisse
3.1. Untersuchung zur Viabilität der Mutanten-KRAS exprimierenden
Klonsätze der Zelllinien H1299 und H2888 unter Cisplatinbehandlung
mit Hilfe des MTT-Assays
3.2. Untersuchung zur Viabilität der Mutanten-KRAS exprimierenden
Klonsätze der Zelllinie H1299 unter Behandlung mit den PARP-Inhibitoren
IQD und Nu102542
3.3. Überprüfung verschiedener DNA-Reparaturmechanismen als
mögliche Ursache der Resistenzentstehung in den Mutanten-KRAS
exprimierenden Klonsätzen der Zelllinie H129946

4	Diskussion	.60
	4.1. Cisplatinresistenz in soliden Tumoren und ihre möglichen	
	Ursachen	.60
	4.2. KRAS-Mutationen in NSCLC Zellen	.66
	4.3. Ansprechen der KRAS-mutierten NSCLC Zellen auf Cisplatin	67
	4.4. Ansprechen der <i>KRAS</i> -mutierten NSCLC Zellen auf PARP1- Inhibitoren	.68
	4.5. Beurteilung der DNA-Reparatur als Ursache für die Resistenz	
	gegen Cisplatin in den einzelnen Mutationsvarianten	69
5	Zusammenfassung	.77
6	Literaturverzeichnis	.77
7	Anhang	.93
D	anksagung	.98
Le	ebenslauf	99

## Abkürzungsverzeichnis

- 5-JÜR 5-Jahresüberlebensrate
- 53BP1 p53 binding protein 1
- °C Grad Celsius
- ALK Anaplastic lymphoma kinase
- aNHEJ alternative Non-homologous end joining
- APE1 apurinische Endonuklease 1
- **APS** Ammoniumperoxodisulfat
- AP-site abasische Stelle
- ATM Ataxia telangiectasia mutated
- ATP Adenosintriphosphat
- ATP7A ATPase, Cu++ transporting, alpha polypeptide
- ATP7B ATPase, Cu++ transporting, beta polypeptide
- cNHEJ Classic non-homologous end joining
- BACH1 BTB and CNC homology 1
- BER Basenexzisionsreparatur
- BLM Bloom syndrome, RecQ helicase-like
- **bp** base pairs
- BRCA1 breast cancer 1, early onset
- BRCA2 breast cancer 2, early onset
- **cl** Klon
- cm Zentimeter
- **CMV** Cytomegalievirus
- cNHEJ classic Non-homologous end joining
- CtIP CtBP-interacting protein

Ctr1 Copper-transporter 1

DMSO Dimethylsulfoxid

- DNA Desoxyribonukleinsäure
- DNA-PKcs DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
- **DSB** Doppelstrangbruch

**DTT** Dithiotreitol

- ECL Enhanced chemoluminescence
- EDTA Ethylendiamin-tetra-Essigsäure
- EGFP enhanced green fluorescent protein
- EGFR epidermal growth factor receptor
- EGTA Ethylen-Glycol-tetra-Essigsäure
- EJ end-joining
- EML4 Echinoderm microtubule-associated protein-like 4
- **ERCC** Excison repair cross-somplementation group
- ERK extracellular-signal regulated kinase
- EXO1 Exonuclease 1
- FA Fanconi Anämie
- FAAP24 Fanconi anemia associated protein of 24 kDa
- FACS fluorescence activated cell sorting
- FACT facilitates chromatin transcription
- FANC Fanconi anemia, complementation group
- FBS fetal bovine serum
- FEN1 Flap endonuclease 1
- G418 Geneticin
- **GAP** GTPase activating protein

- **GDP** Guanosindiphosphat
- GEF Guanine nucleotide exchange factor
- **GST** Glutathion-S-Transferase
- **GTP** Guanosintriphosphat
- h Stunde
- HCI Salzsäure
- HDR Homology directed repair
- hHR23B humanes Homolog von S. cerevisiae Rad23
- HMG high mobility group
- $hMutL\alpha$  humanes  $MutL\alpha$
- $hMutS\alpha$  humanes MutS\alpha
- hMutSβ humanes MutSβ
- HMW high-molecular-weight
- **HR** Homologe Rekombination
- HRP horseradish peroxidase
- IC50 Mittlere inhibitorische Konzentration
- ICL Interstrand crosslink
- **IQD** 1,5-Isoquinolinediol
- KU70 X-ray repair cross-complementing protein 6
- KU80 X-ray repair cross-complementing protein 5
- MEK Mitogen-activated protein kinase kinase
- min Minuten
- ml Milliliter
- MLH1 MutL protein homolog 1
- mm Millimeter

**MMEJ** Microhomology-mediated end joining

MMR Mismatch repair

MRN-Komplex MRE11-RAD50-Nibrin-Komplex

MSH MutS protein homolog

MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromid

N Stickstoff-Atom

NaCl Natriumchlorid

NaF Natriumfluorid

NaV Natriumvanadat

NER Nukleotidexzisionsreparatur

nm Nanometer

NP40 Nonidet P40

ns nicht signifikant

NSCLC Non-small cell lung carcinoma

nt Nukleotid

PAGE Polyacrylamide gel elecrophoresis

PALB2 Partner and localizer of BRCA2

PARP Poly-(ADP-ribose)-Polymerase

**PBS** Phosphate-buffered saline

PCNA Proliferating-cell-nuclear-antigen

PMS post-meiotic segregation increased

Pol Polymerase

RAD51 DNA-Reparaturprotein

RAD52 DNA-Reparaturprotein

Raf rapidly accelerated fibrosarcoma/rat fibrosarcoma

**RFC** recombination factor C

RFP red fluorescent protein

**RPA** replication protein A

**RT** Raumtemperatur

SCE sister chromatid exchange

SDS sodium dodecyl sulfate

ss single-stranded

**SSA** Single strand annealing

**SSB** Single strand break

**SSRP1** Structure specific recognition protein 1

SUPT16H Suppressor of Ty 16 homolog (S. cerevisiae)

T Tween

**TBS** Tris-buffered saline

TEMED Tetramethylethylendiamin

TFIIH Transkriptionsfaktor IIH

TLS Transläsionssynthese

**UV** ultraviolett

**µI** Mikroliter

**µM** Mikromolar

V Volt

wt Wildtyp

x g mal Erdbeschleunigung

XLF XRCC4-like factor

XPA Xeroderma pigmentosum, complementation group A

**XPB** Excison repair cross-complementation group 3

- **XPC** Xeroderma pigmentosum, complementation group C
- XPD Excison repair cross-complementation group 2
- **XPF** Excision repair cross-complementation group 4
- **XPG** Excison repair cross-complementation group 5
- **XRCC** X-ray repair cross-complementing protein

# 1 Einleitung

### 1.1. Die DNA-Reparatur

Die DNA (Desoxyribonukleinsäure) ist kontinuierlich schädigenden Stoffen sowohl exogener als auch endogener Natur ausgesetzt. Dies sind zum Beispiel ionisierende Strahlung, alkylierende Agenzien und Chemotherapeutika, aber auch zelluläre Metaboliten wie reaktive Sauerstoffspezies (Sancar et al. 2004, Wood et al. 2001). Um die Integrität und Stabilität des Genoms aufrechtzuerhalten, besitzt die Zelle eine Vielzahl von Reparaturmechanismen, die Schäden gezielt beheben können. Sind nur einzelne Basen betroffen, kann die intakte DNA durch Nukleotidexzisionsreparatur (NER), Basenexzisionsreparatur (BER) oder Mismatch repair (MMR) wiederhergestellt werden. Die NER entfernt vor allem unförmige DNA-Addukte, die durch Umweltfaktoren erzeugt wurden. Die BER kann mit Hilfe ihrer Reparaturproteine Basen ersetzen, die durch Oxidation und Hydrolyse der DNA beschädigt wurden. Die MMR ist in der Lage, Fehler in der Replikation beziehungsweise Fehlpaarungen während der Rekombination zu beheben.

Doppelstrangbrüche (DSB) sind viel seltener, aber auch extrem gefährlich für die Zelle, da sie die Kontinuität des Chromosoms unterbrechen. Ein einzelner DSB kann zum Zellzyklusarrest führen (Rich et al. 2000). Sie entstehen zum Beispiel durch ionisierende Strahlung oder bestimmte Chemotherapeutika, aber auch wenn sich mehrere Einzelstrangbrüche häufen oder die Replikationsgabel durch einen Einzelstrangbruch gestoppt wird (Wood et al. 2001, Khanna und Jackson 2001). DSB werden in Säugetierzellen vor allem durch die Homologie gerichtete Reparatur (HDR) oder das Non-homologous end joining (NHEJ) behoben. Die HDR findet dabei vor allem während der S- und G2-Phase des Zellzyklus statt, wenn eine Kopie des Genoms als Matrize vorliegt. Das NHEJ benötigt keine homologen Sequenzen und kann daher in jeder Phase des Zellzyklus aktiv werden (Jackson und Bartek 2009, Rothkamm et al. 2003).

Es sind zahlreiche Mutationen bekannt, die durch Dysfunktionen in der DNA-Reparatur zu vererbbaren Syndromen führen und die Inzidenz von Tumorerkrankungen erhöhen (Christmann et al. 2003) (siehe Tabelle 1). Um dies zu verhindern ist nicht nur das weite Feld an Reparaturmechanismen und die Koordination der einzelnen Bestandteile von Nöten, sondern auch die Aktivierung

1

von Zellzyklus Checkpoints und falls notwendig die Einleitung der Apoptose (Christmann et al. 2003, Hoeijmakers 2001, Sancar et al. 2004).

Taballa 4.		the end of the local	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	manafra Da	(!_! - · · · - · O.	
	' I Inorsiont		verernnare	naratur-ue	TIZIONZ-SV	narome
			VCICIDDUIC	-Daratur-DC		

Krankheit	Reparaturweg: Mutationen
Hereditäres nicht-polypöses	MMR: MSH2, PMS1, PMS2, MLH1
Kolonkarzinom Syndrom (HNPCCS)	
Ataxia telangiectasia	DNA Schadenssignalisierung: ATM
Fanconi Anämie	DNA ICL Reparatur: FANCA - FANCG
Bloom Syndrom	DSB Reparatur: <i>BLM</i>

#### 1.2. Die DSB-Reparatur

#### 1.2.1. Die Homologe Rekombination (HR)

Die HDR setzt sich aus der fehlerfreien Homologen Rekombination (HR) und dem fehlerbehafteten Single-strand annealing (SSA) zusammen. Zu Beginn der HR müssen die Bruchenden prozessiert werden (Nimonkar et al. 2008). Dabei kommt es zur Resektion des DSB um einzelsträngige DNA zu erzeugen. In Saccharomyces cervisiae werden zwei Resektionswege beschrieben: der eine erfordert Exo1, eine 5'-3'-dsDNA spezifische Nuklease, der andere Sgs1, eine 3'- 5'-Helikase, und Dna2, eine ssDNA-Nuklease/Helikase (Gravel et al. 2008, Mimitou und Symington 2008, Zhu et al. 2008). Außerdem soll noch ein dritter Resektionsweg existieren, der vom Mre11-Rad50-Xrs2-Komplex (MRX) und Sae2, einer DNA Endonuklease, abhängt (Mimitou und Symington 2008, Zhu et al. 2008). Beim Menschen ist der Vorgang der Resektion noch nicht so eindeutig geklärt wie in Hefen. Jedoch scheint die gleichzeitige Entfernung von BLM und EXO1 durch siRNA zu einer erhöhten Sensitivität gegen Camptothecin, einem zelltoxischen Alkaloid, und einer Einschränkung der DSB-Reparatur zu führen, was wiederum auf eine verminderte Bildung von einzelsträngiger DNA hindeutet (Gravel et al. 2008). Gleichzeitig gibt es Daten, die zeigen, dass EXO1 von BLM stimuliert, jedoch unabhängig von dessen Helikase-Aktivität, die Endresektion vermittelt (Nimonkar et al. 2008). Dies zusammengenommen scheint BLM eine stimulierende nicht-essentielle Wirkung

auf EXO1 und eine essentielle EXO1-unabhängige Wirkung in der Endresektion zu haben. Neuere Daten zeigen, dass BLM mit dem Dna2 Homolog DNA2 einen Komplex bildet, der DNA in Anwesenheit von RPA in 5'-3'-Richtung reseziert. Der MRE11-RAD50-Nibrin-Komplex (MRN-Komplex entsprechend MRX in Hefen) scheint diesen Vorgang zu unterstützen (Nimonkar et al. 2011). Außerdem konnte gezeigt werden, dass der MRN-Komplex und RPA, genauso wie BLM die Nuklease-Aktivität von EXO1 fördern (Nimonkar et al. 2008, Nimonkar et al. 2011). Nach Resektion des DBS werden die entstandenen einzelsträngigen 3'-Enden durch BRCA2 gebunden um einen exonukleolytischen Verdau zu verhindern. RAD52 hat in der menschlichen DNA-Reparatur die Aufgabe unabhängig von RAD51 SSA zu fördern. In der HR beim Menschen ist RAD51 unabhängig von RAD52 für die Invasion des überhängenden einzelsträngigen Endes des DSB in homologe Abschnitte des Schwesterchromatids zuständig. Ein Vorgang, der durch direkte Interaktion mit RAD52 katalysiert wird. Nach Synthese und Ligation der DNA werden die entstandenen Holliday-Strukturen entfernt und die reparierten Stränge getrennt (Christmann et al. 2003, Ciccia und Elledge 2010, Park et al. 1996, West et al. 2003). Eine wieder vollständig intakte DNA ist die Folge (siehe Abb. 1B).

## 1.2.2. Das Single-strand annealing (SSA)

Das SSA tritt auf, wenn es zu einem DSB in der Nähe einer von zwei repetitiven Sequenzen kommt. Auch hier kommt es zur Resektion der Bruchenden. Das Annealing d.h. das Verbinden der 3´-Enden wird durch RAD52 katalysiert, woraufhin überhängende DNA durch den XPF-ERCC1-Komplex entfernt wird. Dieser Reparaturweg resultiert immer in der homologen Deletion einer der Sequenzen und dem Abschnitt zwischen ihnen (Hartlerode und Scully 2009, Motycka et al. 2004, Stasiak et al. 2000) (siehe Abb. 1D).

## 1.2.3. Das classic Non-homologous end joining (cNHEJ)

Lange Zeit war das Non-homologous end joining als einzelner Reparaturweg bekannt. Inzwischen gibt es Daten, die zeigen, dass ein klassischer (cNHEJ) und ein alternativer Reparaturweg (aNHEJ) unterschieden werden können (Corneo et al. 2007, Guirouilh-Barbat et al. 2004)).

Zu Beginn des cNHEJ werden die Enden des Bruches vom KU-Heterodimer, bestehend aus KU70 und KU80, gebunden. KU ist in der Zelle im Überschuss

3

vorhanden und in der Lage eine Vielzahl von unterschiedlichen DNA-Strukturen zu binden (Downs und Jackson 2004). Das Heterodimer bildet dabei einen Ring um die DNA-Doppelhelix ohne Verbindung mit den Basen und nur wenig mit dem Zucker-Phosphat-Gerüst aufzunehmen (Walker et al. 2001). KU dient nun als Plattform für die Bindung weiterer wichtiger Faktoren des cNHEJ (Downs und Jackson 2004). Dafür rutscht KU auf der DNA nach innen und rekrutiert DNA-PKcs (DNA-dependent protein-kinase catalytic subunit), dessen Autophosphorylierung sehr wahrscheinlich für die Aktivierung der Prozessierung der gebundenen DNA-Enden durch ARTEMIS verantwortlich ist (Chan et al. 2002, Cui et al. 2005, Yoo und Dynan 1999). Nach der Aufbereitung können die DNA-Enden ligiert werden. Dieser Vorgang wird vom XRCC4-DNA-Ligase IV-XLF-Komplex durchgeführt (Mahaney et al. 2009). Werden glatte Enden oder kompatible Überhänge verknüpft, ist die erfolgte Reparatur meist fehlerfrei. Jedoch können auch inkompatible Sequenzen verbunden und Lücken in der DNA übersprungen werden, was zu einer fehlerhaften DNA-Sequenz führen kann (siehe Abb. 1A).

#### 1.2.4. Das Micro-homology mediated end joining (MMEJ)

Es wurde bekannt, dass das aNHEJ nicht nur als Ersatz fungiert, wenn wichtige Faktoren des cNHEJ fehlen, sondern dass dieser Reparaturweg auch in gesunden Säugetierzellen vorhanden ist und seinen Ursprung in Bakterien haben könnte (Chayott et al. 2009, Deriano und Roth 2013). Die durch aNHEJ vermittelte DNA-Reparatur beruht hauptsächlich auf der Verbindung von Mikrohomologien und wird auch Micro-homology mediated end joining (MMEJ) genannt (Guirouilh-Barbat et al. 2004, Yan et al. 2007, Zha et al. 2009). Seine Funktion und auch der genaue Ablauf der Reparatur sind noch nicht vollständig geklärt. Entscheidend scheint die Anwesenheit von Mikrohomologien von mindestens 5 nt Länge, sowie die begrenzte Resektion der Bruchenden zu sein (Deriano und Roth 2013, Sharma et al. 2015). PARP1 scheint das MMEJ zu initiieren (Audebert et al. 2004, Sharma et al. 2015), während der MRN-Komplex und unphosphoryliertes CtIP (CtBP-interacting protein) die Resektion der Bruchenden bewirken (Bennardo et al. 2009, Yun und Hiom 2009). Die Ligation der DNA-Enden könnte durch die DNA-Ligasen III und/oder I, sowie XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1) erfolgen (Simsek et al. 2011, Sharma et al. 2015). Die Reparatur eines DSB durch MMEJ führt immer zu Deletionen an den Verbindungsstellen (siehe Abb. 1C).



Abbildung 1: DSB Reparaturwege in der Übersicht ("Reprinted from Molecular Cell, 40/2, Alberto Ciccia, Stephen J. Elledge, The DNA Damage Response: Making it safe to play with knives, 179-204, (2010) with permission from Elsevier").

**A. cNHEJ:** Das KU-Heterodimer wird zeitnah an die Bruchenden gebunden und führt durch Rekrutierung der DNA-PKcs zur Einleitung des cNHEJ. Die Enden werden durch ARTEMIS prozessiert und daraufhin durch den XRCC4-DNA Ligase IV-XLF-Komplex ligiert. **B. HR:** Nach Resektion des DSB durch Interaktion von BLM, EXO1 und dem MRN-Komplex, werden die 3'-Enden durch RPA gebunden. RAD51 führt zur Invasion des Stranges in homologe DNA-Sequenzen. Entstandene Holliday-Strukturen werden gelöst und die reparierten Stränge getrennt. **C. MMEJ:** Eine begrenzte Resektion der Bruchenden durch den MRN-Komplex und CtIP sowie die Rekrutierung von PARP1, führt in Anwesenheit von Mikrohomologien zum MMEJ. Die Ligatur der DNA-Enden geschieht durch XRCC1 und DNA-Ligase III. **D. SSA:** In Anwesenheit von repetitiven DNA-Sequenzen wird die Reparatur durch SSA von RAD52 katalysiert. Überhängende DNA wird daraufhin durch den XPF/ERCC1-Komplex entfernt.

#### 1.3. Weitere Reparaturwege

#### 1.3.1. Der Fanconi-Anämie-Reparaturweg

Der Fanconi-Anämie-Reparaturweg ist in der Lage DNA Inter-strand crosslinks (ICL), also Verbindungen zwischen beiden Strängen der Helix, zu entfernen. Gene, die diesen Reparaturweg regulieren, sind in dem seltenen vererbbaren Syndrom der Fanconi-Anämie (FA) mutiert und haben daher ihren Namen erhalten. Der FA-Mechanismus vereinigt und koordiniert Elemente aus drei verschiedenen Reparaturwegen: der HR, der NER und der Transläsionssynthese (TLS) (Räschle et al. 2008, Thompson und Hinz 2009). Es wird eine zunehmende Anzahl verschiedener FA-Proteine unterschieden, deren Großteil den FA core complex bildet. FANCM-FAAP24 dagegen sind in der Lage gestoppte Replikationsgabeln zu erkennen und daraufhin den FA core complex an die DNA zu rekrutieren. Der Komplex besitzt Ubiquitinligase-Aktivität und ubiquitiniert FANCD2-I, was wiederum zu dessen Lokalisation an nukleäre Foci führt (Meetei et al. 2003, De Winter und Joenje 2009). Von diesen Foci wird angenommen, dass es sich dabei um Strukturen der DNA-Reparatur handelt, da sie Reparaturproteine enthalten (Bogliolo et al. 2007, Garcia-Higuera et al. 2001, Hussain et al. 2004). Weitere Faktoren scheinen später im Reparaturprozess beteiligt zu sein. FANCJ, auch bekannt als BACH1, interagiert mit BRCA1 und scheint über seine Helikase-Funktion in der DNA-Reparatur involviert zu sein (Cantor et al. 2001, Cantor et al. 2004). FANCD1, besser bekannt als BRCA2, ist ein Rekombinationsmediator, der die Bildung von RAD51-Nukleofilamenten ermöglicht, die wiederum für die Stranginvasion während der HR wichtig sind (Sung und Klein 2006, Yang et al. 2002, siehe Abb.1). FANCN, auch PALB2 genannt, fördert die Lokalisation von BRCA2 an die DNA und daher auch dessen Funktion in der DNA-Reparatur (Xia et al. 2006).

Um den ICL zu reparieren wird zunächst durch Endonukleasen ein DSB erzeugt (Hanada et al. 2006, Silva et al. 2000), woraufhin auf der anderen Seite des ICL am selben Strang ein weiteres Mal geschnitten wird. Wahrscheinlich wird dies vom ERCC1/XPF-Komplex durchgeführt, der durch Einzelstrang-gebundenes RPA vorgegeben bekommt welcher Strang durchtrennt werden soll. Die quervernetzte Base kann nun abgetrennt und durch spezialisierte Polymerasen der TLS überwunden werden (Räschle et al. 2008). Diese Polymerasen erlauben zwar die Umgehung der Läsion, allerdings fügen sie auch häufig falsche Basen ein, was zu

6

einer Mutation auf dieser Seite des ICL führt. Die losgelöste Quervernetzung ähnelt einem einzelnen Nukleotidfehler und kann daher durch NER repariert werden. Die Replikationsgabel wird daraufhin durch die HR-Maschinerie wiederhergestellt. Dies führt vermutlich auch zum Sister chromatid exchange (SCE), dem Austausch von DNA zwischen den Chromatiden (Niedernhofer et al. 2005) (siehe Abb. 2).



Abbildung 2: Entfernung von Inter-strand crosslinks (ICL) ("Reprinted from Cell, 123/7, Laura J. Niedernhofer, Astrid S. Lalai, Jan H.J. Hoeijmakers, Fanconi Anemia (Cross)linked to DNA Repair, 1191-1198, (2005) with permission from Elsevier").

1.,2. Nach dem Anhalten der Replikationsgabel und der Rekrutierung des FA core complex, 3.-6. kommt es zu zwei Inzisionen in die DNA.
7. Daraufhin kann an der Quervernetzung vorbei synthetisiert und 8. diese durch NER entfernt werden.
9.-12. Die Replikationsgabel wird unter wahrscheinlicher Induktion von SCE durch die HR-Maschinerie wiederhergestellt.

#### 1.3.2. Die Nukleotidexzisionsreparatur (NER)

Die NER reagiert auf eine große Anzahl an Schäden, die den Verlauf der DNA-Doppelhelix stören. Dies sind zum Beispiel Pyrimidin-Dimere, die durch UV-Strahlung, oder Addukte, die entweder endogen durch aromatische Amine oder exogen durch Chemotherapeutika induziert wurden. Die Relevanz, Schäden durch UV-Strahlung zu entfernen, wird am Beispiel der Krankheit Xeroderma pigmentosum deutlich. Es handelt sich um ein Syndrom, das Mutationen für Faktoren der NER aufweist und dadurch mit einem erhöhten Risiko für Hautkrebs einhergeht. Der Inzisionskomplex besteht aus XPA, dem ssDNA-bindenden Protein RPA, dem XPC-hHR23B-Komplex, dem TFIIH-Komplex und zwei Nukleasen XPG und ERCC1/XPF. Während der Reparatur wird die fehlerhafte DNA wahrscheinlich durch den XPC-hHR23B-Komplex erkannt. In einer ATP-abhängigen Reaktion entsteht eine offene Struktur um die Läsion herum, die spezifische Schnittstellen schafft, um ein etwa 24 bis 30 bp langes Stück zu entfernen. Diese Struktur wird durch die Helikase-Aktivität der TFIIH-Untereinheiten XPB und XPD mit Hilfe von XPA und RPA gebildet. Am 3'-Ende kann nun durch XPG, am 5'-Ende durch den ERCC1/XPF-Komplex geschnitten werden. Die entstandene Lücke wird durch die PCNA-abhängige Polymerase  $\varepsilon$  oder  $\delta$  gefüllt und die DNA schlussendlich vermutlich durch die DNA-Ligase I verbunden (Gillet und Schärer 2006, Lindahl 1999, Wood 1997) (siehe Abb. 3).



Abbildung 3: Übersicht über die Nukleotidexzisionreparatur ("This research was originally published in Journal of Bilogical Chemistry. Richard D. Wood. Nucleotide Excision Repair in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272 (38) 23465-23468. © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology").

**A.,B.,C.** Nach Erkennung der Läsion durch den XPC-hHR23B-Komplex, wird in einer ATP-abhängigen Reaktion durch die Helikase-Aktivitäten von XPB und XPD, sowie RPA und XPA eine offene Struktur um die Läsion gebildet. **D.** Dies erlaubt das Ausschneiden eines 24 bis 30 bp langen Stückes durch XPG am 3´-Ende und den ERCC1-XPF-Komplex am 5´-Ende. **E.** Die Lücke wird durch die PCNA-abhängige Polymerase  $\varepsilon$  oder  $\delta$  gefüllt und durch die DNA-Ligase I ligiert.

#### 1.3.3. Die Mismatch-repair (MMR)

Das MMR ist wichtig für die Entfernung von Insertionen und Deletionen, sowie Basen-Falschpaarungen, die durch fehlerhafte Polymerasen erzeugt werden können. In Escherischia coli wird das MMR durch die Faktoren MutS, MutL, MutH und uvrD bedingt. Es wurden fünf MutS-Homologe (MSH) in Säugetierzellen entdeckt, von denen MSH2, MSH3 und MSH6 an der MMR teilnehmen. Bei Fehlpaarungen und Deletionen/Insertionen von ein bis zwei Nukleotiden, wird die Reparatur durch ein MSH2-MSH6-Heterodimer, das auch als hMutSα bezeichnet wird, initiiert. Sind größere Bereiche betroffen, wird das MSH2-MSH3-Heterodimer aktiv (hMutSβ). Hierauf wird hMutLα (MLH1-PMS2) rekrutiert, welches die größte Rolle in der MMR zu spielen scheint. hMutSα-hMutLα bilden einen Komplex an der Läsion, der in einer ATP-abhängigen Reaktion eine Konformationsänderung unternimmt und von der Fehlpaarung losgelöst wird. In 5´-Richtung trifft der Komplex auf den recombination factor C (RFC). Es konnte gezeigt werden, dass MutLα eine latente Endonuklease-Funktion besitzt, die durch eine Fehlpaarung, MutSα, RFC und PCNA aktiviert wird. Durch diesen Komplex kann eine Inzision bevorzugt distal der ursprünglichen Fehlpaarung erzeugt werden, welche entscheidend ist um ein 5´-Ende zu erzeugen, das wiederum als Eintrittsstelle für MutSα-aktiviertes EXO1 dient (Kadyrov et al. 2006). Nun beginnt der Abbau des Stranges in 5´-3´-Richtung bis die Fehlpaarung entfernt wurde, dann wird EXO1 durch hMutSα nicht mehr stimuliert und durch hMutLα aktiv gehemmt. Die einzelsträngige DNA wird durch RPA stabilisiert. Am 3´-Ende beginnt die Polymerase δ PCNA-abhängig die Lücke zu schließen, die DNA wird schlussendlich durch die DNA-Ligase I versiegelt.

Wandert der Komplex in 3'-Richtung, trifft er auf PCNA. Nun wird ebenfalls EXO1 aktiviert und vermutlich mehrfach rekrutiert, bis die Fehlpaarung entfernt wurde. RFC verhindert den Abbau in 5'-3'-Richtung, das heißt vom Fehler weg. Sobald die Läsion beseitigt wurde, wird EXO1 durch gebundenes RPA und hMutL $\alpha$  inhibiert. Die Polymerase  $\delta$  schließt auch hier die Lücke und die DNA-Ligase I vollendet den Reparaturprozess (Blackweel et al. 2001, Chung und Rustgi 1995, Jiricny 2006, Marti et al. 2002) (siehe Abb. 4).



Abbildung 4: Übersicht über das Mismatch repair (MMR) ("Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Molecular Cell Biology, 7 (5), Josef Jiricny, The multifaceted mismatch-repair system, 335-346, (2006)").

Nach Erkennung der Fehlpaarung durch hMuts $\alpha$  (oder hMutS $\beta$ ), wird ein MutS $\alpha$ -MutL $\alpha$ -Komplex an der Läsion gebildet, der ATP-abhängig seine Konformation ändert und die Fehlpaarung verlässt. Wandert er in 5´-Richtung, trifft er auf RFC, der daraufhin durch EXO1 ersetzt wird. Nun beginnt der Abbau der DNA in 3´-Richtung. ssDNA wird durch RPA gebunden. Wandert der Komplex in 3´-Richtung, trifft er auf PCNA. Nun wird EXO1 so oft an die DNA rekrutiert bis die Fehlpaarung entfernt wurde. RFC stabilisiert die DNA in 5´-3´-Richtung. In beiden Fällen wird daraufhin die entstandene Lücke durch die Polymerase  $\delta$  geschlossen und die DNA durch die DNA-Ligase I versiegelt.

#### 1.4. Die kleine GTPase KRAS

In der *RAS* Genfamilie kodieren drei Gene für die vier Proteine HRAS, NRAS, KRAS4A und KRAS4B, wobei es sich bei Letzteren um zwei Spleißvarianten des *KRAS* Gens handelt. Die RAS Proteine fungieren als molekulare Schalter mit GTPase-Aktivität, die an der Signaltransduktion von extra- nach intrazellulär

beteiligt sind. Guanine nucleotide exchange factors (GEFs) fördern den Austausch von GDP durch GTP, in diesem Zustand sind die RAS Proteine aktiv und aktivieren ihrerseits nachfolgende Effektoren. Die GTPase-activating proteins (GAPs) dagegen unterstützen die Umwandlung von GTP in GDP und damit die Inaktivierung (Scheffzek et al. 1997). In gesunden Zellen interagieren die RAS Proteine mit Faktoren, die die Genexpression sowie die Regulation von Zellproliferation, Zelldifferentierung und Zellüberleben kontrollieren. Aktivierende Mutationen in den *RAS* Genen, die zur dauerhaften Aktivierung der zellulären Effektoren führen, sind für die Entstehung von einigen Tumoren verantwortlich. In Abbildung 5 ist eine Übersicht über die Signalwege zu sehen, die durch fehlerhaftes KRAS überaktiviert werden. Besondere Bedeutung kommt dem RAF-MEK-ERK-Signalweg zu, der in 30% aller Krebsarten überaktiv ist und Genexpression, zytoskeletale Umgestaltung und Metabolismus der Zelle kontrolliert (Davies et al. 2002, Garnett und Marais 2004, Mitin et al. 2005).



Abbildung 5: Normale Signaltransduktion durch KRAS und von onkogenem KRAS betroffene zelluläre Effektoren ("Reprinted from Clinical Cancer Research, 2014, 20 (15), 3921-3930, Neil Vasan, Julie L. Boyer, Roy S. Herbst. A RAS Renaissance: Emerging Targeted Therapies for KRAS-Mutated Non–Small Cell Lung Cancer, with permission from AACR").

**A.** GEFs fördern die Aktivierung von KRAS durch den Austausch von GDP durch GTP. GAPs dagegen unterstützen die GTPase Funktion von KRAS und führen so zu seiner Inaktivierung. **B.** Liegt eine aktivierende *KRAS*-Mutation vor, ist KRAS dauerhaft an GTP gebunden und kann dadurch nicht mehr mit GAPs interagieren. Die nachfolgenden Effektoren werden somit permanent stimuliert. Sie spielen eine Rolle für Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zellüberleben. Der RAF-MEK-ERK-Signalweg ist in 30% aller Krebsarten überaktiviert.

Mutationen im *KRAS* Gen spielen dabei vor allem für Kolorektale, Lungen- und Pankreaskarzinome eine Rolle (siehe Abb. 6A). Die meisten Mutationen sind Missense-Mutationen in den Codons 12, 13 (siehe Abb. 6B) und 61 und behindern die Hydrolyse von GTP (Pylayeva-Gupta et al. 2011, Vasan et al. 2014, Wennerberg et al. 2005). 17% aller Lungenkarzinome weisen eine *KRAS*-Mutation auf.



Abbildung 6: Prozentuale Verteilung von *RAS* Mutationen in humanen Tumoren und vorherrschende histologische Subtypen ("Reprinted from Clinical Cancer Research, 2014, 20 (15), 3921-3930, Neil Vasan, Julie L. Boyer, Roy S. Herbst. A RAS Renaissance: Emerging Targeted Therapies for KRAS-Mutated Non–Small Cell Lung Cancer, with permission from AACR").

**A.** *KRAS*-Mutationen finden sich in abnehmender Häufigkeit in Pankreas-, kolorektalen, biliären und Lungentumoren. **B.** Davon sind der Großteil Adenokarzinome. Die vorherrschende Mutation in Lungenkarzinomen ist die Missense-Mutation G12C, in kolorektalen, biliären und Pankreastumoren die Missense-Mutation G12D.

#### 1.5. Das Nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (NSCLC)

Laut dem Statistischen Bundesamt besetzten bösartige Neubildungen 2013 den zweiten Platz der Todesursachen in Deutschland. Von diesen wiesen Lungenkarzinome bei Männern und Frauen die höchste Mortalitätsrate auf. Der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung von Lungenkarzinomen ist das Rauchen, sowohl aktiv als auch passiv (Doll und Hill 1950), die Reduktion des Tabakkonsums stellt daher auch die wichtigste präventive Maßnahme dar. Doch auch Frauen, Menschen mit schlechtem sozioökonomischem Status und Afro-Amerikaner haben ein erhöhtes Risiko an Lungenkrebs zu erkranken (Alberg et al. 2007). Histologisch können Lungenkarzinome in Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome, großzellige und kleinzellige Lungenkarzinome unterteilt werden. Die ersten drei bilden die Gruppe der Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome (NSCLCs) und machen etwa 80% aus. Die Trennung von kleinzelligen Karzinomen (SCLC) und NSCLCs ist wichtig, da sie sich im Therapiekonzept unterscheiden. In Tabelle 2 sind die Therapieoptionen für NSCLCs abhängig vom Stadium bei Erstdiagnose aufgeführt.

Stadium	Therapie	5-JÜR	Referenz
Stadium I	Operative Resektion,	Stadium I 60-80%	Scott et al.
Stadium II	Radiotherapie wenn	Stadium II 40 -	2007
(gemeinsam 25-30%	Tumor inoperabel oder	50%	
der Erstdiagnosen)	Patient keine Operation		
	wünscht, im Stadium II		
	adjuvante Platin-basierte		
	Chemotherapie auch nach		
	vollständiger Resektion		
Stadium IIIA (10% der	Operative Resektion mit	23%	Robinson et
Erstdiagnosen)	nachfolgender adjuvanter		al. 2007
	Platin-basierter		
	Chemotherapie,		
	Radiochemotherapie		
	wenn intraoperativ N2-		
	Situation festgestellt		
Stadium IIIB (10-15%	Radiochemotherapie	3-7%	Jett et al. 2007
der Erstdiagnosen)			
Stadium IV (40% der	Palliative Platin-basierte	Unter Platin-	Socinski et al.
Erstdiagnosen)	Chemotherapie	basierter	2007
		Chemotherapie	Socinski et al.
		etwa 6,5 Monate	2003
1	1	1	1

Tabelle 2: Therapieoptionen und 5-Jahresüberlebensrate (5-JÜR) abhängig vom Stadium bei Erstdiagnose in Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen.

Wie in Tabelle 2 verdeutlicht, wird nur ein kleiner Teil der Erstdiagnosen in einem frühen Stadium gestellt und die Prognose der meisten Patienten ist daher schlecht. Die Platin-basierte Chemotherapie spielt daher eine wesentliche Rolle im Therapieschema.

#### 1.6. Das Chemotherapeutikum Cisplatin

Das Chemotherapeutikum Cisplatin wurde 1965 zufällig durch Barnett Rosenberg entdeckt, als er versuchte durch ein elektrisches Feld die Zellteilung von Escherichia coli-Bakterien zu beeinflussen und dafür Platinelektroden verwendete. 1978 wurde Cisplatin für die Therapie von Hoden- und Blasentumoren zugelassen.

Wie Cisplatin in die Zelle kommt, ist noch nicht vollständig geklärt. Wahrscheinlich ist jedoch, dass kein aktiver Transportmechanismus vorliegt (Binks und Dobrota 1990), sondern die Aufnahme durch passive Diffusion geschieht und mit dem Kupferhaushalt assoziiert ist (Ishida et al. 2002). Sobald Cisplatin in die Zelle gelangt, unterliegt es dem Prozess der Aquation, wobei ein Chlorid-Ligand durch ein Wassermolekül ersetzt wird. Die niedrige intrazelluläre Chloridkonzentration unterstützt diesen Prozess. Diese Form des Platin-Komplexes ist reaktionsfreudiger und sein primärer Reaktionspartner die DNA (Jamieson und Lippard 1999). Das Platin-Atom geht nun kovalente Bindungen mit dem N7-Atom von Purinbasen ein und bildet so hauptsächlich 1,2- oder 1,3-Intrastrang-Quervernetzungen und eine kleinere Anzahl an Interstrang-Quervernetzungen (ICL) (siehe Abb. 7). SSRP1 und SUPT16H bilden gemeinsam den FACT-Komplex (Facilitates Chromatin Transcription), der über seine high mobility group (HMG)-Domäne in der Lage ist die Quervernetzung zu erkennen (Yarnell et al. 2001). Das Signal, dass die DNA beschädigt wurde, kann nun auf verschiedenen Wegen übertragen werden. Dies führt zum Zellzyklusarrest und daraufhin entweder zur Reparatur der Quervernetzung oder zur Apoptose der Zelle (Wang und Lippard 2005).

In Studien hat sich gezeigt, dass eine Zweifach-Kombinationstherapie mit Cisplatin (oder einem anderen Platin-haltigen Medikament) und einem neuen Chemotherapeutikum wie zum Beispiel Gemcitabine, Paclitaxel oder Vinorelbine das Ansprechen auf die Therapie und das Überleben von NSCLC-Patienten in späten Stadien verbessert (Bunn 2002, Cosaert und Quoix 2002).

Im klinischen Setting wird beobachtet, dass ein Teil der Patienten, die in erster Linie mit platin-haltigen Chemotherapeutika behandelt wurden, nach einer gewissen Zeit nicht mehr auf die Therapie anspricht. Vor allem kolorektale, Lungen- und Prostatakarzinome scheinen eine intrinsische Resistenz gegen Cisplatin zu besitzen, während eine sekundär entwickelte Chemoresistenz besonders häufig in Ovarialkarzinomen auftritt (Galluzzi et al. 2012, Köberle et al. 2010).

17



Nach der Aquation, d.h. dem Austausch der Chlorid-Liganden durch Wassermoleküle, bindet das Platin-Atom an das N7-Atom von Guanin-Basen. Die daraus entstandenen Intra- oder Interstrang-Quervernetzungen werden erkannt und führen zum Zellzyklusarrest. Nun kann der Schaden entweder repariert werden oder die Apoptose der Zelle wird eingeleitet.

#### 1.7. Fragestellung

Ziel meiner Doktorarbeit war überprüfen, ob es zu unterschiedliche Austauschmutationen am Codon 12 eines KRAS-Transgens in den NSCLC-Zelllinien H1299 und H2888 zu einer Resistenz der Krebszellen gegen Cisplatin führen. Sollte sich diese Hypothese bestätigen, sollte weiterhin untersucht werden, auf welche Weise die Resistenz zu Stande kommt. Es existierten bereits mehrere Theorien über die Resistenzentstehung von KRAS mutierten NSCLC-Zellen gegen Cisplatin. Diese beinhalteten die reduzierte Aufnahme von Cisplatin in die Zelle, die verminderte Verknüpfung mit der DNA, das verstärkte Entfernen der entstandenen Quervernetzungen und die Hemmung des Apoptose-Signalweges. In meiner Doktorarbeit habe ich verschiedene Mechanismen der DNA-Reparatur auf ihre Funktion in den mutierten Zellen hin erforscht. Die Überaktivierung eines DNA-Reparaturweges könnte zum verstärkten Beheben der Schäden durch Cisplatin und damit zur Reduktion der Zytotoxizität führen.

# 2 Material und Methoden

### 2.1. Materialien

Agarosegelelektrophorese-Kammern:

RunOne PerfectBlue Mini

Analysenwaagen: P1200 Sartorius BP61

Mettler, Gießen Sartorius, Göttingen

PeqLab, Erlangen

Embitec, San Diego, CA, USA

Autoklav: Varioklav 75S HP

Brutschränke: Inkubator B6760 Inkubator 311

Heraeus, Hanau Thermo, Egelsbach

Eppendorf, Hamburg

Medizintechnik GmbH,

Oberschleißheim

Concentrator 5301

Durchflusszytometer: FACSCalibur ™ FACSCalibur™ HTS

Eismaschine

Becton Dickinson, Heidelberg Becton Dickinson, Heidelberg

Ziegra, Isernhagen

Gefrier-und Kühlsysteme: -86 °C, HFU3285SITOP-V37 -86 °C, Forma Scientific 917 Premium NoFrost Froster-520

Kendro, Asheville, NC, USA Thermo, Fremont, CA, USA Liebherr, Ochsenhausen Kirsch, Offenburg

Geldokumentationsanlage:	
Bio-Rad ChemiDoc™ MP	BioRad Laboratories, München
Gelgießkammer SE200	Hoefer Pharmacia Biotech, San
	Francisco, CA, USA
Magnetrührer:	
MR 3000 magnetic stirrer	Heidolph Instruments, Schwabach
Mikroskope:	
Axiovert 25	Zeiss, Jena
Olympus IX50-S8F	Olympus, Tokyo, Japan
Olympus BX51	Olympus, Tokyo, Japan
Polyacrylamid-	
Gelelektrophoresesystem:	
SE250	Amersham Pharmacia Biotech,
	Freiburg
Mighty Small II	Amersham Pharmacia Biotech,
	Freiburg
Sauger:	
Membran Vakuum Pumpe	Vakuubrand GmbH, Wertheim
Integra Vakusafe	Integra Biosciences, Switzerland
Schüttler:	
Phero Shaker	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Gyro rocker SSL3	Stuart scientific, Staffordshire, UK
-	
Spektralphotometer:	
Sunrise Tecan	Männerdorf, Schweiz

Stromversorgungsgeräte:	
EPS 1000	Amersham Pharmacia Biotech,
	Freiburg
EPS 1001	Amersham Biosciences,
	Piscataway, NJ, USA
EPS 2A 200	Amersham Biosciences,
	Piscataway,
	NJ, USA
Sterilbank:	
Clean Air DLF/REC6	Clean Air Techniek, Woerden,
	Niederlande
Clean Air DLF/BSS6	Clean Air Techniek, Woerden,
	Niederlande
Test-Tube-Rotator	Snijders, Tilburg, Niederlande
Thermomixer:	
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Western-Blotkammer TE Series	Amersham Pharmacia Biotech,
	Freiburg
VortexGenie 2	Bender und Hobein, Zürich,
	Schweiz
Zentrifugen:	
Biofuge fresco	Kendro, Osterode
Biofuge pico	Kendro, Osterode
Multifuge1S-R	Kendro, Osterode
Multifuge3S-R	Kendro,Osterode

#### 2.1.2. Software

cell^F 2.5	Olympus Europe
GraphPad Prism 5.01	Graphpad Software Inc., La Jolla,
	CA, USA
Image Lab™ Software	Bio-Rad Laboratories, München
Magellan 3	Tecan, Crailsheim
Microsoft Office 2013	Microsoft Corporation, Redmond,
	USA

#### 2.1.3. Chemikalien

Acrylamide/	Bisacrylamide	(30:0.8)	National Diagnostics, Atlanta, USA
(w/V)			
Agarose			Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniump	eroxodisulfate (A	APS)	Bio-RAD Laboratories, Hercules,

Bromphenolblau Complete Mini Protease Inhibitor Dimethylsulfoxid (DMSO) 1,4-Dithiothreitol (DTT) Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA) Ethanol absolut Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) FACS-Clean FACS-Flow FACS-Flow FACS-Rinse Fetal Bovine Serum Superior (FBS) Formaldehyde 37 % Geneticin (G418)

Glycerol Glycerolphosphat Glycin USA Merck, Darmstadt Roche Applied Science, Mannheim Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, Steinheim Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, Steinheim Applichem, Darmstadt Becton Dickinson, Heidelberg Becton Dickinson, Heidelberg Becton Dickinson, Heidelberg Biochrome, Berlin Sigma-Aldrich, Steinheim Technologies, Gibco BRL Life Eggenstein J.T. Baker, Deventer, Niederlande Merck, Darmstadt

Applichem, Darmstadt

Goat serum 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinylethansulfonsäure (HEPES) Isopropanol Isoseptol Magnesiumchlorid β-Mercaptoethanol

Methanol Milchpulver Nonidet P40 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (1x/10x) Ponceau S Lösung Natriumchlorid Natriumdodecylsulfat (SDS) Natriumfluorid Natriumvanadat Rotiphorese 10x SDS-PAGE RPMI 1640 ohne Phenolrot

#### **RPMI 1640**

Salzsäure Sucrose Synth-a-freeze (Einfriermedium)

Tetramethylethylendiamin (TEMED) Tris-Base 495 mM Tris/HCI Triton-X-100 Trypanblau Lösung

**Trypsin-EDTA** 

Sigma-Aldrich, Steinheim Serva, Heidelberg Sigma-Aldrich, Seelze Universitat Ulm Sigma-Aldrich, Seelze **Bio-RAD Laboratories**, Hercules, USA Sigma-Aldrich, Seelze Roth, Karlsruhe Fluka, Neu-Ulm Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein Sigma-Aldrich, Steinheim Sigma-Aldrich, Steinheim Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, Steinheim Roth, Karlsruhe BRL Gibco Technologies, Life Eggenstein Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein Merck, Darmstadt Merck. Darmstadt Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, Steinheim Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, Steinheim Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein PAA, Pasching

Tween 20 Vectashield

2.

Merck, Darmstadt Vector Laboratories, Inc. Burlingame

2.1.4. Kits und andere Materialien

BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, USA, Rockford
Chemiluminescence Substrate	
Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories, USA
Deckplättchen, 24x60 mm	Menzel Gläser, Braunschweig
FACS Rundbodenröhrchen (5 ml)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Falconröhrchen (15ml/50ml)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Filterpapier Whatman 3 mm	Schleicher und Schüll, Dassel
FuGENE HD Transfection Reagent	Roche, Mannheim
Gene Ruler™ DNA Ladder-Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Hybond-C-Extra, Nitrocellulose	Amersham Biosciences, Freiburg
Objektträger, Superfrost	Menzel Gläser, Braunschweig
Page Ruler™ Pre-Stained Protein	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Ladder	
Restore™ Western Blot Stripping	Thermo Scientific, USA
Buffer	
Das restliche Plastikmaterial wurde	
von Sarstedt bereitgestellt	
1.5. Puffer und Lösungen	
4x SDS Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
	0,4% (w/v) SDS
4x SDS-Trenngelpuffer	20 mM Tris/HCl, pH 7,6
	0,4% (w/v) SDS

10 x High-molecular-weight (HMW)-Puffer

495 mM Tris-Base

PBS-T	0,05% (v/v) Tween 20 in 1 I PBS (1x)
Präextraktionspuffer für Immunfluoreszenz	20 mM HEPES; pH 7.4 50 mM Natriumchlorid 1 mM EDTA 3 mM Magnesiumchlorid 300 mM Sucrose 0.5 % Triton-X-100
2 x SDS-Probenpuffer	125 mM Tris/HCl pH 6,8 3,1% (w/v) DTT 4% (w/v) SDS 20% (v/v) Glyzerin 0,05% (w/v) Bromphenolblau 4% β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)
6 x SDS-Probenpuffer	350 mM Tris/HCl pH 6,8 9,3% (w/v) DTT 10% (w/v) SDS 36% (v/v) Glyzerin 0,6% (w/v) Bromphenolblau 5% β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)
TBS-T	20 mM Tris/HCl, pH 7,6 137 mM Natriumchlorid 0,2% (v/v) Tween 20
Zelllysepuffer für Proteinextraktion

50 mM Tris-Base (pH 7,4) 150 mM NaCl 2 mM EGTA 2 mM EDTA 25 mM NaF 25 mM β-Glycerolphosphat 0,1 mM NaV 0,2% (w/v) Triton-X-100 0,3% (v/v) Nonidet P40 1/2 Proteaseinhibitorcocktailtablette (frisch zugesetzt)

### 2.1.6. Zellkulturmedium

H1299, H2888

50ml FBS 5ml G418 (Geneticin) In 300ml RPMI 1640

Transfektionsmedium

50ml FBS In 300ml RPMI 1640

## 2.1.7. Zelllinien

In Tabelle 3 sind alle verwendeten Zelllinien aufgeführt. Die H1299-Zellen unterteilen sich in zwei Sätze einander entsprechender Klone mit stabiler Expression von exogenem KRAS(G12C), KRAS(G12D), KRAS(G12V) oder Wildtyp-KRAS. Die H2888-Zellen unterteilten sich in jeweils einen Klon mit stabiler Expression von exogenem KRAS(G12C), KRAS(G12V) oder Wildtyp-KRAS. Alle Klone wurden unabhängig voneinander kultiviert und untersucht.

Zolllinia	Klono	Bosebroibung
Zemme	KIONE	beschleibung
NCI-H1299	KRAS(G12C)cl2,	NSCLC-Zellen, Austausch einer
	KRAS(G12D)cl2,	Aminosäure im Codon 12
	KRAS(G12V)cl9,	
	KRAS(wt)cl4	
	KRAS(G12C)cl4,	
	KRAS(G12D)cl3,	
	KRAS(G12V)cl22,	
	KRAS(wt)cl11	
H2888	KRAS(G12C)cl1,	NSCLC-Zellen, Austausch einer
	KRAS(G12V)cl1,	Aminosäure im Codon 12
	KRAS(wt)cl4	
		1

### Tabelle 3: Verwendete Zelllinien

## 2.1.8. Plasmide

Alle verwendeten Plasmide sind in Tabelle 4 aufgeführt.

### Tabelle 4: verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
5'EGFP/HR-EGFP	Plasmidsubstrat zur	Akyüz et al. 2002
	Detektion der	
	nichtkonservativen Form	
	der HDR (SSA)	
EJ-EGFP	Plasmidsubstrat zur	Akyüz et al. 2002
	Detektion der MMEJ	
EJ5SceGFP	Plasmidsubstrat zur	Bennardo et al. 2009
	Detektion von NHEJ	
HR-EGFP/5'EGFP	Plasmidsubstrat zur	Akyüz et al. 2002
	Detektion der HR	

pCMV-I-Scel	Vektor zur Expression der	Dr. Maria Jasin, Cornell
	Meganuklease I-Scel unter	Universität, New York,
	der Kontrolle des CMV-	NY, USA, Rouet et al.
	Promotors	1994
p5bPuroCMV-wtEGFP	Positivkontrolle zur	Akyüz et al., 2002
	Ermittlung der	
	Transfektionseffizienz,	
	wtEGFP-Expression unter	
	der Kontrolle eines CMV-	
	Promotors	

# 2.1.9. Antikörper

Alle verwendeten primären Antikörper sind mit Hersteller und Bezeichnung in Tabelle 5 aufgelistet. Alle verwendeten sekundären Antikörper sind mit ihrem Hersteller in Tabelle 6 aufgelistet.

# Tabelle 5: Primäre Antikörper

Name	Beschreibung	Hersteller		
Anti-53BP1	Polyklonales	Novus Biologicals,		
	Kaninchen-Serum	LLC, Littleton, CO,		
		USA		
Anti-yH2AX	Monoklonaler Maus-	Merck Millipore,		
	Antikörper, IgG	Darmstadt,		
		Deutschland		
Anti-Aktin	Monoklonaler Ziegen-	Santa Cruz		
	Antikörper, IgG	Biotechnology, Inc.,		
		Santa Cruz, CA, USA		
Anti-BACH1	Polyklonales	Sigma-Aldrich,		
	Kaninchen-Serum	Steinheim,		
		Deutschland		
Anti-BRCA1	Monoklonaler Maus-	Calbiochem,		
	Antikörper, IgG1k	Darmstadt,		
		Deutschland		

Anti-BRCA2	Monoklonaler Maus-	Calbiochem,		
	Antikörper	Darmstadt,		
		Deutschland		
Anti-ERCC1	Monoklonaler Maus-	BD Pharmingen,		
	Antikörper, IgG2b	Heidelberg,		
		Deutschland		
Anti-FANCD2	Polyklonales	Abcam, Cambridge,		
	Kaninchen-Serum	USA		
Anti-MLH1	Monoklonaler Maus-	BD Pharmingen,		
	Antikörper, IgG1	Heidelberg,		
		Deutschland		
Anti-PCNA	Maus-Antikörper	Abcam, Cambridge		
		USA		
Anti-Rad51	Polyklonales	Neomarkers, Fremont,		
	Kaninchen-Serum	USA		
Anti-Rad52	Monoklonaler Maus-	Santa Cruz		
	Antikörper	Biotechnology Inc.,		
		Santa Cruz, CA, USA		
Anti-RPA	Maus-Antikörper	Calbiochem,		
		Darmstadt,		
		Deutschland		
Anti-Tubulin	Monoklonaler Maus-	Abcam, Cambridge,		
	Antikörper	USA		

# Tabelle 6: Sekundäre Antikörper

Name	Hersteller
Alexa FluorR 555 anti-mouse	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Alexa FluorR 488 anti-rabbit	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Esel anti-Ziege horseradish	Jackson Immuno Research, Suffolk,
peroxidase (HRP)-markiert	UK

# 2.2. Methoden

# 2.2.1. Adhärente Zellen einfrieren und auftauen

Die Zellen wurden von der Platte abtrypsiniert und in Medium suspendiert. Die Zellsuspension wurde durch Zentrifugation bei 300 x g pelletiert und in 4ml einer Einfrierlösung resuspendiert. Jeweils 2ml wurden in ein Einfrierröhrchen überführt und durch Einbringen in eine mit Isopropanol gefüllte Einfrierhilfe schrittweise auf - 80°C herabgekühlt. Nach 24h konnten die Einfrierröhrchen aus der Einfrierhilfe entfernt und direkt bei -80°C gelagert werden.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Röhrchen kurz im Wasserbad angewärmt. Danach wurden die Zellen sofort mit wenigen Millilitern RPMI 1640-Medium auf- und abpipettiert bis sie vollständig gelöst waren. Zuletzt wurde die Zellsuspension auf 15cm durchmessende Schalen mit 15ml frischem RPMI 1640-Medium aufgebracht und bei 37°C, 5% CO2, 95% Luftatmosphäre, 90% relative Luftfeuchtigkeit inkubiert.

# 2.2.2. Zellkultur adhärenter Zellen

Alle Zellen der Zelllinien H1299 und H2888 wurden mit dem gleichen Kulturmedium (siehe 2.1.6.) und unter gleichen Bedingungen (Arbeiten an der Sterilbank, Verwendung steriler Einmalpipetten und steriler Gefäße) kultiviert. Sie wurden bei 37°C im Zellinkubator (95% Luftatmosphäre, 5% CO2, 90% relative Luftfeuchtigkeit) inkubiert.

Subkonfluent bewachsene Petrischalen wurden nach Abnahme des alten Mediums zunächst mit kaltem PBS gewaschen. Zur Ablösung der Zellen wurden die Platten mit 4ml Trypsin beschichtet und bei 37°C im Inkubator für höchstens 15min inkubiert. Durch Beklopfen der Platten wurde die Ablösung der Zellen noch weiter gefördert. Das Trypsin wurde mit Kulturmedium geblockt und die entstandene Zellsuspension entsprechend des Wachstumsverhaltens der Zellen auf neue Schalen verteilt (H1299 1:10/1:20, H2888 1:2/1:4). 2.2.3. MTT-Assay zur Bestimmung der Zellviabilität unter der Behandlung mit Cisplatin und PARP-Inhibitoren

## 2.2.3.1. Cisplatin

Es wurden 2,5 x 10<sup>4</sup> Zellen/Loch der Zelllinie H1299 beziehungsweise 3 x 10<sup>4</sup> Zellen/Loch der Zelllinie H2888 auf 96-Well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden für 2h mit Cisplatin (Universität Ulm, Deutschland) in steigenden Konzentrationen von 1µM bis 512µM (H1299) und von 4µM bis 2048µM (H2888) behandelt und danach in frischem Medium reinkubiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen kultiviert. Nach 48h beziehungsweise nach 72h wurden die Zellen mit MTT-Lösung (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromid, Sigma; 5mg/ml in RPMI 1640) gefärbt und bei 37°C inkubiert. Nach 2,5h wurde die MTT-Lösung abgenommen und zu jedem Loch 200µl einer HCI-Isopropanol-Lösung (Verhältnis 1:9) hinzugefügt. Nach 10 minütiger Oszillation, wurde die optische Dichte jeder Probe bei einer Wellenlänge von 570nm anhand von Spektralphotometrie bestimmt. Die Wachstumskurven wurden daraufhin graphisch dargestellt, die unbehandelten Zellen als Kontrolle verwendet und deren Werte mit 100% gleichgesetzt

### 2.2.3.2. PARP-Inhibitoren

Es wurden 5 x 10<sup>3</sup> Zellen/Loch der Zelllinie H1299 auf 96-Well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden nach 48h mit IQD (1,5-Isoquinolinediol, Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) oder Nu1025 (Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland), jeweils in DMSO (Dimethylsulfoxid, Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöst in aufsteigender Konzentration von 10µM bis 200µM (IQD) und 3,5nM bis 2µM (Nu1025) behandelt. Als Kontrolle wurde ein Teil der Zellen mit DMSO behandelt. Dies wurde nach 72h wiederholt. Nach weiteren 72h wurden die Zellen, wie oben ausgeführt, gefärbt und ausgewertet. Die Wachstumskurven wurden graphisch dargestellt, die DMSObehandelten Zellen als Kontrolle verwendet und deren Werte mit 100% gleichgesetzt.

# 2.2.4. Fluoreszenzbasiertes Testsystem zur Analyse der DSB-Reparatur in der Durchflusszytometrie

Um menschliche Zellen auf Unterschiede in den verschiedenen Mechanismen der DSB-Reparatur zu überprüfen, wurde das von Frau Prof. Wiesmüller entwickelte fluoreszenzbasierte Testsystem verwendet (Akyüz et al. 2002). Dieses beruht auf der Transfektion der Zellen mit einem Plasmid kodierend für die Meganuklease I-Scel, sowie spezifischen DSB Reparatursubstraten. Innerhalb dieser Substrate liegen inaktive Genvarianten kodierend für enhanced green fluorescent protein (EGFP), die sogenannten Akzeptor- und Donor-Gene, in Serie vor und werden durch einen Platzhalter (Spacer) getrennt. Dieser Spacer ist entweder eine Hygromycin-Resistenzkassette oder eine RFP(red fluorescent protein)-Expressions-Kassette. Dem Akzeptor-Gen geht eine CMV-Promotorregion voraus und es enthält eine Erkennungssequenz für die Meganuklease I-Scel, die wiederum den DSB gezielt induziert (Plessing et al., 1992). Durch Insertion der Erkennungssequenz für I-Scel sind die für die Chromophorregion des EGFP kodierenden Aminosäuren nicht funktionsfähig. Wird nun der induzierte DSB durch Transfer der fehlenden Sequenz aus dem Donor-Gen repariert, kann EGFP exprimiert und grünes Protein synthetisiert werden. Die Zellen zeigen eine Grünfluoreszenz, die in der Durchflusszytometrie gemessen werden kann. Durch verschiedene Kombinationen aus Akzeptor- und Donor-Genen können die verschiedenen Reparaturwege HR, SSA, NHEJ und MMEJ spezifisch getestet werden.

### 2.2.4.1. Transfektion mittels FuGENE HD

Hierfür wurden 1x10<sup>5</sup> Zellen/Loch auf einer 6-Well-Platte ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mittels FuGENE HD mit einem, dem zu testenden Reparaturweg entsprechenden, Plasmid transfiziert (HR: HR-EGFP/5'EGFP, SSA: 5'EGFP/HR-EGFP, NHEJ: EJ5SceGFP, MMEJ: EJ-EGFP) und für 48h bei 37° reinkubiert. Für die Durchflusszytometrie (FACSCalibur <sup>™</sup> oder FACSCalibur<sup>™</sup> HTS) wurden die Zellen bei 300 x g für 5min zentrifugiert und das entstandene Pellet mit 200µl PBS/0,2% EDTA resuspendiert.

Die Durchflusszytometrie beruht auf der optischen Messung in Suspension befindlicher Zellen. Hierfür wird die Lösung in eine Kapillare gesogen, die Zellen treffen dadurch einzeln auf einen Laserstrahl einer bestimmten Fluoreszenz

33

anregenden Wellenlänge (Argon-Laser, 488nm). Grüne Fluoreszenz emittierende Zellen werden unter der Gesamtzahl aller lebenden Zellen bestimmt. Die Ablenkung und Streuung des weißen Lichts an der Zelle kann vom Zytometer ebenfalls erfasst, anschließend von einem Computer quantifiziert und daraus im Forward Scatter (FSC) und Side Scatter (SSC) die Population der lebenden Zellen mit geringer Streuung für die Fluoreszenzanalyse eingegrenzt werden.

2.2.4.2. Ermittlung der individuellen Transfektionseffizienz (%)

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz (%) wurde ein Teil der Zellen direkt mit dem Plasmid p5bPuroCMV-wtEGFP transfiziert. Dieses unterstützt EGFP-Expression unabhängig von der DNA-Reparatur und kann somit als Kontrolle für den Transfektionserfolg verwendet werden. In der Durchflusszytometrie mittels FACSCalibur <sup>™</sup> oder FACSCalibur<sup>™</sup> HTS konnte daraufhin die individuelle Transfektionseffizienz (%) anhand des Anteils an grün fluoreszierenden Zellen im Vergleich zur gesamten lebenden Zellzahl bestimmt werden.

Dadurch konnte nun die DSB-Reparaturfrequenz (%) mit Hilfe der folgenden Formel ausgewertet werden:

# 2.2.5. Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Bildung nukleärer Foci unter der Behandlung mit Cisplatin

Wenn Proteine vermehrt an die DNA gebunden werden, entsteht ein durch Färbung darstellbares Korrelat: ein Focus. Um festzustellen, ob in den Mutanten-KRAS exprimierenden Klonen KRAS(G12C)cl2, KRAS(G12D)cl2, KRAS(G12V)cl9 und dem Wildtyp-KRAS exprimierenden Klon KRAS(wt)cl4 unter Cisplatinbehandlung bestimmte Proteine der DNA Reparatur stärker oder schwächer aktiviert werden, und um die zeitliche Dynamik der Foci-Entstehung beurteilen zu können, wurden fluoreszenzmikroskopische Analysen zu den Zeitpunkten 6h, 16h, 24h und 48h nach Behandlungsende durchgeführt. Als Kontrolle wurden nicht behandelte Zellen verwendet.

Die Zellen wurden auf Objektgläschen ausgesät, für 1h mit 60µM Cisplatin behandelt, danach in frischem Medium reinkubiert und zu den angegebenen

Zeitpunkten mit Präextraktionspuffer für 2min behandelt und mit Formaldehyd 37% in kaltem PBS fixiert. Nach der Permeabilisierung der Zellen mit Triton 0,5%, kaltem PBS und Ziegenserum 5%, wurde der primäre Antikörper aufgetragen (Verdünnungen: anti-53BP1 1:1000, anti-RPA 1:200, anti-FANCD2 1:1000, anti-BRCA1 1:100, anti-Rad51 1:500, anti-γH2AX 1:1000). Nach 1h Inkubation bei 37°C wurde der zweite fluoreszierende Antikörper (Verdünnungen: anti-Kaninchen 1:2000, anti-Maus 1:2000) aufgetragen. Nach 45min Inkubation bei 37°C und waschen mit Triton 0,1% in PBS, konnten die Zellen mit Vectashield gefärbt und auf einem Objektträger mit Nagellack eingebettet werden. Mikroskopiert wurde mit dem Olympus BX51, die Auswertung erfolgte mit dem Programm Cell^F 2.5.

# 2.2.6. Analyse der zellulären Proteinlevels anhand der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

## 2.2.6.1. Präparation von Zelllysaten

Die Zellen wurden in 15cm durchmessenden Petrischalen ausgesät, nach 24h für 1h mit 60µM Cisplatin behandelt und für weitere 24h in frischem Medium reinkubiert. Danach wurden die Zellen bei 300 x g für 5min zentrifugiert, das entstandene Pellet mit 5ml Lysepuffer (siehe 2.1.5.) resuspendiert und für 30min auf Eis gelagert. Nach einer zweiten Zentrifugation bei 2400 x g und 0°C für 5 min wurde der Überstand abgenommen und bei -20°C eingefroren.

### 2.2.6.2. Proteinquantifizierung

Die Proteinkonzentration in den Zelllysaten wurde mit dem BCA Protein Assay Kit gemäß den Angaben des Herstellers bestimmt. Hierzu wurde eine 96-Well-Platte mit den BSA-Verdünnungen für die Kalibriergerade sowie je zwei Löchern pro Probe vorbereitet. Nach 20-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Proteinmenge photometrisch (570nm) ausgemessen.

2.2.6.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli 1970)

Die Proteine wurden mit Hilfe der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Hierfür wurden verschiedene Gele entsprechend der Größe der zu untersuchenden Proteine hergestellt, Pipettierschema siehe Tabelle 7. Das Gel wurde daraufhin in eine Gellaufkammer eingespannt (Mighty Small II oder SE250), hinter das Gel und in die gesamte Gellaufkammer wurde 1x Rotiphorese SDS-Page Puffer (Roth, Karlsruhe) gefüllt. Der 10-Taschenkamm wurde vorsichtig entfernt. Zur Standardisierung des Molekulargewichts wurden 10µl eines vorgefertigten Proteingemisches (Gene Ruler™ DNA Ladder-Mix oder Page Ruler™ Pre-Stained Protein Ladder) in die erste Tasche eingebracht. Die vorbereiteten Proben wurden in SDS-Probenpuffer, um die Proteine auf der Oberfläche vollständig negativ zu laden, für 5min auf 95°C erhitzt und daraufhin in die restlichen Geltaschen pipettiert. Nun erfolgte die Auftrennung der denaturierten Proteine im elektrischen Feld bei 25mA pro Gel.

Proteingröße	60-200 kDa Trenngel 8%ig	16-70 kDa Trenngel 10%ig	16-70 kDa Trenngel 12%ig	12-45 kDa Trenngel 15%ig	Sammelgel
Acrylamid 30%,					
0,8% Bisacrylamid	12 ml	15 ml	18 ml	22,5ml	3,9ml
4 x SDS/Tris pH 8,8	11,25ml	11,25ml	11,25ml	11,25ml	
4x SDS/Tris pH 6,8	-	-	-	-	7,5ml
Destilliertes Wasser	21,75ml	18,75ml	15,75ml	11,25ml	18,3ml
10% APS	150µl	150µl	150µl	150µl	150µl
TEMED	30µl	30µl	30µl	30µl	30µl

Tabelle 7: Pipettierschema für fünf verschiedene SDS-PAGE-Gele.

2.2.6.4. Elektrophoretischer Transfer der Proteine auf eine Membran (Towbin et al. 1979)

Nach der Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mittels Nassblot Apparatur auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Membran wurde hierzu mit Methanol 100% aktiviert und anschließend für 5min in 1x HMW-Puffer kalibriert. Je nach Größe der zu untersuchenden Proteine wurde die Membran unter Eiskühlung unterschiedlich lang geblottet. Für Proteine von 20-70 kDa 90min und von 70-100kDa für 120min bei 90V, für Proteine größer 100kDa über Nacht (16h) bei 50V. Um zu überprüfen, ob der Transfer erfolgreich war, wurde jede Membran mit Ponceau S Lösung angefärbt.

### 2.2.6.5. Immundetektion der Proteine auf dem Western Blot

Um die transferierten Proteine auf der Membran nachweisen zu können, wird eine Antigen-Antikörper-Reaktion genutzt. Zunächst wird ein spezifischer primärer Antikörper an das zu untersuchende Protein und daraufhin ein sekundärer Antikörper an den F<sub>c</sub>-Teil des primären Antikörpers gebunden. Das so entstandene Antikörperkonjugat kann über ein Reporterenzym (Meerrettich-Peroxidase) detektiert werden.

Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde die Membran zuerst mit 5% Milchpulver für 60-90min bei RT geblockt. Nach drei 5-minütigen Waschschritten mit 1x TBS T-Puffer (TBS enthält 0,1% Tween) wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem in 1x PBS T-Puffer (siehe 2.1.5.) gelösten primären Antikörper inkubiert. Nach weiteren Waschschritten mit TBS T-Puffer konnte die Membran für 45min bei RT mit dem sekundären Antikörper inkubiert werden. Die Detektion erfolgte mit dem Bio-Rad ChemiDoc™ MP nach dem Prinzip der ECL. Hierfür wurde die Membran etwa 5min mit jeweils 1000µl der Chemolumineszenzenzymsubstrate gespült.

Um eine Membran für die Detektion mehrerer Proteine verwenden zu können, musste die bereits entstandene Antikörperbindung wieder aufgelöst werden. Hierfür wurde die Membran nach einem 5-minütigen Waschschritt mit TBS T für 15min in Restore<sup>™</sup> Western Blot Stripping Buffer geschwenkt. Nach fünf weiteren Waschschritten mit TBS T wurde die Membran für 30min mit 5% Milchpulver bei RT geblockt und konnte daraufhin erneut mit einem primären Antikörper inkubiert werden.

### 2.2.7. Statistische Auswertung

Zur graphischen Darstellung der Wachstumskurven wurde das Programm GraphPad Prism 5.01 (Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, USA) verwendet. Die statistische Signifikanz der Wachstumskurven wurde mit Hilfe des F-Tests bestimmt, indem IC50-Werte miteinander verglichen wurden. Die statistische Signifikanz von Unterschieden in den Rekombinations- beziehungsweise Immunfluoreszenzdaten wurde anhand des zweiseitigen Wilcoxon Vorzeichen-Rang-Tests ermittelt. Das Signifikanzniveau wurde bei  $\alpha = 0,05$  festgelegt.

37

# 3 Ergebnisse

Ziel meiner Doktorarbeit war es, drei unterschiedliche Mutationen in einem *KRAS*-Transgen nach Expression in den NSCLC-Zelllinien H1299 und H2888 hinsichtlich möglicher Resistenzentwicklung gegen Cisplatin zu charakterisieren und jeweils mit dem Wildtyp *KRAS*-Transgen zu vergleichen. Außerdem sollten verschiedene Möglichkeiten der Resistenzentstehung untersucht werden. Alle mutierten *KRAS*-Transgene wiesen eine Austauschmutation am Codon 12 auf. Für die Zelllinie H1299 existierten jeweils voneinander unabhängige Klone, welche in zwei Klon-Sätzen kultiviert und untersucht wurden. Im Folgenden werden die KRAS(G12C)cl2, KRAS(G12V)cl9, KRAS(G12D)cl2 und KRAS(wt)cl4 exprimierenden H1299-Klone dem ersten Satz zugeordnet (H1299.1) (Garassino et al. 2011, Caiola et al. 2015), die KRAS(G12C)cl4, KRAS(G12D)cl3, KRAS(G12V)cl22 und KRAS(wt)cl11 exprimierenden H1299-Klone dem zweiten Satz (H1299.2) (Caiola et al. 2015). Es standen demnach in jedem Klonsatz H1299-Zellen mit stabil exprimiertem, endogenem KRAS(G12C), KRAS(G12D), KRAS(G12D), KRAS(G12V) und Wildtyp-KRAS zur Verfügung.

# 3.1. Untersuchungen zur Viabilität der Mutanten-KRAS exprimierenden Klonsätze der Zelllinien H1299 und H2888 unter Cisplatinbehandlung mit Hilfe des MTT-Assays

Mit dem MTT-Assay wurde das Zellüberleben der Mutanten- und Wildtyp-KRAS exprimierenden Lungenkarzinomzellen unter der Behandlung mit ansteigenden Konzentrationen von Cisplatin, welches als Goldstandard in der Chemotherapie der NSCLCs gilt (Goeckenjan et al. 2010), getestet. Anhand der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC50), das heißt der Konzentration, bei der nur noch 50% der Zellen metabolische Aktivität gemäß MTT-Assay zeigen und demnach noch am Leben sind, sollte beurteilt werden, ob die jeweilige KRAS-Variante in den Zellen zur Resistenz gegen dieses Medikament führt.

Die Zellen aus dem Klonsatz H1299.1 wurden 48h mit Cisplatin behandelt, die Zellen aus dem Klonsatz H1299.2 und der Zelllinie H2888 wurden 2h mit Cisplatin behandelt und danach 48h oder 72h in frischem Medium reinkubiert. Variationen im Protokoll wurden aufgrund der Optimierungsstudien im Ulmer wie auch dem

38

kollaborierenden Labor von Massimo Broggini, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, in Mailand eingeführt. Zur Analyse der Zellviabilität wurden die Zellen daraufhin mit MTT-Lösung gefärbt und photometrisch beurteilt.

# 3.1.1. Viabilität der Zellen des Klonsatzes H1299.1

Unter der Behandlung mit Cisplatin zeigten KRAS(G12C)cl2 (IC50 22  $\mu$ M, p-Wert 0,0023) und KRAS(G12V)cl9 (IC50 19  $\mu$ M, p-Wert 0,0059) eine signifikant höhere Zellviabilität als KRAS(wt)cl4 (IC50 10  $\mu$ M). KRAS(G12D)cl2 (IC50 28  $\mu$ M, p-Wert < 0,0001) zeigte eine hoch signifikant größere IC50 als der Wildtyp (siehe Abb. 8).



### Abbildung 8: Viabilität der Zellen des Klonsatzes H1299.1 nach 48h Cisplatinbehandlung.

Die Zellen wurden 48h lang mit den angezeigten Dosen behandelt. Die Zellen wurden mit MTT-Lösung gefärbt und die Zellviabilität photometrisch ermittelt. DMSO wurde als Kontrolle verwendet und mit 100% gleichgesetzt. Das Experiment wurde dreimal wiederholt, die Rohdaten aus der Spektralphotometrie in GraphPad Prism 5.01 eingefügt und dadurch die IC50- und die p-Werte berechnet.

## 3.1.2. Viabilität der Zellen der Klonsätze H1299.2 und H2888

KRAS(G12D)cl3 zeigte sowohl nach 48h (IC50 284  $\mu$ M, p-Wert <0,0001) als auch nach 72h (159  $\mu$ M, p-Wert <0,0001) ein hoch signifikant größeres Zellüberleben als KRAS(wt)cl11 (IC50 48  $\mu$ M bzw. 22  $\mu$ M). KRAS(G12C)cl4 (IC50 48  $\mu$ M, p-Wert 0,9897 bzw. 56  $\mu$ M, p-Wert 0,0132) zeigte erst nach 72h ein signifikantes Resistenzverhalten im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abb.9 und 10A). KRAS(G12V)cl22 (IC50 30 μM, p-Wert 0,2192 bzw. 25 μM, p-Wert 0,5877) bewegte sich zu beiden Zeitpunkten in ähnlichen Bereichen wie KRAS(wt)cl11.

Von der Zelllinie H2888 abgeleitete KRAS-Mutanten-Protein exprimierende Zellen offenbarten in unseren Experimenten ein abweichendes Verhalten im Vergleich zu den Klonen der Klonsätze H1299.1 und H1299.2. Nach 72h sahen wir einen signifikanten Unterschied nur zwischen KRAS(G12V)cl1 (IC50 7  $\mu$ M, p-Wert 0,0059) und KRAS(wt)cl4 (IC50 3  $\mu$ M) (siehe Abb. 10B).



Abbildung 9: Viabilität der Zellen des Klonsatzes H1299.2 nach 48h Cisplatinbehandlung.

Die Zellen wurden 2h lang mit den angezeigten Dosen behandelt und daraufhin 48h lang in frischem Medium reinkubiert. Die Zellen wurden mit MTT-Lösung gefärbt und die Zellviabilität photometrisch ermittelt. DMSO wurde als Kontrolle verwendet und mit 100% gleichgesetzt. Die IC50 Werte wurden aus drei unabhängigen Experimenten berechnet. Jedes Experiment wurde dreimal durchgeführt, die Rohdaten aus der Spektralphotometrie wurden in GraphPad Prism 5.01 eingefügt und dadurch die IC50- und die p-Werte berechnet.



Die Zellen wurden 2h lang mit den angezeigten Dosen behandelt und daraufhin 72h lang in frischem Medium reinkubiert. Die Zellen wurden mit MTT-Lösung gefärbt und die Zellviabilität photometrisch ermittelt. DMSO wurde als Kontrolle verwendet und mit 100% gleichgesetzt. Die IC50 Werte wurden aus drei unabhängigen Experimenten berechnet. Jedes Experiment wurde dreimal durchgeführt, die Rohdaten aus der Spektralphotometrie wurden in GraphPad Prism 5.01 eingefügt und dadurch die IC50- und die p-Werte berechnet.

# 3.2. Untersuchungen zur Viabilität der Mutanten-KRAS exprimierenden Klonsätze der Zelllinie H1299 unter Behandlung mit den PARP-Inhibitoren IQD und Nu1025 mit Hilfe des MTT-Assay

Nachdem die Experimente mit Cisplatin eine signifikante Resistenz der Klone KRAS(G12C)cl2, KRAS(G12V)cl9 (H1299.1), KRAS(G12D)cl2, KRAS(G12C)cl4, KRAS(G12D)cl3 (H1299.2) und KRAS(G12V)cl1 (H2888) im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp gezeigt hatten, sollten nun auch Medikamente aus der Gruppe der Poly-(ADP-ribose)-Polymerase-Inhibitoren in die Arbeit miteinbezogen werden.

Die Poly-(ADP-ribose)-Polymerasen (PARPs) PARP1 und PARP2 gehören zu den DNA-Schadens abhängigen PARPs (Schreiber et al. 2006). Sie fungieren als Sensor für DNA-Brüche und können so sowohl die Einzelstrangbruchreparatur sowie vermutlich auch den DSB-Reparaturweg MMEJ positiv beeinflussen. Durch PARP-Inhibitoren sollen diese Reparaturwege unterbunden werden, die Zelle müsste dann auf Alternativen wie die sehr genaue HR oder das ungenaue cNHEJ zurückgreifen. Zellen, die Defekte z.B. in der HR aufweisen, hätten so keine Möglichkeit mehr, DNA Schäden fehlerfrei zu reparieren und würden zu Grunde gehen (Davar et al., 2012).

Die Zellen der Klonsätze H1299.1 und H1299.2 wurden über sechs Tage hinweg mit den PARP-Inhibitoren 1,5-Isoquinolinediol (IQD) und Nu1025 behandelt und danach mit MTT-Lösung gefärbt. Das Zellüberleben wurde photometrisch ausgelesen.

# 3.2.1. Behandlung der Zellen aus den Klonsätzen H1299.1 und H1299.2 mit dem PARP-Inhibitor IQD

In Abbildung 11 ist zu sehen, dass die H1299.1-Klone KRAS(G12C)cl2 (IC50 62  $\mu$ M, p-Wert 0,506), KRAS(G12V)cl9 (IC50 46  $\mu$ M, p-Wert 0,4778) und KRAS(G12D)cl2 (IC50 48  $\mu$ M, p-Wert 0,62) keinen signifikanten Unterschied zu KRAS(wt)cl4 (IC50 53  $\mu$ M) bezüglich des Überlebens nach Behandlung mit IQD zeigten.

42



Abbildung 11: Sensibilität der Zellen des Klonsatzes H1299.1 auf den PARP-Inhibitor 1,5-Isoquinolinediol (IQD).

Die Zellen wurden 6 Tage lang mit den angezeigten Dosen behandelt. Die Zellen wurden daraufhin mit MTT-Lösung gefärbt und die Zellviabilität photometrisch ermittelt. DMSO wurde als Kontrolle verwendet und mit 100% gleichgesetzt. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt, die Rohdaten aus der Spektralphotometrie in GraphPad Prism 5.01 eingefügt und dadurch die IC50- und p-Werte berechnet.

Die H1299.2-Klone KRAS(G12C)cl4 (IC50 57  $\mu$ M, p-Wert 0,5419) und KRAS(G12D)cl3 (IC50 121  $\mu$ M, p-Wert 0,1104) verhielten sich wieder ähnlich wie KRAS(wt)cl11 (IC50 70  $\mu$ M), bei den Zellen des Klons KRAS(G12V)cl22 (IC50 40,02  $\mu$ M, p-Wert 0,0096) überlebten signifikant weniger Zellen (siehe Abb. 12).



# Abbildung 12: Sensibilität der Zellen des Klonsatzes H1299.2 auf den PARP-Inhibitor 1,5-Isoquinolinediol (IQD).

Die Zellen wurden 6 Tage lang mit den angezeigten Dosen behandelt. Die Zellen wurden daraufhin mit MTT-Lösung gefärbt und die Zellviabilität photometrisch ermittelt. DMSO wurde als Kontrolle verwendet und mit 100% gleichgesetzt. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt, die Rohdaten aus der Spektralphotometrie in GraphPad Prism 5.01 eingefügt und dadurch die IC50- und p-Werte berechnet.

# 3.2.2. Behandlung der Zellen aus den Klonsätzen H1299.1 und H1299.2 mit dem PARP-Inhibitor Nu1025

Die H1299.1-Klone KRAS(G12V)cl9 (IC50 472  $\mu$ M, p-Wert 0,0001) und KRAS(G12D)cl2 (IC50 524  $\mu$ M, p-Wert 0,0012) zeigten ein stark signifikant niedrigeres Zellüberleben im Vergleich zu KRAS(wt)cl4 (IC50 987  $\mu$ M) nach Behandlung mit Nu1025. Die IC50 für den Klon KRAS(G12C)cl2 (IC50 684  $\mu$ M, p-Wert 0,1388) war nicht signifikant verringert (siehe Abb. 13).



Die Zellen wurden 6 Tage lang mit den angezeigten Dosen behandelt. Die Zellen wurden daraufhin mit MTT-Lösung gefärbt und die Zellviabilität photometrisch ermittelt. DMSO wurde als Kontrolle verwendet und mit 100% gleichgesetzt. Jedes Experiment wurde dreimal durchgeführt, die Rohdaten aus der Spektralphotometrie wurden in GraphPad Prism 5.01 eingefügt und dadurch die IC50- und p-Werte berechnet.

Auch die H1299.2-Klone zeigten kein Resistenzverhalten gegenüber Nu1025. KRAS(G12V)cl22 (IC50 992  $\mu$ M, p-Wert 0,2348) und KRAS(G12D)cl3 (IC50 910  $\mu$ M, p-Wert 0,4569) überlebten ähnlich KRAS(wt)cl11 (IC50 826  $\mu$ M), die Zellviabilität des Klons KRAS(G12C)cl4 (IC50 625  $\mu$ M, p-Wert 0,0343) war signifikant reduziert (siehe Abb. 14).

Nach dem überwiegenden Resistenzverhalten der Mutanten-KRAS im Vergleich zu Wiltyp-KRAS exprimierenden Klonen gegenüber Cisplatin, zeigten die Mutanten-KRAS exprimierenden Klone gegenüber PARP-Inhibitoren keine Änderung des Zellüberlebens beziehungsweise sogar eine erhöhte Empfindlichkeit.



# 3.3. Überprüfung verschiedener DNA-Reparaturmechanismen als mögliche Ursache der Resistenzentstehung in den Mutanten-KRAS exprimierenden Klonsätzen der Zelllinie H1299

Als Ursache für die KRAS-Mutanten-Protein vermittelte Resistenz gegen Cisplatin, kamen verschiedene Möglichkeiten in Frage. Eine davon war die Hochregulierung der Aktivität einzelner DNA-Reparaturmechanismen. Anhand verschiedener Experimente sollte nun ermittelt werden, ob die DNA-Reparatur involviert ist und auf welche Weise eine *KRAS*-Mutation zur Resistenz gegen Cisplatin führen könnte.

## 3.3.1. Die Homologe Rekombination (HR)

Die Aktivität der HR als Ganzes, wurde anhand des fluoreszenzbasierten Testsystems überprüft. Die Rekombinationsfrequenzen (%) aller KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden Klone der Zelllinie H1299 wurden direkt mit der des jeweiligen Wildtyp-KRAS-Protein exprimierenden Klons verglichen. Wie in Abbildung 15A dargestellt, zeigten die drei KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden H1299.1-Klone KRAS(G12C)cl2, KRAS(G12V)cl9 und KRAS(G12D)cl2 eine signifikant niedrigere Reparaturfrequenz als KRAS(wt)cl4. In Abbildung 15B sieht man, dass auch die H1299.2-Klone KRAS(G12C)cl4 und KRAS(G12D)cl3 eine signifikant verringerte Rekombinationsfrequenz zeigten im Vergleich zum Wildtyp-KRAS exprimierenden Klon KRAS(wt)cl11, der Klon KRAS(G12V)cl22 dagegen eine signifikant erhöhte.



Abbildung 15: Überprüfung der HR-Aktivität als mögliche Ursachen für die Entstehung der Resistenz gegen Cisplatin in KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden Zellen der Zelllinie H1299 anhand der HR-DSB-Reparaturfrequenz.

Die Zellen wurden mittels Fugene HD mit dem HR-Substrat HR-EGFP/5'EGFP und pCMV-I-Scel für die Expression der Endonuklease I-Scel zur gezielten Spaltung des Substrates transfiziert und für 48h kultviert. Jede Quantifikation von grünen fluoreszierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie wurde mit Hilfe der individuell pro Kultur in Parallelansätzen ermittelten Transfektionseffizienz normalisiert um die DSB Reparaturfrequenz zu errechnen. In Abbildung A (H1299.1) und B (H1299.2) sind die Mittelwerte aus je sechs Messungen dargestellt, P<0,05. Die Werte für die Wildtyp-KRAS exprimierenden Zellen der Klone KRAS(wt)cl4 (A) und KRAS(wt)cl11 (B) wurden dabei mit 100% gleichgesetzt.

Zusätzlich wurden nun Eigenschaften einzelner Proteine, die in die HR involviert sind, als mögliche Marker evaluiert.

BRCA1 spielt eine Rolle für die Entfernung des DSBes durch Förderung der Resektion der DNA-Enden durch CtIP (Yun und Hiom 2009, Cruz-Garcìa et al. 2014). RAD51 vermittelt die Stranginvasion in homologe Anteile des

Schwesterchromatids (West 2003). Mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie sollte nun die Akkumulation sogenannter nukleärer Foci an DNA-Schadensstellen dieser beiden Proteine unter der Behandlung mit Cisplatin im zeitlichen Verlauf von 48h beurteilt werden. In Abbildung 16A und B wird deutlich, dass der KRAS-Mutanten-Protein exprimierende Klon KRAS(G12C)cl2 24h nach Behandlung eine geringere BRCA1-Foci-Bildung zeigte als der Wildtyp-KRAS exprimierende Klon KRAS(wt)cl4, sowie die anderen KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden Klone KRAS(G12V)cl9 und KRAS(G12D)cl2. Der KRAS-Mutanten-Protein exprimierende Klon KRAS(G12V)cl9 dagegen zeigte nach 16h eine signifikant stärkere BRCA1und RAD51-Foci-Bildung als der Wildtyp-KRAS exprimierende Klon KRAS(wt)cl4, sowie die anderen KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden Klone KRAS(G12C)cl2 und KRAS(G12D)cl2 (siehe Abb. 16A und 16C).



# Abbildung 16: Immunfluoreszenz-Analyse der Bildung nukleärer Foci nach Behandlung der Zellen des Klonsatzes H1299.1 mit Cisplatin.

Die Zellen wurden für 1h mit 60µM Cisplatin behandelt und dann in frischem Medium reinkubiert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert und mit BRCA1- und RAD51-Antikörpern immunmarkiert. Foci wurden durch automatische Quantifizierung ausgelesen und der Mittelwert der Foci pro Zelle in der gesamten Zellpopulation aus je zwei Objektträgern berechnet, wobei 100 Nuklei analysiert wurden. Abbildung A zeigt Ergebnisse aus zwei Experimenten, Abbildung C Ergebnisse aus einem Experiment. Abbildung B zeigt repräsentative Beispiele für die Focibildung nach 24h Cisplatinbehandlung in KRAS(G12C)cl2 und KRAS(wt)cl4 exprimierenden Zellen.

BACH1 interagiert mit BRCA1 und spielt daher eine wichtige Rolle für die HR (Cantor et al. 2001, Dohrn et al. 2012). Mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese und der Western-Blot-Analyse wurden die Proteinmengen von BACH1 und BRCA1 in mit Cisplatin behandelten und unbehandelten Zellen ermittelt. Wie in Abbildung 17A zu sehen, offenbarte der Klon KRAS(G12C)cl2 deutlich reduzierte BACH1-Mengen vor und nach Cisplatinbehandlung, was ebenfalls auf KRAS(G12D)cl2 vor Behandlung zutraf. In Abbildung 17B wird sichtbar, dass die KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden Klone KRAS(G12V)cl9 und KRAS(G12D)cl2 deutlich erhöhte BRCA1-Mengen vor Behandlung mit Cisplatin aufwiesen.



# Abbildung 17: Bestimmung der Proteinmengen von BACH1 und BRCA1 in Zellen des Klonsatzes H1299.1 als mögliche Ursache für die Entstehung der Resistenz gegen Cisplatin.

Western-Blot-Analyse der Klone KRAS(wt)cl4, KRAS(G12C)cl2, KRAS(G12D)cl2 und KRAS(G12V)cl9. Die Zellen wurden entweder mit 15µM Cisplatin behandelt oder das Medium wurde nur gewechselt. Nach Zellernte wurde eine SDS-PAGE und anschließend eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Es wurden spezifische Antikörper verwendet um BACH1, BRCA1 und Tubulin zu detektieren. Tubulin diente hierbei als Ladekontrolle, die Proteinmengen wurden anhand der Bandenintensität im Vergleich zu Tubulin quantifiziert. Abbildung A entspricht den Mittelwerten aus vier Messungen, Abbildung B den Mittelwerten aus zwei Messungen. Die Proteinmenge der unbehandelten Wildtyp-KRAS exprimierenden Zellen des Klons KRAS(wt)cl4 wurde jeweils mit 100% gleichgesetzt.

## 3.3.2. Das Single-strand annealing (SSA)

Auch hier wurde die Aktivität des gesamten Reparatur-Apparates mit Hilfe des fluoreszenzbasierten Testsystems überprüft. In Abbildung 18A wird sichtbar, dass die DSB-Reparaturfrequenz für alle KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden H1299.1-Klone KRAS(G12C)cl2, KRAS(G12D)cl2 und KRAS(G12V)cl9 signifikant

kleiner war als in Zellen des Wildtyp-KRAS exprimierenden H1299.1-Klons KRAS(wt)cl4. KRAS(G12V)cl9 und KRAS(G12C)cl2 zeigten zusätzlich eine signifikante Reduktion gegenüber KRAS(G12D)cl2. Der H1299.2-Klon KRAS(G12D)cl3 zeigte ebenfalls einen signifikant niedrigeren Wert als sein Wildtyp, für KRAS(G12C)cl4 konnte jedoch keine Signifikanz nachgewiesen werden und KRAS(G12V)cl22 offenbarte sogar eine signifikant höhere DSB-Reparaturfrequenz als KRAS(wt)cl11 (siehe Abb. 18B).



Abbildung 18: Überprüfung der SSA-Aktivität als mögliche Ursachen für die Entstehung der Resistenz gegen Cisplatin in KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden Zellen der Zelllinie H1299 anhand der SSA-DSB-Reparaturfrequenz.

Die Zellen wurden mittels Fugene HD mit dem SSA-Substrat 5'EGFP/HR-EGFP und pCMV-I-Scel für die Expression der Endonuklease I-Scel zur gezielten Spaltung des Substrates transfiziert und für 48h kultviert. Jede Quantifikation von grünen fluoreszierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie wurde mit Hilfe der individuell pro Kultur in Parallelansätzen ermittelten Transfektionseffizienz normalisiert um die DSB Reparaturfrequenz zu errechnen. In Abbildung A (H1299.1) und B (H1299.2) sind die Mittelwerte aus je sechs Messungen dargestellt, P<0,05. Die Werte für die Wildtyp-KRAS exprimierenden Zellen der Klone KRAS(wt)cl4 (A) und KRAS(wt)cl11 (B) wurden dabei mit 100% gleichgesetzt.

RAD52 könnte für das Annealing überhängender einzelsträngiger DNA am 3´-Ende (3´-ssDNA) verantwortlich sein, mit anschließender Entfernung der überhängenden DNA durch den XPF-ERCC1-Komplex (Ciccia und Elledge 2010). Aufgrund ihrer Bedeutung für das SSA (Motycka et al., 2004) wurden auch hier die Proteinmengen in Cisplatin behandelten mit denen in unbehandelten Zellen verglichen. Wie in Abbildung 19A zu sehen, konnte in unbehandelten KRAS(G12C)cl2-Zellen eine deutliche Reduktion des RAD52-Niveaus beobachtet werden, was sich als reproduzierbar herausstellte. Demgegenüber konnten für ERCC1 keine reproduzierbaren Unterschiede nachgewiesen werden (siehe Abb. 19B).



# Abbildung 19: Bestimmung der Proteinmengen von BACH1 und BRCA1 in Zellen des Klonsatzes H1299.1 als mögliche Ursachen für die Entstehung der Resistenz gegen Cisplatin.

Western-Blot-Analyse der Klone KRAS(wt)cl4, KRAS(G12C)cl2, KRAS(G12D)cl2 und KRAS(G12V)cl9. Die Zellen wurden entweder mit 15µM Cisplatin behandelt oder das Medium wurde nur gewechselt. Nach Zellernte wurde eine SDS-PAGE und anschließend eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Es wurden spezifische Antikörper verwendet um RAD52, ERCC1 und Tubulin zu detektieren. Tubulin diente hierbei als Ladekontrolle, die Proteinmengen wurden anhand der Bandenintensität im Vergleich zu Tubulin quantifiziert. Abbildung A entspricht den Mittelwerten aus drei Messungen, Abbildung B den Mittelwerten aus zwei Messungen. Die Proteinmenge der unbehandelten Wildtyp-KRAS exprimierenden Zellen des Klons KRAS(wt)cl4 wurde jeweils mit 100% glechgesetzt.

### 3.3.3. Das classic Non-homologous end joining (cNHEJ)

Die Aktivität des cNHEJ in den von der Zelllinie H1299 abgeleiteten Zellen wurde ebenfalls mittels Transfektion des NHEJ-Substrates und I-*Sce*I-Plasmides und anschließender Durchflusszytometrie untersucht. Die Klone KRAS(G12C)cl2, KRAS(G12V)cl9 und KRAS(G12D)cl2 wiesen eine signifikante Reduktion der DSB-Reparaturereignisse im Vergleich zu KRAS(wt)cl4 auf (siehe Abb. 20A). KRAS(G12C)cl4 und KRAS(G12D)cl3 (H1299.2) zeigten gleichsam eine signifikant verringerte cNHEJ-Frequenz, KRAS(G12V)cl22 jedoch eine im Vergleich zu KRAS(wt)cl11, KRAS(G12D)cl3 und KRAS(G12C)cl4 signifkant höhere Rekombinationsfrequenz (siehe Abb. 20B).



Abbildung 20: Überprüfung der cNHEJ-Aktivität als mögliche Ursachen für die Entstehung der Resistenz gegen Cisplatin in KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden Zellen der Zelllinie H1299 anhand der cNHEJ-DSB-Reparaturfrequenz.

Die Zellen wurden mittels Fugene HD mit dem cNHEJ-Substrat EJ5SceGFP und pCMV-I-Scel für die Expression der Endonuklease I-Scel zur gezielten Spaltung des Substrates transfiziert und für 48h kultviert. Jede Quantifikation von grünen fluoreszierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie wurde mit Hilfe der individuell pro Kultur in Parallelansätzen ermittelten Transfektionseffizienz normalisiert um die DSB Reparaturfrequenz zu errechnen. In Abbildung A (H1299.1) und B (H1299.2) sind die Mittelwerte aus je sechs Messungen dargestellt, P<0,05. Die Werte für die Wildtyp-KRAS exprimierenden Zellen der Klone KRAS(wt)cl4 (A) und KRAS(wt)cl11 (B) wurden dabei mit 100% gleichgesetzt.

Dem Protein 53BP1 wird zugeschrieben, dass es nach seiner Bindung an die DNA-Enden stabilisierende und vor allem mobilisierende Wirkung hat und so die Verbindung von DSBen mittels cNHEJ unterstützt (Dimitrova et al. 2008). Aus diesem Grund haben wir auch für 53BP1 eine fluoreszenzmikroskopische Analyse der 53BP1-Focibildung durchgeführt. In Abbildung 21A und B ist zu sehen, dass der H1299.1-Klon KRAS(G12C)cl2 signifikant niedrigere 53BP1 Focizahlen nach 6h, 16h, und 24h Behandlung mit Cisplatin aufweist. Außerdem wurden die 53BP1-Proteinmengen mit und ohne Cisplatineinfluss analysiert. KRAS-Mutanten-Protein exprimierende Zellen des Klons KRAS(G12C)cl2 zeigten unbehandelt eine reproduzierbare Reduktion des 53BP1-Niveaus im Vergleich zum Wildtyp-KRAS exprimierenden Klon KRAS(wt)cl4. Während Unterschiede nach Behandlung mit Cisplatin, sowie in den anderen KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden Klonen KRAS(G12V)cl9 und KRAS(G12D)cl2 nicht reproduzierbar waren (siehe Abb. 22A).

Zusätzlich wurde das für die Initiation des cNHEJ entscheidende Protein KU70 (Mahaney et al. 2009) auf Veränderungen in den KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden Klonen des Klonsatzes H1299.1 getestet. In Abbildung 22B wird sichtbar, dass das KU70-Proteinniveau in allen Klonen mit und ohne Cisplatinbehandlung ähnlich war.



# Abbildung 21: Immunfluoreszenz-Analyse der Bildung nukleärer Foci nach Behandlung der Zellen des Klonsatzes H1299.1 mit Cisplatin.

Die Zellen wurden für 1h mit 60µM Cisplatin behandelt und dann in frischem Medium reinkubiert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert und mit 53BP1-Antikörpern immunmarkiert. Foci wurden durch automatische Quantifizierung ausgelesen und der Mittelwert der Foci pro Zelle in der gesamten Zellpopulation aus jeweils zwei Objektträgern berechnet, wobei jeweils 100 Nuklei analysiert wurden. Abbildung A zeigt Ergebnisse aus zwei Experimenten. Abbildung B zeigt repräsentative Beispiele für die Focibildung nach 16h Cisplatinbehandlung in KRAS(G12C)cl2 und KRAS(wt)cl4 exprimierenden Zellen.



# Abbildung 22: Bestimmung der Proteinmengen von 53BP1 und KU70 in Zellen des Klonsatzes H1299.1 als mögliche Ursache für die Entstehung der Resistenz gegen Cisplatin.

Western-Blot-Analyse der Klone KRAS(wt)cl4, KRAS(G12C)cl2, KRAS(G12D)cl2 und KRAS(G12V)cl9. Die Zellen wurden entweder mit 15µM Cisplatin behandelt oder das Medium wurde nur gewechselt. Nach Zellernte wurde eine SDS-PAGE und anschließend eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Es wurden spezifische Antikörper verwendet um KU70 und Tubulin zu detektieren. Tubulin diente hierbei als Ladekontrolle, die Proteinmengen wurden anhand der Bandenintensität im Vergleich zu Tubulin quantifiziert. Abbildung A entspricht den Mittelwerten aus drei Messungen, Abbildung B den Mittelwerten aus zwei Messungen. Die Proteinmenge der unbehandelten Wildtyp-KRAS exprimierenden Zellen des Klons KRAS(wt)cl4 wurde jeweils mit 100% gleichgesetzt.

# 3.3.4. Das Micro-homology mediated end joining (MMEJ)

Zuletzt wurde die Frequenz des alternativen NHEJ-Reparaturweges MMEJ mittels Durchflusszytometrie beurteilt. Die drei Klone KRAS(G12C)cl2, KRAS(G12D)cl2 und KRAS(G12V)cl9 zeigten signifikant niedrigere DSB-Reparaturfrequenzen im Vergleich zu KRAS(wt)cl4 (siehe Abb. 23A). Für die Zellen des Klonsatzes H1299.2 wies nur der Klon KRAS(G12D)cl3 eine signifikante Reduktion der Frequenz im Vergleich zum Wildtyp-KRAS exprimierenden Klon KRAS(wt)cl11 auf. Der Klon KRAS(G12V)cl22 offenbarte mehr DSB-Reparatur-Ereignisse als KRAS(wt)cl11, für den Klon KRAS(G12C)cl4 waren keine Unterschiede zu KRAS(wt)cl11 nachweisbar (siehe Abb. 23B).



Abbildung 23: Überprüfung der MMEJ-Aktivität als mögliche Ursache für die Entstehung der Resistenz gegen Cisplatin in KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden Zellen der Zelllinie H1299 anhand der MMEJ-DSB-Reparaturfrequenz.

Die Zellen wurden mittels Fugene HD mit dem MMEJ-Substrat EJ-EGFP und pCMV-I-Scel für die Expression der Endonuklease I-Scel zur gezielten Spaltung des Substrates transfiziert und für 48h kultviert. Jede Quantifikation von grünen fluoreszierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie wurde mit Hilfe der individuell pro Kultur in Parallelansätzen ermittelten Transfektionseffizienz normalisiert um die DSB Reparaturfrequenz zu errechnen. In Abbildung A (H1299.1) und B (H1299.2) sind die Mittelwerte aus je sechs Messungen dargestellt, P<0,05. Die Werte für die Wildtyp-KRAS exprimierenden Zellen der Klone KRAS(wt)cl4 (A) und KRAS(wt)cl11 (B) wurden dabei mit 100% gleichgesetzt.

### 3.3.5. Weitere untersuchte DNA-Reparatur-Komponenten

RPA stabilisiert Regionen einzelsträngiger DNA an DNA-Brüchen und kann je nach Interaktionspartner zur Reparatur mittels HR sowie bei der Replikation führen (West 2003). Außerdem ist es bei der NER involviert (Fragkos et al. 2015, Wood et al. 1997). Wir haben die Rekrutierung von RPA an die DNA nach Behandlung mit Cisplatin untersucht. In Abbildung 24A wird sichtbar, dass wir 24h nach Behandlungsende keinen Unterschied in der Foci-Bildung zwischen KRAS-Mutanten-Protein und Wildtyp-KRAS exprimierenden Zellen feststellen konnten.

Für die Entfernung von ICLs spielt der FA-Weg eine wichtige Rolle (Thompson und Hinz 2009). Als kritische Schaltstelle des Reparaturweges wurde die nukleäre FANCD2-Foci-Bildung, welche die Ubiquitinierung dieses Proteins wiederspiegelt,

in den Zellen mit Expression von KRAS-Mutanten-Protein versus Wildtyp-KRAS-Protein untersucht. Wie in Abbildung 24B aufgeführt, zeigten die KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden Klone KRAS(G12C)cl2, KRAS(G12D)cl2 und KRAS(G12V)cl9 nach Cisplatinbehandlung keine klare Reduktion der FANCD2-Foci-Bildung in der Immunfluoreszenz-Analyse, wie sie für beschleunigte ICL zu erwarten wäre, für KRAS(G12V)cl9 eher sogar eine Zunahme.



Focibildung 24h nach Bahandlungsende

# Abbildung 24: Immunfluoreszenz-Analyse der Bildung nukleärer Foci nach Behandlung der Zellen des Klonsatzes H1299.1 mit Cisplatin.

Die Zellen wurden für 1h mit 60µM Cisplatin behandelt und dann in frischem Medium reinkubiert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert und mit RPA- und FANCD2-Antikörpern immunmarkiert. Foci wurden durch automatische Quantifizierung ausgelesen und der Mittelwert der Foci pro Zelle in der gesamten Zellpopulation aus je zwei Objektträgern berechnet, wobei jeweils 100 Nuklei analysiert wurden. Abbildung A. und B. zeigen die Ergebnisse eines Experimentes.

Phosphorylierung des Histons H2AX durch ATM, ATR und DNA-PK, d.h. γH2AX-Bildung ist ein entscheidender Schritt während der DNA-Schadensantwort und markiert DNA-Schäden im Chromatin (Harper und Elledge 2007). Aus diesem Grund haben wir die γH2AX-Focibildung in Zellen des Klonsatzes H1299.1 geprüft. Der Klon KRAS(G12C)cl2 zeigte im ersten und zweiten Experiment eine verringerte γH2AX-Rekrutierung und damit deutlich weniger DNA-Schäden im Vergleich zu KRAS(wt)cl4 über die Zeitpunkte 6h, 16h und 24h hinweg (siehe Abb. 25). Dies war für die anderen KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden Klone KRAS(G12D)cl2 und KRAS(G12V)cl9 nicht beobachtbar.



# Abbildung 25: Immunfluoreszenz-Analyse der Bildung nukleärer Foci nach Behandlung der Zellen des Klonsatzes H1299.1 mit Cisplatin.

Die Zellen wurden für 1h mit 60µM Cisplatin behandelt und dann in frischem Medium reinkubiert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert und mit γH2AX-Antikörpern immunmarkiert. Foci wurden durch automatische Quantifizierung ausgelesen und der Mittelwert der Foci pro Zelle in der gesamten Zellpopulation aus je zwei Objektträgern berechnet, wobei jeweils 100 Nuklei analysiert wurden. Abbildung A zeigt die Ergebnisse aus zwei Experimenten. Abbildung B zeigt repräsentative Beispiele für die Focibildung nach 16h Cisplatinbehandlung in KRAS-Mutanten-Protein und Wildtyp-KRAS exprimierenden H1299.1-Zellen.

Ein weiterer zu berücksichtigender Reparaturweg war die MMR, eine Form der DNA-Reparatur, die während der Replikation entstandene Fehler im Tochterstrang ausbessern kann. Ein wesentlicher Bestandteil der MMR ist das Protein MLH1 (Ciccia und Elledge 2010), das wir ebenfalls anhand der Western-Blot-Analyse evaluieren konnten. In Abbildung 26A wird deutlich, dass KRAS(G12C)cl2 exprimierende Zellen niedrigere MLH1-Mengen aufweisen als KRAS(wt)cl4 exprimierende Zellen. Die Klone KRAS(G12D)cl2 und KRAS(G12V)cl9 zeigten zumindest vor Behandlung mit Cisplatin keine deutlich veränderten MLH1-Mengen, jedoch nach Behandlung für den Klon KRAS(G12V)cl9.

PCNA ist ein Ringklemmenprotein, das sich binnen kurzer Zeit an DNA-Schäden anhäuft und dort als Plattform für die Rekrutierung von Proteinen der DNA-Replikation und DNA-Reparatur dient, unter anderem spielt es auch eine Rolle für die MMR (Fragkov et al. 2015, Moldovan et al. 2007). Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse konnten wir die Proteinmengen von PCNA in Zellen des Klonsatzes H1299.1 ermitteln. Wie in Abbildung 26B zu sehen, wies der Klon KRAS(G12C)cl2 nach Cisplatinbehandlung eine deutliche Reduktion der Proteinmengen auf. Diese ließ sich jedoch in späteren Experimenten nicht reproduzieren (Caiola et al. 2015).



## Abbildung 26: Bestimmung der Proteinmengen von MLH1 und PCNA in Zellen des Klonsatzes H1299.1 als mögliche Ursache für die Entstehung der Resistenz gegen Cisplatin.

Western-Blot-Analyse der Klone KRAS(wt)cl4, KRAS(G12C)cl2, KRAS(G12D)cl2 und KRAS(G12V)cl9. Die Zellen wurden entweder mit 15µM Cisplatin behandelt oder das Medium wurde nur gewechselt. Nach Zellernte wurde eine SDS-PAGE und anschließend eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Es wurden spezifische Antikörper verwendet um PCNA, MLH1 und Tubulin zu detektieren. Tubulin diente hierbei als Ladekontrolle, die Proteinmengen wurden anhand der Bandenintensität im Vergleich zu Tubulin quantifiziert. Abbildung A entspricht den Mittelwerten aus zwei Messungen, Abbildung B den Mittelwerten aus vier Messungen. Die Proteinmenge der unbehandelten Wildtyp-KRAS exprimierenden Zellen des Klons KRAS(wt)cl4 wurde jeweils mit 100% gleichgesetzt.

# 4 Diskussion

### 4.1. Cisplatinresistenz in soliden Tumoren und ihre möglichen Ursachen

Cisplatin ist der am häufigsten eingesetzte Vertreter der Platin-haltigen Chemotherapeutika. In letalen Dosen unterliegt das Cisplatin-Molekül, nach Aufnahme in die Zelle, dem Vorgang der Aquation, wobei seine beiden Chlorid-Liganden durch Wasser-Moleküle ersetzt werden. Diese reaktive Form des Medikaments bindet nun bevorzugt an das N7-Atom von Guanin-Basen und führt dadurch zur Bildung von Monoaddukten, Intra- und Interstrang-Querverbindungen. Die Quervernetzungen führen zum Anhalten der Replikation, zum Arrest des Zellzyklus und triggern schließlich die Apoptose (Chu 1994). Dies ergibt den bekannten zytotoxischen Effekt des Chemotherapeutikums. Subletale Dosen des Medikaments können in Zellkultur zur Resistenz durch unterschiedliche Mechanismen führen. Generell bindet eine Vielzahl zellulärer Proteine an die Cisplatin-DNA-Quervernetzungen. Dies beinhaltet einerseits Faktoren, die das Zellüberleben durch Vermittlung der DNA-Reparatur fördern und andererseits solche, die den Zelltod durch Sensibilisierung für das Medikament beschleunigen (Chu 1994).

Cisplatin-haltige Therapieschemata führen häufig zu einem initialen Ansprechen der Patienten, welches im Verlauf der Therapie jedoch zurückgeht und in einer Resistenz gegen Cisplatin mündet (Giaccone 2000, Köberle et al. 2010). Bei den NSCLCs werden 50% der Tumoren im Stadium IIIB oder IV diagnostiziert. Von diesen Patienten überleben wiederum nur 50% das erste Jahr. Dies hängt einerseits mit dem späten Zeitpunkt der Diagnose zusammen, andererseits mit dem Auftreten einer primären oder sekundär entwickelten Resistenz der Tumorzellen (Tsvetkova und Goss 2012). Diese Resistenz scheint multifaktoriellen Ursprungs zu sein.

### 4.1.1. Aufnahme und Abgabe von Cisplatin in beziehungsweise aus der Zelle

Der Transportmechanismus für Cisplatin in die Zelle konnte noch nicht eindeutig aufgeklärt werden. Es scheint sich jedoch nicht um einen aktiven Transport zu handeln (Binks und Dobrota 1990), sondern um eine Aufnahme durch passive Diffusion, die mit dem Kupferhaushalt assoziiert ist. Der Copper transporter 1 (Ctr1) könnte hierbei die Aufnahme von Cisplatin in die Zelle modulieren (Ishida et al. 2002). Die Kupfertransporter ATP7A und ATP7B dagegen, könnten für einen gesteigerten Efflux des Medikaments aus der Zelle verantwortlich (Yoshizawa et al. 2007) und so am Resistenzmechanismus beteiligt sein. Dies könnte bedeuten, dass die Resistenz gegen Cisplatin, die wir in den KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden Zellen der Zelllinien H1299 und H2888 detektieren konnten, tatsächlich auf der reduzierten Aufnahme von Cisplatin in die Zelle oder dem gesteigerten Transport aus der Zelle beruht. Um dies auszuschließen, hat unser kollaborierendes Labor die Cisplatin-Aufnahme in die Zelle und die anfängliche DNA-Adduktbildung getestet. Anhand der induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie mit dynamischer Reaktionszelle konnte ein vergleichbares Maß der Platinbindung an die DNA in allen Klonen nachgewiesen werden (Caiola et al. 2015). Die Resistenz der Mutanten-Protein exprimierenden Zellen konnte somit nicht auf eine verminderte Cisplatin-Aufnahme zurückgeführt werden.

### 4.1.2. Inaktivierung von Cisplatin durch Thiolgruppen

Eine weitere Möglichkeit ist die Inaktivierung von Cisplatin durch die Thiolgruppen von Peptiden oder Proteinen wie Glutathion oder Metallothioneinen. Dabei wird das reaktive Molekül durch diese gebunden anstatt mit der DNA zu interagieren. Das Medikament wird somit inaktiviert. Die Rolle von Glutathion und der Glutathion-S-Transferase (GST) wurde hierfür eingehend untersucht. Die Ergebnisse waren inkonsistent, es scheint Unterschiede zwischen verschiedenen Tumorarten zu geben (Köberle et al. 2010). Dennoch scheint Glutathion eine Rolle für die intrinsische oder erworbene Resistenz von einigen Tumoren gegen Cisplatin zu spielen (Yang et al. 2006). Auch für Metallothionein sind widersprüchliche Ergebnisse vorhanden, die das Protein zwar in die Inaktivierung von Cisplatin implizieren (Kasahara et al. 1991), diese aber auch hier von der Art des Tumors abhängig ist (Köberle et al. 2010). Unsere Kollaborationspartner konnten auch hier keinen Unterschied in der Aktivität der GST und der Menge an intrazellulärem Glutathion **KRAS-Mutanten-Protein** zwischen und Wildtyp-KRAS-Protein exprimierenden Zellen feststellen (Caiola et al. 2015).

### *4.1.3.* Beteiligung der DNA-Reparatur

Eine weitere Theorie involviert Mechanismen der DNA-Reparatur. In Ovarialkarzinomzellen wurde eine erworbene Resistenz gegen Cisplatin mit einer verstärkten Beseitigung der Platin-Moleküle von der DNA in Verbindung gebracht, dabei wurde keine direkte Korrelation zwischen dem Ausmaß der Entfernung und

der Resistenz festgestellt (Johnson et al. 1993). Andererseits schien es in einer weiteren Studie, die zwei Zelllinien aus Keimzelltumoren des Hodens mit einer Zelllinie aus einem Blasenkarzinom verglich, keinen Zusammenhang zwischen der Kapazität der DNA-Reparatur und dem Erwerb der Cisplatin-Resistenz zu geben (Köberle et al. 1996). Jedoch wird von einer Relevanz der DNA-Reparatur in der intrinsischen Hypersensibilität von Hodentumorzellen für Cisplatin berichtet (Köberle et al. 1997). Es wurde bisher angenommen, dass Schäden an der DNA durch Cisplatin hauptsächlich mit Hilfe der NER wieder entfernt werden (Gillet und Schärer 2006). Eine Resistenz von Ovarialkarzinomzellen gegen Cisplatin wurde zusätzlich mit einer erhöhten NER-Aktivität verknüpft. Diese Zunahme kann das Ausmaß der Resistenz jedoch nicht vollständig erklären (Ferry et al. 2000). Besondere Bedeutung kommt außerdem dem NER-Protein ERCC1 zu. In 2006 veröffentlichten Olaussen et al. Daten, die suggerierten, dass der ERCC1-Status von Patienten mit vollständig resezierten NSCLC-Tumoren entscheidend für die weitere Therapie sei. Ihren Daten zufolge profitierten Patienten mit ERCC1negativen Tumoren von einer Cisplatin-basierten adjuvanten Chemotherapie. Dabei stützten sie sich auf Immunhistochemische Analysen von Tumorproben unter Verwendung eines spezifischen monoklonalen Antikörpers (Maus, Klon 8F1, Neomarkers) gegen das humane ERCC1-Protein. Eine weitere Studie zeigte, dass die Hemmung des ERCC1-XPF-Komplexes ein valides Ziel zur Verbesserung der Wirkung von Cisplatin darstellen könnte (Arora et al. 2010).

In weiteren Studien wurde jedoch deutlich, dass die Verwendung von ERCC1 als Marker für das Ansprechen auf Cisplatin in dieser Form nicht möglich zu sein scheint. Es existieren vier funktionell unterschiedliche Isoformen des ERCC1-Proteins, von welchen nur die Isoform 202 eine Rolle für die DNA-Reparatur zu spielen scheint (Friboulet et al. 2013b). Außerdem war es in wiederholten Analysen nicht möglich, die Funktion des 8F1-Antikörpers nachzuvollziehen. Dies legte ein verändertes Verhalten des Antikörpers seit 2006 nahe. Weiterhin war es keinem der 16 getesteten Antikörper möglich, zwischen den vier Isoformen des ERCC1-Proteins unterscheiden, was bedeutet, mit zu dass den derzeitigen immunhistochemischen Methoden keine prädiktiven Aussagen gemacht werden können (Friboulet et al. 2013a). Auch die TASTE-Studie wurde nach Abschluss der Phase II abgebrochen, da die Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen des ERCC1-Proteins zu unzuverlässig waren (Wislez et al. 2014).
Alles zusammengenommen scheint die Entfernung von Cisplatin-induzierten Schäden an der DNA jedoch eine Rolle für die Resistenz gegen das Chemotherapeutikum zu spielen.

#### 4.1.4. Toleranz geschädigter DNA

Zusätzlich ist wahrscheinlich die Toleranz nicht reparierter Läsionen durch die TLS von Bedeutung. Die Polymerasen der TLS sind in der Lage an einer Läsion vorbei zu synthetisieren (Shachar et al. 2009) und wurden in die FA-Reparatur von ICLs impliziert (Niedwiez et al. 2004). Sogar für die Polymerase  $\beta$ , die hauptsächlich an der BER beteiligt ist, wird eine Überwindung von Cisplatin-Addukten beobachtet (Vaismann 2000). Der Effekt des Pol  $\beta$ -Inhibitors Masticadienonic acid auf Cisplatin-resistente Zellen durch Hemmung der Bypass-Synthese durch TLS, deutete weiterhin eine Bedeutung der Polymerase  $\beta$  für die Entstehung der Resistenz an (Boudsocq et al. 2005). Aus diesem Grund wurde die BER als mögliche Ursache für die Resistenzentstehung in den KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden Zellen in Betracht gezogen und durch unser kollaborierendes Labor eingehend untersucht.

Caiola et al. stellten daraufhin aufbauend auf meinen und weiteren Daten ein Modell auf, das die Entstehung der Resistenz gegen Cisplatin in der Mutationsvariante KRAS(G12C) erklären könnte und diese mit der BER in Verbindung bringt.

Die BER repariert oxidierte, desaminierte und alkylierte Basen, sowie DNA-Einzelstrangbrüche (SSB). Zu Beginn wird durch Glykosylasen eine Läsion in der DNA erkannt. Es sind 11 Glykosylasen bekannt, die in Säugetierzellen aktiv sind, und von denen vier falsch gepaartes Uracil und Thymin entfernen, sechs oxidative Schäden beheben und eine alkylierte Basen herausschneidet. Durch Entfernung der beschädigten Base entsteht eine abasische Stelle (AP-site), die durch eine Endonuklease apurinische (APE1) erkannt und das Phosphatrückgrat eingeschnitten wird. Die entstandene Lücke wird daraufhin entweder durch Shortpatch gap filling gefüllt, wobei der Basen-freie Zucker-Phosphat-Rest durch die Lyase-Aktivität der Polymerase  $\beta$  (Pol $\beta$ ) abgetrennt und die DNA durch den DNA-Ligase δ III-XRCC1-Komplex ligiert wird. Alternativ wird ein längerer Abschnitt durch die Polymerase ersetzt, die überhängende DNA von der Flap endonuclease 1 (FEN1) entfernt und die Lücke daraufhin durch die DNA-Ligase I ligiert. Dieser Vorgang wird Long-patch gap filling genannt. PARP1 könnte eine entscheidende

Rolle für den Wechsel von Short-patch zu Long-patch gap filling sein (Barnes und Lindahl 2004, Krokan und Bjøras 2013, Wallace 2014) (siehe Anhang Abb. 27).

In ihren Experimenten untersuchte die Gruppe parallel zu meiner Arbeit ebenfalls die KRAS-Mutationsvarianten KRAS(G12C), KRAS(G12D) und KRAS(G12V) und evaluierte zunächst bereits bekannte Möglichkeiten der Resistenzentstehung wie zuvor beschrieben. Außerdem wurden KRAS Effektoren der PI3K- und MAPK-Signalwege auf Veränderungen hin untersucht. Eine stärkere Phosphorylierung der Proteine S6, p70S6K, MEK. Erk, Akt, 4EBP1 und PRAS40 nach Cisplatinbehandlung konnte in allen Klonen mit Mutanten-KRAS entsprechend Wildtyp-KRAS festgestellt werden. Zusätzlich konnte eine verminderte Aktivierung von ATM festgestellt und eine verminderte vH2AX-Focibildung in KRAS(G12C) exprimierenden Zellen bestätigt werden. Um auszuschließen, dass die Zellen einen Defekt in der Erkennung von DNA-Schäden aufweisen, wurde die vH2AX-Foci-Bildung nach Behandlung mit ionisierender Strahlung getestet. Unter diesen Bedingungen war die vH2AX-Foci-Bildung nicht eingeschränkt und das Überleben aller Klone vergleichbar. Jedoch konnte die auffällige Cisplatin-Resistenz der KRAS(G12C) exprimierenden Zellen auch in vivo nach Injektion der Tumorzellen in Mäusen nachgewiesen werden. Zusammengefasst konnten in diesem Stadium des Projekts weder Unterschiede in der Aufnahme oder Abgabe von Cisplatin noch in der DNA-Adduktbildung oder Entfernung durch NER, FA- oder DSB-Reparatur-Wege die erhöhte Cisplatin-Resistenz in KRAS(G12C) Klonen erklären.

Um auch eine mögliche Rolle der BER in der Resistenzentstehung aufzuzeigen, wurden die Zellen mit Methoxamin behandelt, einem Medikament, das den initialen Schritt der BER hemmt (Rosa et al. 1991). Dies führte zur fast vollständigen Wiederherstellung der Sensibilität der KRAS(G12C) exprimierenden Zellen auf Cisplatin. Außerdem konnte eine 2,7-fach erhöhte Expression der Polymerase  $\beta$  im Western Blot der KRAS(G12C)-Klonen detektiert werden. Auch die Hemmung der Polymerase  $\beta$  durch Pamoasäure (Hu et al. 2004), konnte die Sensibilität der KRAS(G12C) exprimierenden Zellen gegen Cisplatin restituieren.

Dieses Modell könnte die Resistenz der Mutationsvariante KRAS(G12C) gegen Cisplatin durch gesteigerte BER erklären und möglicherweise ein Ansatzpunkt für eine zukünftige zielgerichtete Therapie sein.

#### 4.1.5. Aktivierung pro-apoptotischer Signale durch die MMR-Maschinerie

Der MMR-Proteinkomplex MutSα ist in der Lage an Cisplatin-Addukte zu binden (Duckett et al. 1996, Mello et al. 1996). Dies scheint entscheidend für den zytotoxischen Effekt von Cisplatin zu sein. Es werden zwei Modelle diskutiert: entweder aktivieren die MMR-Proteine direkt die Caspasen 9 und 3 und damit den Apoptose-Signalweg (Topping et al. 2009) oder sie schirmen das gebundene Cisplatin von der DNA-Reparatur ab und fördern so die Letalität der Zelle (Mello et al. 1996). In jedem Fall scheint die MMR-Maschinerie wichtig für die Erzeugung apoptotischer Aktivität zu sein und Defekte in diesem Signalweg scheinen zur Cisplatinresistenz zu führen (Fink et al. 1996). In Abbildung 26A ist zu sehen, dass die KRAS(G12C)cl2 exprimierenden Zellen vor und nach Cisplatinbehandlung eine deutlich verminderte MLH1-Aktivität aufweisen, sowie die KRAS(G12V)cl9 exprimierenden Zellen nach Cisplatinbehandlung. Dies könnte ein Hinweis auf eine verminderte Aktivierung der Apoptose durch die MMR-Maschinerie sein.

#### 4.1.6. Hemmung der Apoptose

Eine zusätzliche Möglichkeit dem zytotoxischen Effekt von Cisplatin zu entfliehen, könnte die Hemmung der Apoptose sein. Der normale Weg der Induktion der Apoptose durch Cisplatin ist dabei noch nicht vollständig verstanden (Köberle et al. 2010). Es könnte sowohl über den extrinsischen als auch über den intrinsischen Weg erfolgen. Der extrinsische Weg besteht aus der Aktivierung von Todesrezeptoren, die wiederum Caspase 8 und Caspase 3 aktivieren. Der intrinsische Weg löst über p53 und mehrere Zwischenschritte den Austritt von Cytochrom C aus den Mitochondrien und die darauffolgende Aktivierung pro-apoptotischer oder Förderung anti-apoptotischer Signale zustande kommen (Brozovic und Osmak 2007, Yang et al. 2004). Unsere Kollaborationspartner konnten feststellen, dass in den KRAS(G12C) exprimierenden Zellen die Apoptose durch Cisplatin sehr viel schwächer aktiviert wird, als in Wildtyp-KRAS beziehungsweise KRAS(G12D) oder KRAS(G12V) exprimierenden Zellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass verschiedene Ursachen für die Resistenz von Tumorzellen gegen Cisplatin diskutiert werden. Dabei unterscheiden sich die einzelnen Tumoren untereinander in Art und Umfang Resistenz-vermittelnder Mechanismen. Ein allgemeiner Weg, die Resistenz zu verursachen, scheint nicht zu existieren. Zusätzlich muss zwischen intrinsischer und erworbener Resistenz der Tumorzellen unterschieden werden. Demgegenüber könnte die von mir festgestellte Reduktion der DSB-Reparatur in Mutanten-KRAS exprimierenden Zellen im Zusammenhang mit der erhöhten PARP-Inhibitor-Sensibilität stehen. Da PARP1 einen wichtigen Faktor der BER darstellt, könnten zukünftige Studien klären inwieweit PARP-Inhibitoren Platinderivate beim KRAS-mutierten NSCLC ersetzen beziehungsweise ergänzen könnten im Sinne einer Kombinationstherapie. Derzeit wird eine Phase 3 klinische Studie zur Kombination von PARP-Inhibitoren und Platin-haltigen Chemotherapeutika in Patienten mit NSCLC durchgeführt (Identifikationsnummer NCT02264990).

PARP-Inhibitoren werden grundsätzlich gut vertragen, die häufigsten Nebenwirkungen beinhalten milde bis moderate Übelkeit, Erschöpfung, Erbrechen und Anämie (Sonnenblick et al. 2014).

#### 4.2. KRAS-Mutationen in NSCLC Zellen

KRAS ist ein Onkogen, das bekanntermaßen in Pankreas-, Lungen- und Kolorektalen Tumoren mutiert ist. Meist handelt es sich um Austauschmutationen in den Codons 12, 13 oder 61, die zur Hemmung der Hydrolyse von GTP und damit zur ständigen Aktivierung der auf KRAS folgenden Signalwege führen. Lungenkrebszellen weisen in etwa 17% der Fälle eine KRAS-Mutation auf und die häufigste Mutationsvariante ist KRAS(G12C) (siehe Abb. 7). Etwa 80% der Lungenkarzinome sind NSCLCs. Weitere Mutationen, die vor allem in diesen Tumoren eine Rolle spielen (Shiao et al. 2011) sind Rearrangements der Rezeptor-Tyrosinkinase EGFR und des EML4-ALK-Proteins, die von einer zielgerichteten Therapie profitieren (Paez et al. 2004, Pao et al. 2004, Solomon et al. 2014). Diese Mutationen sind nicht überlappend, das bedeutet sie treten nicht gleichzeitig mit einer der anderen in einem Lungenkarzinom auf (Sun et al. 2010, Takahashi et al. 2010). Der vorherrschende histologische Subtyp für alle drei Mutationen ist das Adenokarzinom (Brose et al. 2002, Inamura et al. 2008, Pao et al. 2004). Die KRAS-Mutation tritt dabei häufiger bei Rauchern auf, aber auch bei Patienten, die noch nie geraucht haben (Riely et al. 2008). Bisher gibt es für Patienten mit KRAS-Mutationen im Gegensatz zu solchen mit EGFR- oder EML4-ALK-Mutationen keine zielgerichtete Therapie. Wie in Tabelle 2 aufgeführt, ist in den früheren Stadien die

Therapie der Wahl die operative Entfernung des Tumors, zusätzlich wird je nach Stadium eine adjuvante Platin-basierte Chemotherapie in Betracht gezogen. In nicht resezierbaren Tumoren, spielt die Platin-basierte Chemotherapie eine entscheidende Rolle. Träger einer *KRAS*-Mutation jedoch scheinen eine schlechtere Prognose nach Operation zu haben und nicht von einer adjuvanten Platin-basierten Chemotherapie zu profitieren (Winton et al. 2005).

#### 4.3. Ansprechen der KRAS-mutierten NSCLC Zellen auf Cisplatin

In meinen Experimenten zum Zellüberleben nach Cisplatinbehandlung, konnte ich zeigen, dass NSCLC-Zelllinien, die KRAS-Mutanten-Proteine exprimieren, teilweise eine Resistenz gegen Cisplatin aufweisen (siehe Abb. 8, 9 und 10). Die Ergebnisse für die verschiedenen Klone der einzelnen Mutationsvarianten konnten jedoch nicht immer in Einklang gebracht werden. Die von H1299-Zellen abgeleiteten Klone KRAS(G12C)cl2 und KRAS(G12C)cl4 offenbarten ein zwei- beziehungsweise dreifach erhöhtes Zellüberleben (siehe Abb. 8, 9 und 10A), während der von H2888-Zellen abgeleitete Klon KRAS(G12C)cl1 ähnlich gut auf die Cisplatinbehandlung ansprach wie die KRAS(wt)cl4 exprimierenden Zellen (siehe Abb. 10B). Die Klone KRAS(G12V)cl9 (H1299.1) und KRAS(G12V)cl1 (H2888) verhielten sich ähnlich, sie tolerierten das Chemotherapeutikum sehr viel besser als die jeweiligen Wildtyp-KRAS exprimierenden Zellen (siehe Abb. 8 und 10B), KRAS(G12V)cl22 (H1299.2) dagegen nicht (siehe Abb.9 und 10A). Es wurden nur zwei Klone KRAS(G12D)cl2 und KRAS(G12D)cl3 der Mutationsvariante KRAS(G12D) untersucht, die jedoch in der Zellviabilitätsprüfung stabil ein vergleichbares Verhalten an den Tag legten. Sie waren um ein Drei- beziehungsweise ein Sechsfaches überlebensfähiger als ihre korrespondierenden Wildtyp-KRAS exprimierenden Zellen (vergleiche Abb. 8, 9 und 10A).

In Tabelle 8 und 9 (siehe Anhang) sind die IC50-Werte der einzelnen KRAS-Mutanten-Protein und Wildtyp-KRAS exprimierenden Zellen, sowie die statistische Signifikanz des veränderten Zellüberlebens der KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden Zellen unter Cisplatinbehandlung aufgeführt.

Die Tatsache, dass jeweils zwei von drei Klonen einer Mutationsvariante ein signifikant erhöhtes Zellüberleben zeigten, ließ vermuten, dass diese Mutationen

zur Resistenz gegen Cisplatin und damit zum schlechteren Ansprechen der Patienten auf ihre Therapie führen können. Das Ausmaß der Resistenz scheint zwischen den einzelnen Mutationsvarianten zu variieren und sollte daher individuell beurteilt werden. Weitere Untersuchungen zur genaueren Charakterisierung der Mutationsvarianten KRAS(G12C), KRAS(G12D) und KRAS(G12V) sind von Nöten.

#### 4.4. Ansprechen der KRAS-mutierten NSCLC Zellen auf PARP1-Inhibitoren

In einem kürzlich durchgeführten Hochdurchsatz-Medikamententest an fünf isogenen NSCLC Zelllinien mit und ohne Zinkfinger-vermittelte Inaktivierung von ERCC1, zeigte sich eine verstärkte Sensibilität auf PARP-Inhibitoren wie Olaparib, Niraparib und BMN673 in ERCC1-defizienten Zellen. Es konnte zusätzlich festgestellt werden, dass die Isoform 202 des ERCC1-Proteins, die die Sensibilität auf Platin-haltige Therapeutika vermittelt, auch hier die Sensibilität moduliert und in der Lage ist, eine Resistenz gegen PARP-Inhibitoren wiederherzustellen (Postel-Vinay et al. 2014). Weiterhin zeigten Studien, dass PARP-Inhibierung zu reduzierten DNA-Reparaturkapazitäten führt. die Bildung Cisplatin-induzierter DNA-Quervernetzungen fördert und dadurch einen Anstieg der Sensibilität auf Cisplatin erzeugt (Michels et al. 2013b, Olaussen et al. 2013). Auf der anderen Seite scheint PARP1 in Cisplatin-resistenten Tumorzellen unterschiedlichen histologischen Ursprungs hoch exprimiert und konstitutiv überaktiviert zu sein. Zellen mit erhöhten intrazellulären Mengen an poly(ADP-Ribosy)lierten Proteinen (PAR) sprachen gut auf PARP-Inhibitoren sowie PARP1-gerichtete siRNAs an, die zur Induktion der Apoptose führten (Michels et al. 2013a).

Wir führten daher ähnliche Experimente wie für Cisplatin auch für die Zellviabilität unter Behandlung mit den PARP-Inhibitoren IQD und Nu1025 durch. Es überraschte uns festzustellen, dass die Mutanten-KRAS exprimierenden Klone beider Zelllinien ähnlich gut respektive besser auf die Behandlung ansprachen als die jeweiligen Wildtyp-KRAS exprimierenden Klone (siehe Abb. 11-14). Die KRAS(G12C)cl2 und KRAS(G12C)cl4 exprimierenden Zellen zeigten unter IQD das gleiche Verhalten wie die den Wildtyp-KRAS exprimierende Zellen, unter Nu1025 war das Zellüberleben für KRAS(G12C)cl4 exprimierende Zellen sogar um 50% reduziert. Die KRAS(G12D)cl2 und KRAS(G12D)cl3 exprimierenden Zellen reagierten ähnlich auf IQD, unter Nu1025-Behandlung waren KRAS(G12D)cl2 exprimierende Zellen

ebenfalls sensibler auf die Behandlung. Die Zellen mit Expression der KRAS(G12V)-Klone variierten am meisten, hier war immer jeweils ein Klon sensibler auf die Behandlung als der andere, KRAS(G12V)cl22 exprimierende Zellen auf IQD und KRAS(G12V)cl9 exprimierende Zellen auf Nu1025. Schlussfolgern lässt sich aber dennoch, dass KRAS-Mutanten-Protein exprimierende Zellen keine Resistenz, sondern erhöhte Sensibilität für PARP-Inhibitoren aufwiesen. Die Widerstandsfähigkeit der Zellen gegen Cisplatin und PARP-Inhibitoren scheint demnach von unabhängigen Mechanismen in den Mutanten-KRAS exprimierenden Klonen moduliert zu werden.

In Tabelle 10 und 11 (siehe Anhang) sind die IC50-Werte der einzelnen KRAS-Mutanten-Protein und Wildtyp-KRAS exprimierenden Zellen, sowie die statistische Zellüberlebens der KRAS-Mutanten-Protein Signifikanz des veränderten exprimierenden Zellen unter Behandlung mit IQD beziehungsweise Nu1025 aufgeführt. Außerdem wird in Tabelle 12 (siehe Anhang) die Sensibilität der einzelnen Mutanten-KRAS exprimierenden Klone im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp-KRAS exprimierenden Klon auf Cisplatin sowie IQD und Nu1025 dargestellt.

# 4.5. Beurteilung der DNA-Reparatur-Aktivitäten als Ursache für die Resistenz gegen Cisplatin in den einzelnen Mutanten-KRAS exprimierenden Klonen

#### 4.5.1. Die Mutationsvariante KRAS(G12C)

KRAS(G12C)cl2 exprimierenden Zellen zeigten in Die allen vier DSB-Reparaturwegen signifikant weniger Reparaturereignisse als KRAS(wt)cl4 exprimierende Zellen. Für die KRAS(G12C)cl4 exprimierenden Zellen konnte ich dies nur in der HR und dem cNHEJ detektieren, die Ergebnisse für SSA und MMEJ ähnelten denen der KRAS(wt)cl11 exprimierenden Zellen. Die DSB-Reparaturfrequenz wurde als Maß der Aktivität der DSB-Reparatur gewertet. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass die Resistenz der Mutationsvariante KRAS(G12C) gegen Cisplatin, sich vermutlich nicht aus der Überaktivierung eines dieser Reparaturwege ergibt (siehe Abb. 15, 18, 20 und 23). Die weiteren Experimente wurden nur für KRAS(G12C)cl2 exprimierende Zellen durchgeführt.

Unveränderte RAD51- und reduzierte BRCA1-Foci nach 24h, sowie reduzierte BACH1-Proteinmengen in KRAS(G12C)cl2 exprimierenden Zellen, festigten weiterhin den Ausschluss der HR als möglichen Cisplatin-Resistenz vermittelnden Mechanismus (siehe Abb. 16A und B, 17A). Auf der anderen Seite könnte genau diese HR-Reduktion erhöhte Sensibilität gegenüber PARP-Inhibitoren vermittelt haben. Für PARP-Inhibitoren wird das Prinzip der synthetic lethality angenommen. Diese wird definiert als genetische Interaktion, bei der das gleichzeitige Auftreten von zwei genetischen Ereignissen zum Zelltod führt (Nijman 2011). Bei einem Tumor mit BRCA1/2-Mutation, d.h. einem Ausfall der HR, würde durch Behandlung mit einem PARP-Inhibitor die von vornherein eingeschränkte DSB-Reparatur vollständig zum Erliegen kommen und durch massives Anhäufen von DSBen der Zelltod eintreten (Yap et al. 2011).

Reduzierte RAD52-Proteinmengen waren konsistent mit der reduzierten SSA-Aktivität, nicht jedoch mit der Cisplatin-Resistenz (siehe Abb. 19A).

53BP1-Foci waren sowohl nach 16h als auch nach 24h Cisplatinbehandlung signifikant vermindert, wobei jedoch auch γH2AX-Foci erniedrigt waren, was auf reduzierte DSBe hindeutete. Dies erschwerte die Beurteilung des cNHEJ via 53BP1-Foci (siehe Abb.21A und B).

Der Ausschluss der DSB-Reparatur wurde weiterhin durch die Ergebnisse in der Zellviabilitätsprüfung nach Behandlung mit PARP-Inhibitoren gestützt (siehe Abb. 11-14). Diese Medikamente hemmen die Einzelstrangbruchreparatur und führen so zur Induktion von DSBen. Die Zellen sind daher auf die Funktion anderer Reparaturwege z.B. der HR angewiesen. Die Sensibilität der KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden Zellen auf IQD und NU1025 könnte sich somit aus der Tatsache erklären, dass die Mechanismen der DSB-Reparatur, insbesondere der HR, in den KRAS(G12C) exprimierenden Zellen zellen herunterreguliert sind.

Die Proteinmenge von ERCC1 vor und nach Behandlung mit Cisplatin unterschied sich nicht signifikant von KRAS(wt)cl4 exprimierenden Zellen (siehe Abb. 19B). Die unveränderten Proteinmengen passten dabei in das Bild, welches bereits von Bramson und Panasci (1993) in ihrem Paper vermittelt wurde. Sie postulierten, dass verminderte ERCC1-Proteinmengen mit einer Sensibilität gegen Cisplatin, erhöhte Proteinniveaus allerdings nicht unbedingt mit einer Resistenz assoziiert sind. Wie zuvor bereits diskutiert musste ERCC1 als Marker reevaluiert werden, da der zur Verfügung stehende Antikörper nicht in der Lage zu sein scheint zwischen den vier ERCC1-Isoformen zu differenzieren (siehe 4.1.3.).

Die RPA-Foci-Bildung war in allen Zellen des Klonsatzes H1299.1 gleich (siehe Abb. 24A). RPA spielt für unterschiedliche Reparaturwege als ssDNA-bindendes Protein eine wichtige Rolle. Unter anderem ist es an der NER beteiligt. Gemeinsam mit den unveränderten ERCC1-Levels wurde deutlich, dass die NER keinen Anteil an der Resistenzentstehung in KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden Zellen zu haben scheint.

PCNA-Proteinmengen zeigten keine klar reproduzierbaren Veränderungen (siehe Abb. 26B). MLH1-Proteinniveaus waren sowohl vor als auch nach Behandlung mit Cisplatin in KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden Zellen deutlich reduziert vorhanden (siehe Abb. 26A). Daraus folgerte ich, dass die MMR-Komponenten als Aktivatoren pro-apoptotischer Signale nicht für die beobachtete Resistenz gegen Cisplatin verantwortlich gemacht werden können (Fink et al. 1996).

Auch die Bildung von FANCD2-Foci zeigte keinen signifikanten Unterschied in KRAS(G12C)cl2 exprimierenden Zellen (siehe Abb. 24B). Der FA-Weg scheint also ebenfalls nicht beteiligt zu sein.

Die Tatsache, dass γH2AX-Foci, die als Äquivalent von DSBen verstanden werden, nach 16h und 24h reduziert vorhanden waren (siehe Abb. 25), könnte bedeuten, dass in diesen Zellen weniger DSBe entstehen. Eine Möglichkeit der Resistenzentstehung wäre daher, dass Cisplatin von der DNA entfernt wird, bevor Addukte und darauffolgend DSBe geformt werden.

#### 4.5.2. Die Mutationsvariante G12D

Die KRAS(G12D)cl2 und KRAS(G12D)cl3 exprimierenden Zellen zeigten in allen vier Wegen der DSB-Reparatur eine signifikant niedrigere Reparaturfrequenz als die jeweiligen Wildtyp-KRAS exprimierenden Zellen (siehe Abb. 15, 18, 20 und 23). Dies führte auch bei dieser KRAS-Mutationsvariante zum vorläufigen Ausschluss der DSB-Reparatur als Ursache für die Cisplatinresistenz. Die Ergebnisse der MTT-Assays mit PARP-Inhibitoren unterstützten auch für KRAS(G12D) exprimierende Zellen diese Annahmen (siehe Abb. 11-14). Die weiteren Experimente wurden nur für KRAS(G12D)cl2 exprimierende Zellen durchgeführt.

Die BRCA1- und RAD51-Foci-Bildung in KRAS(G12D)cl2 exprimierenden Zellen verlief synchron zu KRAS(wt)cl4 exprimierenden Zellen (siehe Abb. 16A und B). Die BRCA1-Proteinmengen dagegen waren in unbehandelten KRAS(G12D)cl2 exprimierenden Zellen im Vergleich zu KRAS(wt)cl4 exprimierenden Zellen um ein Vierfaches erhöht. Nicht jedoch unter Behandlung mit Cisplatin (vergleiche Abb. 17B). Die BACH1-Proteinmenge war wie für KRAS(G12C)cl2 exprimierende Zellen vermindert (siehe Abb. 17A). Dies kann ein Hinweis für eine Rolle BACH1 bei der reduzierten HR und erhöhten PARP-Inhibitor-Sensibilität, nicht jedoch bei der Cisplatin-Resistenz sein. Dies untermauerte den Ausschluss der HR als Cisplatin-Resistenz vermittelnden Mechanismus.

RAD52-Proteinmengen waren in KRAS(G12D)cl2 exprimierenden Zellen vor Behandlung mit Cisplatin um 40% reduziert im Vergleich zu KRAS(wt)cl4 exprimierenden Zellen (siehe Abb. 19A). ERCC1-Proteinniveaus blieben vor und nach Behandlung mit Cisplatin vergleichbar zu denen in Wildtyp-KRAS exprimierenden Zellen. Dies führte zur Elimination der SSA als möglichen Resistenzmechanismus (siehe Abb. 19B).

Die 53BP1-Foci-Bildung war nur nach 16h signifikant verringert im Vergleich zu KRAS(wt)cl4 exprimierenden Zellen (siehe Abb. 21). 53BP1-Proteinmengen waren in KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden Zellen vor und nach Behandlung mit Cisplatin deutlich erhöht im Vergleich zu Wildtyp-KRAS exprimierenden Zellen. Ähnlich der Mutationsvariante KRAS(G12C) offenbarten auch die KRAS(G12D)cl2 exprimierenden Zellen keine klar veränderten und eher reduzierte KU70-Proteinmengen (siehe Abb. 22).

RPA-Foci zeigten zu keinem Zeitpunkt eine reproduzierbare Veränderung in KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden Zellen, was die NER als Marker für die Resistenz erneut in Frage stellte (siehe Abb. 24A). Nach 16h, nicht jedoch nach 24h, war in KRAS(G12D)cl2 exprimierenden Zellen die FANCD2- und vH2AX-Foci-Bildung signifikant verringert (siehe Abb. 24B und 25). Die verminderte FANCD2-Foci-Bildung sprach zusätzlich gegen den FA-Reparaturweg als Ursache der Resistenz. Die stark verminderte vH2AX-Foci-Bildung nach 16h dagegen, könnte auch hier bedeuten, dass zu diesem Zeitpunkt signifikant weniger DSBe vorhanden waren. Die Proteinmengen von MLH1 und PCNA in KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden Zellen wiesen keine deutlichen Unterschiede auf (siehe Abb. 26).

#### 4.5.3. Die Mutationsvariante G12V

Die Ergebnisse der die Mutationsvariante KRAS(G12V) exprimierenden Zellen konnten für die Testung der Reparaturfrequenz nicht in Einklang gebracht werden. Während KRAS(G12V)cl9 exprimierende Zellen für alle vier DSB-Reparaturwege ähnliche Ergebnisse zeigten wie die anderen **KRAS-Mutanten-Protein** exprimierenden Zellen, waren KRAS(G12V)cl22 exprimierende Zellen in allen vier Reaktionswegen überaktiv (siehe Abb. 15, 18, 20 und 23). Dies lässt sich auch nur teilweise mit der Analyse der Zellviabilität nach PARP-Inhibitor-Behandlung vereinen. Unter IQD wiesen KRAS(G12V)cl9 exprimierende Zellen keinen signifikanten Unterschied auf als KRAS(wt)cl4 exprimierende Zellen (siehe Abb. 11). KRAS(G12V)cl22 exprimierende Zellen dagegen, zeigten eine signifikant verringerte IC50 im Vergleich zu KRAS(wt)cl11 exprimierenden Zellen (siehe Abb. 12). Unter Nu1025-Behandlung zeigten KRAS(G12V)cl9 exprimierende Zellen eine signifikant verringerte IC50, KRAS(G12V)cl22 exprimierende Zellen wiesen keine signifikante Veränderung auf (siehe Abb. 13 und 14). Zumindest für KRAS(G12V)cl9 exprimierende Zellen könnte die erhöhte Nu1025-Sensibilität mit reduzierter HR-Aktivität erklärt werden. Da dieser Klon in seinem Verhalten eher den Klonen KRAS(G12C)cl2 und KRAS(G12D)cl2 entsprach, könnten in KRAS(G12V)cl22 Veränderungen im Verlauf der Zellkulturpassagen stattgefunden haben, die das ursprüngliche DNA-Reparaturverhalten maskierten. Die weiteren Experimente wurden daher nur für KRAS(G12V)cl9 exprimierende Zellen durchgeführt.

Die BRCA1- und RAD51-Foci-Bildung war nur nach 16h signifikant stärker als in KRAS(wt)cl4 exprimierenden Zellen (siehe Abb. 16). Die BRCA1- und BACH1-Proteinmengen waren schwankend und daher im Mittel nicht vom Wildtyp abweichend (siehe Caiola et al. 2015, Abb. 17). Insgesamt unterstützten diese Ergebnisse den Ausschluss der HR als Ursache für die Cisplatinresistenz.

RAD52-Proteinlevels zeigten in KRAS(G12V)cl9 exprimierenden Zellen keine Veränderung im Vergleich zu KRAS(wt)cl4 exprimierenden Zellen (siehe Abb. 19A). Die SSA kam somit auch hier nicht als Verursacher der Resistenz in Frage. Die ERCC1-Proteinmengen zeigten auch in KRAS(G12V)cl9 exprimierenden Zellen keine deutlichen Veränderungen, was auch hier zum Ausschluss der NER führte (siehe Abb. 19B).

Die 53BP1-Foci-Bildung war nach 16h geringer als in Wildtyp-KRAS exprimierenden Zellen. Die 53BP1- und KU70-Proteinmengen in KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden Zellen waren schwankend, zeigten also keinen klaren Unterschied zu Wildtyp-KRAS exprimierenden Zellen. Dies stützte die Elimination des cNHEJ als möglichen Verursacher einer Cisplatinresistenz (siehe Abb.21).

Zusätzlich zeigten die KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden Zellen eine signifikant erhöhte FANCD2-Foci-Bildung nach 16h und nach 24h, sowie eine signifikant verminderte vH2AX-Foci-Bildung nach 16h, im Vergleich zu Wildtyp-KRAS exprimierenden Zellen (siehe Abb.24B und 25). Dies sprach auch in diese Muataionsvariante exprimierenden Zellen für eine verminderte Bildung von DSBen und zusätzlich für eine verstärkte Aktivierung des FA-Raparturweges zur Die Beseitigung ICLs. MLH1-Proteinmengen in KRAS(G12V)cl9 von exprimierenden Zellen waren vermindert, die PCNA-Proteinmengen dagegen ähnelten dem Wildtyp (siehe Abb. 26). Dies könnte bedeuten, dass die Resistenz in KRAS(G12V)cl9 exprimierenden Zellen durch eine Hemmung der MLH1vermittelten Apoptose bereits nach Aktivierung eines FA-Reparaturweges entsteht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die DSB-Reparatur vermutlich bei keiner der drei KRAS-Mutationsvarianten eine Rolle für die Entstehung der Cisplatinresistenz spielt. Die Zellen scheinen eher auf alternative Reparaturwege oder Mechanismen zurückzugreifen um die Zytotoxizität von Cisplatin zu unterbinden. Es deutet vieles darauf hin, dass jede Mutationsvariante ihren eigenen Weg gefunden hat, der Wirkung von Cisplatin zu entkommen. Insbesondere KRAS(G12C)-Klone zeigen deutlich reduzierte DNA-Schäden gemäß γH2AX- und 53BP1-Foci-Bildung (Caiola et al. 2015, Abb.21 und 25). Die Ergebnisse sind für jede Mutationsvariante noch einmal in Tabelle 13 (siehe Anhang) verdeutlicht.

### 5 Zusammenfassung

KRAS ist ein Onkogen kodierend für ein GTPase aktives Protein, dessen Mutation eine Rolle in der Entwicklung verschiedener Tumoren spielt. Es handelt sich meist um Austauschmutationen der Codons 12, 13 und 61, die zur verminderten Hydrolyse von Guanosintriphosphat (GTP) und damit zur dauerhaften Aktivierung von KRAS führen. Dies bewirkt wiederum die konstante Stimulierung von nachfolgenden Effektoren, die für Proliferation, Differenzierung und Überleben der Zelle verantwortlich sind. KRAS ist zu 15-25% auch in Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) mutiert. Die häufigste Mutationsvariante ist hier KRAS(G12C) (Austausch des Glycins an Position 12 durch ein Cystein), der vorherrschende histologische Subtyp ist das Adenokarzinom. Der Großteil der NSCLCs wird im Stadium IIIB oder IV diagnostiziert. Während in Stadium I noch die vollständige Resektion des Tumors ausreichend ist, nimmt ab Stadium II die Bedeutung der adjuvanten Chemotherapie mit Platin-Verbindungen zu. Das am häufigsten verwendete platinhaltige Chemotherapeutikum ist hier Cisplatin. Nach Aufnahme des Medikaments in die Zelle, werden durch den Vorgang der Aguation zwei Chlorid-Liganden durch Wassermoleküle ersetzt. Die nun reaktive Form des Moleküls bindet an Guanosin-Basen der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und führt so zur Entstehung von Intra- und Interstrang-Quervernetzungen. Diese aktivieren die Erkennungsmechanismen der Zelle für DNA-Schäden und führen schließlich zum Zellzyklus-Arrest und zur Apoptose. Es sind Resistenzen und Sensibilitäten verschiedener Tumoren und Tumor-Zelllinien gegen Cisplatin bekannt, für die bereits unterschiedliche Erklärungsmöglichkeiten beschrieben wurden.

Ziel dieser Doktorarbeit war es zunächst zu zeigen, ob und welche der drei KRAS-Mutationsvarianten KRAS(G12C), KRAS(G12D) und KRAS(G12V) eine Resistenz gegen Cisplatin vermittelt, und daraufhin die Mechanismen der Doppelstrangbruch (DSB)-Reparatur und weitere Kandidatenproteine auf eine mögliche Beteiligung bei der Entstehung der Resistenz hin zu überprüfen. Zusätzlich sollte die Sensibilität der KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden Zellen auf die beiden PARP-Inhibitoren 1,5-Isoquinolinediol (IQD) und Nu1025 evaluiert werden.

Für die Analyse standen drei NSCLC-Klonsätze mit Überexpression verschiedener KRAS-Varianten zur Verfügung. Mittels MTT-Assay konnte die Zellviabilität nach Behandlung mit ansteigenden Dosen von Cisplatin und PARP-Inhibitoren

untersucht werden. Die KRAS(G12C)cl2, KRAS(G12D)cl2, KRAS(G12V)cl9 (H1299.1), KRAS(G12C)cl4, KRAS(G12D)cl3 (H1299.2) und KRAS(G12V)cl1 (H2888) exprimierenden Zellen zeigten tatsächlich eine Resistenz gegen Cisplatin. Diese wurde im kollaborierenden Labor in Mailand für KRAS(G12C) in vitro und in vivo bestätigt. In den Experimenten mit den beiden PARP-Inhibitoren IQD und Nu1025 wiesen die KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden Zellen jedoch eine ähnliche Sensibilität auf wie der korrespondierende Wildtyp.

Die Bestimmung der DSB-Reparaturfrequenzen zeigte für alle drei KRAS-Mutationen im Vergleich zum Wildtyp eine signifikante Reduktion von Homologer Rekombination (HR), Single strand anealing (SSA), classic Non-homologous endjoining (cNHEJ) und Micro-homology mediated end-joining (MMEJ). Dies war eindeutig reproduzierbar für unabhängige KRAS(G12C) und KRAS(G12D) exprimierende Klone und für die Reaktionswege HR und cNHEJ.

Außerdem wurden Kandidatenproteine mit möglicher Bedeutung für das therapeutische NSCLC-Ansprechen anhand ihrer Kapazität und Dynamik an DNA-Schäden sogenannte Foci zu bilden, sowie ihrer Proteinspiegel in den Zellen beurteilt. Dabei wurde vor allem für die Mutationsvariante KRAS(G12C) eine signifikante Reduktion der γH2AX-, BRCA1- und 53BP1-Foci festgestellt. Die RPA-, FANCD2- und RAD51-Foci-Dynamiken und ebenso die Proteinspiegel von ERCC1, KU70, BRCA1 und 53BP1 waren in den Klonen überwiegend unauffällig. BACH1-, RAD52- und MLH1-Proteinmengen waren vor allem in KRAS(G12C)cl2 exprimierenden Zellen reduziert.

Insgesamt kann man festhalten, dass die Mechanismen der DSB-Reparatur nicht in die Resistenzentstehung involviert zu sein scheinen, sondern die Zellen offenbar auf alternative Reparaturwege oder Mechanismen zurückgreifen um die durch Cisplatin verursachte Läsion wieder zu entfernen. So konnten wir mit unseren Kollaborationspartnern in KRAS(G12C) exprimierenden Zellen beschleunigte BER und verminderte DSB-Akkumulation in Form von reduzierten γH2AX- und 53BP1-Foci identifizieren. Meine Ergebnisse zu einer generell in Mutanten-KRAS exprimierenden Zellen reduzierten HR könnten hingegen die erhöhte PARP-Inhibitor-Sensitivität erklären und bieten die Möglichkeit unter Einbeziehung von PARP-Inhibitoren neue Behandlungsschemata für NSCLC-Patienten zu evaluieren.

### 6 Literaturverzeichnis

- Akjüz N: Entwicklung und Applikation eines auf Fluoreszenzdetektion basierenden Test-Systems für DNA-Austausch-Ereignisse. Dissertation Dr. rer. nat., Universität Hamburg (2002)
- Akyüz, N, Boehden, GS, Süsse S, Rimek A, Preuss U, Scheidtmann K-H, Wiesmuller L: DNA Substrate Dependence of p53-Mediated Regulation of Double-Strand Break Repair. Mol Cell Biol 22: 6306–6317 (2002)
- Arora S, Kothandapani A, Tillison K, Kalman-Maltese V, Patrick SM: Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells. DNA repair 9: 745–753 (2010)
- Audebert M, Salles B, Calsou P: Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. J Biol Chem 279: 55117–55126 (2004)
- 5. Barnes DE, Lindahl T: Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. Annu Rev Genet 38: 445–476 (2004)
- Bennardo N, Cheng A, Huang N, Stark JM: Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair PLoS Genet 4: e1000110 (2008)
- Binks SP, Dobrota M: Kinetics and mechanism of uptake of platinum-based pharmaceuticals by the rat small intestine. Biochem Pharmacol 40: 1329– 1336 (1990)
- Blackwell LJ, Wang S, Modrich P: DNA chain length dependence of formation and dynamics of hMutSalpha.hMutLalpha.heteroduplex complexes. J Biol Chem 276: 33233–33240 (2001)
- Bogliolo M, Lyakhovich A, Callén E, Castellà M, Cappelli E, Ramírez MJ, Creus A, Marcos R, Kalb R, Neveling K, Schindler D, Surrallés J: Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability. EMBO J 26: 1340-1351 (2007)
- 10. Boudsocq F, Benaim P, Canitrot Y, Knibiehler M, Ausseil F, Capp JP, Bieth A, Long C, David B, Shevelev I, Frierich-Heinecken E, Hübscher U, Amalric

F,Massiot G, Hoffmann JS, Cazaux C: Modulation of cellular response to cisplatin by a novel inhibitor of DNA polymerase beta. Mol Pharmacol 67: 1485–1492 (2005)

- Bramson J, Panasci LC: Effect of ERCC-1 Overexpression on Sensitivity of Chinese Hamster Ovary Cells to DNA Damaging Agents. Cancer Res 53: 3237–3240 (1993)
- 12. Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, Einhorn E, Herlyn M, Minna J, Nicholson A, Roth JA, Albelda SM, Davies H, Cox C, Brignell G,Stephens P, Futreal PA, Wooster R, Stratton MR, Weber BL: BRAF and RAS Mutations in Human Lung Cancer and Melanoma. Cancer Res 62: 6997–7000 (2002)
- 13. Brozovic A, Osmak M: Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance. Cancer Lett 251: 1–16 (2007)
- 14.Bunn, JR: Chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: who, what, when, why? J Clin Oncol 20: 23-33 (2002)
- 15. Caiola E, Salles D, Frapolli R, Lupi M, Rotella G, Minoia C, Garassino MC, Mattschas N, Colavecchio S, Broggini M<sup>\*</sup>, Wiesmüller L, Marabese M: Base excision repair-mediated resistance to cisplatin in KRAS(G12C) mutant NSCLC cells. Oncotarget 6: 30072-30087 (2015)
- 16. Cantor SB, Bell DW, Ganesan S, Kass EM, Drapkin R, Grossman S, Wahrer DC, Sgroi DC, Lane WS, Haber DA, Livingston DM: BACH1, a Novel Helicase-like Protein, Interacts Directly with BRCA1 and Contributes to Its DNA Repair Function. Cell 105: 149–160 (2001)
- 17. Cantor S, Drapkin R, Zhang F, Lin Y, Han J, Pamidi S, Livingston DM: The BRCA1-associated protein BACH1 is a DNA helicase targeted by clinically relevant inactivating mutations. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 2357–2362 (2004)
- Chan DW, Chen BP-C, Prithivirajsingh S, Kurimasa A, Story MD, Qin J, Chen DJ: Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. Genes Dev 16: 2333–2338 (2002)

- Chayot R, Montagne B, Mazel D, Ricchetti M: An end-joining repair mechanism in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A 107: 2141–2146 (2010)
- 20. Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B: Mechanisms of human DNA repair. An update. Toxicology 193: 3–34 (2003)
- 21. Chu G: Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. J Biol Chem 269 (2): 787-90 (1994)
- 22. Chung DC, Rustgi AK: DNA mismatch repair and cancer. Gastroenterology 109: 1685–1699 (1995)
- 23. Ciccia A, Elledge SJ: The DNA damage response: making it safe to play with knives. Mol Cell 40: 179–204 (2010)
- 24. Corneo B, Wendland RL, Deriano L, Cui X, Klein IA, Wong SY, Arnal S, Holub AJ, Weller GR, Pancake BA, Shah S, Brandt VL, Meek K, Roth DB: Rag mutations reveal robust alternative end joining. Nature 449: 483–486 (2007)
- 25. Cosaert J, Quoix E: Platinum drugs in the treatment of non-small-cell lung cancer. Br J Cancer 87: 825–833 (2002)
- 26. Cruz-García A, López-Saavedra A, Huertas P: BRCA1 accelerates CtIPmediated DNA-end resection. Cell Rep 9: 451–459 (2014)
- 27. Cui X, Yu Y, Gupta S, Cho YM, Lees-Miller SP, Meek K: Autophosphorylation of DNA-dependent protein kinase regulates DNA end processing and may also alter double-strand break repair pathway choice. Mol Cell Biol 25: 10842–10852 (2005)
- Davar D, H. Beumer J, Hamieh L, Tawbi H: Role of PARP Inhibitors in Cancer Biology and Therapy. Curr Med Chem 19: 3907–3921 (2012)
- 29. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri

G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA: Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature 417: 949-954 (2002)

- 30. Deng Y, Guo X, Ferguson DO, Chang S: Multiple roles for MRE11 at uncapped telomeres. Nature 460: 914–918 (2009)
- 31. Deriano L, Roth D: Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage. Annu Rev Genet 47: 433– 455 (2013)
- 32. Dimitrova N, Chen Y-CM, Spector DL, Lange T de: 53BP1 promotes nonhomologous end joining of telomeres by increasing chromatin mobility. Nature 456: 524–528 (2008)
- 33. Dohrn L, Salles D, Siehler SY, Kaufmann J, Wiesmüller L: BRCA1-mediated repression of mutagenic end-joining of DNA double-strand breaks requires complex formation with BACH1. Biochem J 441: 919–926 (2012)
- 34. Doll R, Hill AB: Smoking and carcinoma of the lung. Preliminary report. Br Med J: 739-748 (1950)
- 35. Downs JA, Jackson SP: A means to a DNA end: the many roles of Ku. In Nature reviews. Mol Cell Biol 5: 367–378 (2004)
- 36. Duckett DR, Drummond JT, Murchie AI, Reardon JT, Sancar A, Lilley DM, Modrich P: Human MutSalpha recognizes damaged DNA base pairs containing O6-methylguanine, O4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 6443–6447 (1996)
- Ferry KV, Hamilton TC, Johnson SW: Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells. Biochem Pharmacol 60: 1305–1313 (2000)
- 38. Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenni B, Nehmé A, Christen RD, Howell SB: The Role of DNA Mismatch Repair in Platinum Drug Resistance. Cancer Res 56: 4881–4886 (1996)
- 39. Fragkos M, Ganier O, Coulombe P, Méchali M: DNA replication origin activation in space and time. Nat Rev Mol Cell Biol 16: 360–374 (2015)

- 40. Friboulet L, Olaussen KA, Pignon J-P, Shepherd FA, Tsao M-S, Graziano S, Kratzke R, Douillard JY, Seymour L, Pirker R, Filipits M, André F, Solary E, Ponsonnailles F, Robin A, Stoclin A, Dorvault N, Commo F, Adam J, Vanhecke E, Saulnier P, Thomale J, Le Chevalier T, Dunant A, Rousseau V, Le Teuff G, Brambilla E, Soria JC: ERCC1 isoform expression and DNA repair in non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 368: 1101–1110 (2013a)
- 41. Friboulet L, Postel-Vinay S, Sourisseau T, Adam J, Stoclin A, Ponsonnailles F, Dorvault N, Commo F, Saulnier P, Salome-Desmoulez S, Pottier G, André F,Kroemer G, Soria JC, Olaussen KA: ERCC1 function in nuclear excision and interstrand crosslink repair pathways is mediated exclusively by the ERCC1-202 isoform. Cell cycle 12: 3298–3306 (2013b)
- 42. Galande S, Kohwi-Shigematsu T: Poly(ADP-ribose) Polymerase and Ku Autoantigen Form a Complex and Synergistically Bind to Matrix Attachment Sequences. J Biol Chem 274: 20521–20528 (1999)
- 43. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G: Molecular mechanisms of cisplatin resistance. Oncogene 31: 1869–1883 (2012)
- 44. Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, Grompe M, D'Andrea AD: Interaction of the Fanconi Anemia Proteins and BRCA1 in a Common Pathway. Mol Cell 7: 249–262 (2001)
- 45.Garnett MJ, Marais R: Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. Cancer Cell 6: 313–319 (2004)
- 46. Giaccone G: Clinical Perspectives on Platinum Resistance. Drugs 59: 9–17 (2000)
- 47. Gillet LCJ, Schärer OD: Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. Chem Rev 106: 253–276 (2006)
- 48. Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M, Branscheid D, Flentje M, Griesinger F, Niederle N, Stuschke M, Blum T, Deppermann K-M, Ficker J-H, Freitag L, Lübbe AS, Reinhold T, Späth-Schwalbe E, Ukena D, Wickert M, Wolf M, Andreas S, Auberger T, Baum RP, Baysal B, Beuth J, Bickeböller H, Böcking A, Bohle RM, Brüske I, Burghuber O, Dickgreber N, Diederich S, Dienemann H, Eberhardt W, Eggeling S, Fink T, Fischer B, Franke M, Friedel G, Gauler

T, Gütz S, Hautmann H, Hellmann A, Hellwig D, Herth F, Heußel CP, Hilbe W, Hoffmeyer F, Horneber M, Huber RM, Hübner J, Kauczor HU, Kirchbacher K, Kirsten D, Kraus T, Lang SM, Martens U, Mohn-Staudner A, Müller KM, Müller-Nordhorn J, Nowak D, Ochmann U, Passlick B, Petersen I, Pirker R, Pokrajac B, Reck M, Riha S, Rübe C, Schmittel A, Schönfeld N, Schütte W, Serke M, Stamatis G, Steingräber M, Steins M, Stoelben E, Swoboda L, Teschler H, Tessen HW, Weber M, Werner A, Wichmann HE, Irlinger Wimmer E, Witt C, Worth H: Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. Pneumologie 64: e1-164 (2010)

- 49. Gravel S, Chapman JR, Magill C, Jackson SP: DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. Genes Dev 22: 2767–2772 (2008)
- 50. Hanada K, Budzowska M, Modesti M, Maas A, Wyman C, Essers J, Kanaar R: The structure-specific endonuclease Mus81-Eme1 promotes conversion of interstrand DNA crosslinks into double-strands breaks. EMBO J 25: 4921– 4932 (2006)
- 51. Harper JW, Elledge SJ: The DNA damage response: ten years after. Mol Cell 28: 739–745 (2007)
- 52. Hartlerode AJ, Scully R: Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. Biochem J 423: 157–168 (2009)
- 53. Hoege C, Pfander B, Moldovan G-L, Pyrowolakis G, Jentsch S: RAD6dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. Nature 419: 135–141 (2002)
- 54. Hoeijmakers JH: Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature 411: 366-374 (2001)
- 55. Hu H-Y, Horton JK, Gryk MR, Prasad R, Naron JM, Sun D-A, Hecht SM, Wilson SH, Mullen GP: Identification of small molecule synthetic inhibitors of DNA polymerase beta by NMR chemical shift mapping. J Biol Chem 279: 39736–39744 (2004)
- 56. Hussain S, Wilson JB, Medhurst AL, Hejna J, Witt E, Ananth S, Davies A, Masson JY, Moses R, West SC, de Winter JP, Ashworth A, Jones

NJ, Mathew CG: Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways. Hum Mol Genet 13: 1241–1248 (2004)

- 57. Ilina ES, Lavrik OI, Khodyreva SN: Ku antigen interacts with abasic sites. Biochim Biophys Acta 1784: 1777–1785 (2008)
- 58. Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Nomura K, Ninomiya H, Okui M, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Soda M, Choi YL, Niki T, Mano H, Ishikawa Y: EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers. J Thorac Oncol 3: 13–17 (2008)
- 59. Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I: Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 14298–14302 (2002)
- 60. Jackson SP, Bartek J: The DNA-damage response in human biology and disease. Nature 461: 1071–1078 (2009)
- 61. Jamieson ER, Lippard SJ: Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts. Chem Rev 99: 2467–2498 (1999)
- 62. Jett JR, Schild SE, Keith RL, Kesler KA: Treatment of non-small cell lung cancer, stage IIIB: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). Chest 132: 266S-276S (2007)
- 63. Jiricny J: The multifaceted mismatch-repair system. Nat Rev Mol Cell Biol 7: 335–346 (2006)
- 64. Johnson SW, Perez RP, Godwin AK, Yeung AT, Handel LM, Ozols RF, Hamilton TC: Role of platinum-DNA adduct formation and removal in cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines. Biochem Pharmacol 47: 689– 697 (1994)
- 65. Kadyrov FA, Dzantiev L, Constantin N, Modrich P: Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair. Cell 126: 297–308 (2006)
- 66. Kasahara K, Fujiwara Y, Nishio K, Ohmori T, Sugimoto Y, Komiya K, Matsuda T, Saijo N: Metallothionein Content Correlates with the Sensitivity of Human Small Cell Lung Cancer Cell Lines to Cisplatin. Cancer Res 51: 3237–3242 (1991)

- 67. Khanna KK, Jackson SP: DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. Nat Genet 27: 247–254 (2001)
- 68. Köberle B, Payne J, Grimaldi KA, Hartley JA, Masters JRW: DNA Repair in Cisplatin-Sensitive and Resistant Human Cell Lines Measured in Specific Genes by Quantitative Polymerase Chain Reaction. Biochem Pharmacol 52: 1729–1734 (1996)
- 69. Köberle B, Grimaldi KA, Sunters A, Hartley JA, Kelland LR, Masters JRW: DNA Repair capacity and cisplatin sensitivity of human testis tumour cells. Int J Cancer 70: 551–555 (1997)
- 70. Köberle B, Tomicic MT, Usanova S, Kaina B: Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. Biochim Biophys Acta 1806: 172–182 (2010)
- 71. Krokan HE, Bjørås M: Base excision repair. Cold Spring Harb Perspect Biol5: a012583 (2013)
- 72. Laemmli UK: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227: 680-685 (1970)
- 73.Li H, Marple T, Hasty P: Ku80-deleted cells are defective at base excision repair. Mutat Res 745-746: 16–25 (2013)
- 74. Lindahl T: Quality Control by DNA Repair. Science 286: 1897–1905 (1999)
- 75. Mahaney BL, Meek K, Lees-Miller SP: Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. Biochem J 417: 639–650 (2009)
- 76. Marti TM, Kunz C, Fleck O: DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. J Cell Physiol 191: 28–41 (2002)
- 77. Meetei AR, de Winter JP, Medhurst AL, Wallisch M, Waisfisz Q, van de Vrugt HJ, Oostra AB, Yan Z, Ling C, Bishop CE, Hoatlin ME, Joenje H, Wang W: A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. Nat Genet 35: 165–170 (2003)
- 78. Mello JA, Acharya S, Fishel R, Essigmann JM: The mismatch-repair protein hMSH2 binds selectively to DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. Chem Biol 3: 579–589 (1996)

- 79. Michels J, Vitale I, Galluzzi L, Adam J, Olaussen KA, Kepp O, Senovilla L, Talhaoui I, Guegan J, Enot DP, Talbot M, Robin A, Girard P, Oréar C, Lissa D, Sukkurwala AQ, Garcia P, Behnam-Motlagh P, Kohno K, Wu GS, Brenner C, Dessen P, Saparbaev M, Soria JC, Castedo M, Kroemer G: Cisplatin resistance associated with PARP hyperactivation. Cancer Res 73: 2271–2280 (2013a)
- 80. Michels J, Vitale I, Senovilla L, Enot DP, Garcia P, Lissa D, Olaussen KA, Brenner C, Soria JC, Castedo M, Kroemer G: Synergistic interaction between cisplatin and PARP inhibitors in non-small cell lung cancer. Cell Cycle 12: 877–883 (2013b)
- 81. Mimitou EP, Symington LS: Ku prevents Exo1 and Sgs1-dependent resection of DNA ends in the absence of a functional MRX complex or Sae2. EMBO J 29: 3358–3369 (2010)
- 82. Mitin N, Rossman KL, Der, CJ: Signaling interplay in Ras superfamily function. Curr Biol 15: R563-74 (2005)
- 83. Moldovan G-L, Pfander B, Jentsch S: PCNA, the maestro of the replication fork. Cell 129: 665–679 (2007)
- 84. Moldovan G-L, D'Andrea AD: How the fanconi anemia pathway guards the genome. Annu Rev Genet 43: 223–249 (2009)
- 85. Motycka TA, Bessho T, Post SM, Sung P, Tomkinson AE: Physical and functional interaction between the XPF/ERCC1 endonuclease and hRad52. J Biol Chem 279: 13634–13639 (2004)
- 86. Niedernhofer LJ, Lalai AS, Hoeijmakers JHJ: Fanconi anemia (cross)linked to DNA repair. Cell 123: 1191–1198 (2005)
- 87. Nijman SMB: Synthetic lethality: general principles, utility and detection using genetic screens in human cells. FEBS Lett 585: 1–6 (2011)
- 88. Nimonkar AV, Ozsoy AZ, Genschel J, Modrich P, Kowalczykowski SC: Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 16906–16911 (2008)
- 89. Nimonkar AV, Genschel J, Kinoshita E, Polaczek P, Campbell JL, Wyman C, Modrich P, Kowalczykowski SC: BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-

RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. Genes Dev 25: 350–362 (2011)

- 90. Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, André F, Haddad V, Taranchon E, Filipits M, Pirker R, Popper HH, Stahel R, Sabatier L, Pignon JP, Tursz T, Le Chevalier T, Soria JC: DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. N Engl J Med 355: 983–991 (2006)
- 91. Olaussen KA, Adam J, Vanhecke E, Vielh P, Pirker R, Friboulet L, Popper H, Robin A, Commo F, Thomale J, Kayitalire L, Filipits M, Le Chevalier T, André F, Brambilla E, Soria JC: PARP1 impact on DNA repair of platinum adducts: preclinical and clinical read-outs. Lung cancer 80: 216–222 (2013)
- 92. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M: EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. Science 304: 1497–1500 (2004)
- 93. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H: EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 13306–13311 (2004)
- 94. Park MS, Ludwig DL, Stigger E, Lee S-H: Physical Interaction between Human RAD52 and RPA Is Required for Homologous Recombination in Mammalian Cells. J Biol Chem 271: 18996–19000 (1996)
- 95. Postel-Vinay S, Bajrami I, Friboulet L, Elliott R, Fontebasso Y, Dorvault N, Olaussen KA, André F, Soria JC, Lord CJ, Ashworth A: A high-throughput screen identifies PARP1/2 inhibitors as a potential therapy for ERCC1-deficient non-small cell lung cancer. Oncogene 32: 5377–5387 (2013)
- 96. Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D: RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. Nat Rev Cancer 11: 761–774 (2011)
- 97. Räschle M, Knipscheer P, Enoiu M, Angelov T, Sun J, Griffith JD, Ellenberger TE, Schärer OD, Walter JC: Mechanism of replication-coupled DNA interstrand crosslink repair. Cell 134: 969–980 (2008)

- 98. Rich T, Allen RL, Wyllie AH: Defying death after DNA damage. Nature 407:777-783 (2000)
- 99. Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, Marks J, Li A, Chitale DA, Nafa K, Riedel ER, Hsu M, Pao W, Miller VA, Ladanyi M: Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. Clin Cancer Res 14: 5731–5734 (2008)
- Robinson LA, Ruckdeschel JC, Wagner H, Stevens CW: Treatment of non-small cell lung cancer-stage IIIA: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). Chest 132: 243S-265S (2007)
- 101. Rosa S, Fortini P, Karran P, Bignami M, Dogliotti E: Processing in vitro of an abasic site reacted with methoxyamine: a new assay for the detection of abasic sites formed in vivo. Nucleic Acids Res 19: 5569–5574 (1991)
- Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M: Pathways of DNA Double-Starnd Break Repair during the Mammalian Cell Cycle. Mol Cell Biol 23: 5706-5715 (2003)
- 103. Rouet P, Smih F, Jasin M: Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease.
   Mol Cell Biol 14: 8096–8106 (1994)
- 104. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S: Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. Annu Rev Biochem 73: 39–85 (2004)
- Scheffzek K: The Ras-RasGAP Complex. Structural Basis for GTPase Activation and Its Loss in Oncogenic Ras Mutants. Science 277: 333–338 (1997)
- 106. Schreiber V, Dantzer F, Ame J-C, de Murcia G: Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. Nat Rev Mol Cell Biol 7: 517–528 (2006)
- 107. Scott WJ, Howington J, Feigenberg S, Movsas B, Pisters K: Treatment of non-small cell lung cancer stage I and stage II: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). Chest 132: 234S-242S (2007)
- 108. Shachar S, Ziv O, Avkin S, Adar S, Wittschieben J, Reissner T, Chaney S, Friedberg EC, Wang Z, Carell T, Geacintov N, Livneh Z: Two-

polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals. EMBO J 28: 383–393 (2009)

- 109. Sharma S, Javadekar SM, Pandey M, Srivastava M, Kumari R, Raghavan SC: Homology and enzymatic requirements of microhomologydependent alternative end joining. Cell Death Dis 6: e1697 (2015)
- 110. Shiao T-H, Chang Y-L, Yu C-J, Chang Y-C, Hsu Y-C, Chang S-H, Shih JY, Yang PC: Epidermal growth factor receptor mutations in small cell lung cancer: a brief report. J Thorac Oncol 6: 195–198 (2011)
- Siddik ZH: Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. Oncogene 22: 7265–7279 (2003)
- 112. De Silva IU, McHugh PJ, Clingen PH, Hartley JA: Defining the Roles of Nucleotide Excision Repair and Recombination in the Repair of DNA Interstrand Cross-Links in Mammalian Cells. Mol Cell Biol 20: 7980–7990 (2000)
- 113. Simsek D, Brunet E, Wong SY-W, Katyal S, Gao Y, McKinnon PJ, Lou J, Zhang L, Li J, Rebar EJ, Gregory PD, Holmes MC, Jasin M: DNA ligase III promotes alternative nonhomologous end-joining during chromosomal translocation formation. PLoS Genet 7: e1002080 (2011)
- 114. Socinski MA, Morris DE, Masters GA, Lilenbaum R: Chemotherapeutic Management of Stage IV Non-small Cell Lung Cancer. Chest 123: 226S-243S (2003)
- 115. Socinski MA, Crowell R, Hensing TE, Langer CJ, Lilenbaum R, Sandler AB, Morris D: Treatment of non-small cell lung cancer, stage IV: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). Chest 132: 277S-289S (2007)
- 116. Solomon BJ, Mok T, Kim D-W, Wu Y-L, Nakagawa K, Mekhail T, Felip E, Cappuzzo F, Paolini J, Usari T, Iyer S, Reisman A, Wilner KD, Tursi J, Blackhall F: First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. N Engl J Med 371: 2167–2177 (2014)

- 117. Sonnenblick A, de Azambuja E, Azim HA, Piccart M: An update on PARP inhibitors--moving to the adjuvant setting. Nature Rev Clin Oncol 12: 27–41 (2015)
- Stasiak AZ, Larquet E, Stasiak A, Müller S, Engel A, van Dyck E, West
  SC, Egelman EH: The human Rad52 protein exists as a heptameric ring.
  Curr Biol 10: 337–340 (2000)
- 119. Sun Y, Ren Y, Fang Z, Li C, Fang R, Gao B, Han X, Tian W, Pao W, Chen H, Ji H: Lung adenocarcinoma from East Asian never-smokers is a disease largely defined by targetable oncogenic mutant kinases. J Clin Oncol: 4616–4620 (2010)
- Sung P, Klein H: Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. Nat Rev Mol Cell Biol 7: 739–750 (2006)
- 121. Takahashi T, Sonobe M, Kobayashi M, Yoshizawa A, Menju T, Nakayama E, Mino N, Iwakiri S, Sato K, Miyahara R, Okubo K, Manabe T, Date H: Clinicopathologic features of non-small-cell lung cancer with EML4-ALK fusion gene. Ann Surg Oncol 17: 889–897 (2010)
- 122. Thompson LH, Hinz JM: Cellular and molecular consequences of defective Fanconi anemia proteins in replication-coupled DNA repair: mechanistic insights. Mutat Res 668: 54–72 (2009)
- 123. Topping RP, Wilkinson JC, Drotschmann Scarpinato K: Mismatch repair protein deficiency compromises cisplatin-induced apoptotic signaling. J Biol Chem 284: 14029–14039 (2009)
- 124. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A 76: 4350–4354 (1997)
- Tsvetkova E, Goss GD: Drug resistance and its significance for treatment decisions in non-small-cell lung cancer. Curr Oncol 19: S45-51 (2012)

- 126. Vaisman A: The Efficiency and Fidelity of Translesion Synthesis past Cisplatin and Oxaliplatin GpG Adducts by Human DNA Polymerase beta. J Biol Chem 275: 13017–13025 (2000)
- 127. Vasan N, Boyer JL, Herbst RS: A RAS renaissance: emerging targeted therapies for KRAS-mutated non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 20: 3921–3930 (2014)
- 128. Walker JR, Corpina RA, Goldberg J: Structure of the Ku heterodimer
  bound to DNA and its implications for double-strand break repair. Nature 412:
  607–614 (2001)
- 129. Wallace SS: Base excision repair: a critical player in many games.DNA Repair (Amst) 19: 14–26 (2014)
- 130. Wang D, Lippard SJ: Cellular processing of platinum anticancer drugs.Nat Rev Drug Discov 4: 307–320 (2005)
- 131. Wennerberg K: The Ras superfamily at a glance. J Cell Sci 118: 843– 846 (2005)
- 132. West SC: Molecular views of recombination proteins and their control.Nat Rev Mol Cell Biol 4: 435–445 (2003)
- 133. De Winter JP, Joenje H: The genetic and molecular basis of Fanconi anemia. Mutat Res 668: 11–19 (2009)
- 134. Winton T, Livingston R, Johnson D, Rigas J, Johnston M, Butts C, Cormier Y, Goss G, Inculet R, Vallieres E, Fry W, Bethune D, Ayoub J, Ding K, Seymour L,Graham B, Tsao MS, Gandara D, Kesler K, Demmy T, Shepherd F: Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected nonsmall-cell lung cancer. N Engl J Med 352: 2589–2597 (2005)
- 135. Wislez M, Barlesi F, Besse B, Mazières J, Merle P, Cadranel J, Audigier-Valette C, Moro-Sibilot D, Gautier-Felizot L, Goupil F, Renault A, Quoix E, Souquet PJ,Madroszyck A, Corre R, Pérol D, Morin F, Zalcman G, Soria JC: Customized adjuvant phase II trial in patients with non-small-cell lung cancer: IFCT-0801 TASTE. J Clin Oncol 32: 1256–1261 (2014)
- Wood RD: Nucleotide Excision Repair in Mammalian Cells. J Biol Chem 272: 23465–23468 (1997)

- 137. Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T: Human DNA repair genes. Science 291: 1284–1289 (2001)
- Xia B, Sheng Q, Nakanishi K, Ohashi A, Wu J, Christ N, Liu X, Jasin M, Couch FJ, Livingston DM: Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. Mol Cell 22: 719–729 (2006)
- 139. Xue W, Dahlman JE, Tammela T, Khan OF, Sood S, Dave A, Cai W, Chirino LM, Yang GR, Bronson R, Crowley DG, Sahay G, Schroeder A,Langer R, Anderson DG, Jacks T: Small RNA combination therapy for lung cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 111: E3553-61 (2014)
- 140. Yan CT, Boboila C, Souza EK, Franco S, Hickernell TR, Murphy M, Gumaste S, Geyer M, Zarrin AA, Manis JP, Rajewsky K, Alt FW: IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. Nature 449: 478–482 (2007)
- 141. Yang H, Jeffrey PD, Miller J, Kinnucan E, Sun Y, Thoma NH, Zheng N, Chen PL, Lee WH, Pavletich NP: BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. Science 297: 1837–1848 (2002)
- 142. Yang P, Ebbert JO, Sun Z, Weinshilboum RM: Role of the glutathione metabolic pathway in lung cancer treatment and prognosis: a review. J Clin Oncol 24: 1761–1769 (2006)
- 143. Yang X, Zheng F, Xing H, Gao Q, Wei W, Lu Y, Wang S, Zhou J, Hu W, Ma D: Resistance to chemotherapy-induced apoptosis via decreased caspase-3 activity and overexpression of antiapoptotic proteins in ovarian cancer. J Cancer Res Clin Oncol 130: 423–428 (2004)
- 144. Yap TA, Sandhu SK, Carden CP, de Bono JS: Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors: Exploiting a synthetic lethal strategy in the clinic. CA Cancer J Clin 61: 31–49 (2011)
- 145. Yarnell AT, Oh S, Reinberg D, Lippard SJ: Interaction of FACT, SSRP1, and the high mobility group (HMG) domain of SSRP1 with DNA damaged by the anticancer drug cisplatin. J Biol Chem 276: 25736–25741 (2001)

- 146. Yoo S: Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end. Recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. Nucleic Acids Res 27: 4679–4686 (1999)
- 147. Yoshizawa K, Nozaki S, Kitahara H, Ohara T, Kato K, Kawashiri S, Yamamoto E: Copper efflux transporter (ATP7B) contributes to the acquisition of cisplatin-resistance in human oral squamous cell lines. Oncol Rep: 987-991 (2007)
- Yun MH, Hiom K: CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA doublestrand-break repair pathway throughout the cell cycle. Nature 459: 460–463 (2009)
- 149. Zhu Z, Chung W-H, Shim EY, Lee SE, Ira G: Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. Cell 134: 981–994 (2008)

## 7 Anhang



Abbildung 27: Übersicht über die BER ("Originally published in Annual Review of Genetics, Vol.38, Deborah E. Barnes, Tomas Lindahl, Repair and Genetic Consequences of Endogenous DNA Base Damage in Mammalian Cells, 445-476, (2004)").

**Hauptweg.** Entspricht dem Short-patch gap filling. Nach Entfernung der beschädigten Base durch eine spezialisierte Glykosylase wird die entstandene abasische Stelle (AP-site) durch APE1 erkannt und eingeschnitten. Die Polymerase  $\beta$  füllt die Lücke und trennt den verbleibenden Zucker-Phosphat-Rest ab. Zuletzt wird die Kontinuität der DNA durch den DNA-Ligase III-XRCC1-Komplex wieder hergestellt.

**Nebenweg.** Entspricht Long-patch gap filling. Nach dem Einschneiden der abasischen Stelle (AP-site) durch APE1, wird ein längerer Abschnitt durch die Polymerase  $\delta$  ersetzt. Der abstehende DNA-Rest wird durch FEN1 entfernt und die DNA schließlich durch die DNA-Ligase I verbunden.

Klon	IC50	Klonsatz
KRAS(wt)cl4	10 µM	H1299.1
KRAS(G12C)cl2	22 µM	H1299.1
KRAS(G12D)cl2	28 µM	H1299.1
KRAS(G12V)cl9	19 µM	H1299.1
KRAS(wt)cl11	48 μM (48h) 22 μM (72h)	H1299.2
KRAS(G12C)cl4	48 μM (48h) 56 μM (72h)	H1299.2
KRAS(G12D)cl3	284 µM (48h) 159 µM (72h)	H1299.2
KRAS(G12V)cl22	30 μM (48h) 25 μM (72h)	H1299.2
KRAS(wt)cl4	3 μΜ	H2888
KRAS(G12C)cl1	2 μΜ	H2888
KRAS(G12V)cl1	7 μΜ	H2888

Tabelle 8: IC50-Werte der KRAS-Mutanten-Protein und Wildtyp-KRAS exprimierenden Zellender Klonsätze H1299.1, H1299.2 und H2888 unter Cisplatinbehandlung.

Tabelle 9: p-Werte und Signifikanzen der IC50-Werte der KRAS-Mutanten-Proteinexprimierenden Zellen im Vergleich zu den IC50-Werten der korrespondierenden Wildtyp-KRAS exprimierenden Zellen unter Cisplatinbehandlung.

\* = p<0,05, \*\* = p<0,01, \*\*\* = p<0,001, \*\*\*\* = p<0,0001, ns = nicht signifikant.

Vergleich	p-Wert	Signifikanz
KRAS(wt)cl4 – KRAS(G12C)cl2	0,0023	**
KRAS(wt)cl4 – KRAS(G12D)cl2	< 0,0001	****
KRAS(wt)cl4 – KRAS(G12V)cl9	0,0059	**
KRAS(wt)cl11 – KRAS(G12C)cl4	0,0132	*
KRAS(wt)cl11 – KRAS(G12D)cl3	< 0,0001	****
KRAS(wt)cl11 – KRAS(G12V)cl22	0,5877	ns
KRAS(wt)cl4 – KRAS(G12C)cl1	0,5655	ns
KRAS(wt)cl4 – KRAS(G12V)cl1	0,0039	**

Klon	IC50 (IQD)	IC50 (Nu1025)	Klonsatz
KRAS(wt)cl4	53 µM	852 μM	H1299.1
KRAS(G12C)cl2	62 µM	684 µM	H1299.1
KRAS(G12D)cl2	48 µM	524 µM	H1299.1
KRAS(G12V)cl9	46 µM	472 µM	H1299.1
KRAS(wt)cl11	70 µM	826 µM	H1299.2
KRAS(G12C)cl4	57 µM	625 µM	H1299.2
KRAS(G12D)cl3	121 µM	910 µM	H1299.2
KRAS(G12V)cl22	40 µM	992 µM	H1299.2

Tabelle 10: IC50-Werte der KRAS-Mutanten-Protein und Wildtyp-KRAS exprimierenden Zellender Klonsätze H1299.1 und H1299.2 unter Behandlung mit IQD beziehungsweise Nu1025.

Tabelle 11: p-Werte und Signifikanzen der IC50-Werte der KRAS-Mutanten-Protein exprimierenden Zellen im Vergleich zu den IC50-Werten der korrespondierenden Wildtyp-KRAS exprimierenden Zellen unter Behandlung mit IQD beziehungsweise Nu1025.

Vergleich	p-Wert (IQD)	Signifikanz (IQD)	p-Wert (Nu1025)	Signifikanz
				(Nu1025)
KRAS(wt)cl4 –	0,506	ns	0,1388	ns
KRAS(G12C)cl2				
KRAS(wt)cl4 –	0,62	ns	0,0012	**
KRAS(G12D)cl2				
KRAS(wt)cl4 –	0,4778	ns	0,0001	***
KRAS(G12V)cl9				
KRAS(wt)cl11 –	0,5419	ns	0,0343	*
KRAS(G12C)cl4				
KRAS(wt)cl11 -	0,1104	ns	0,4569	ns
KRAS(G12D)cl3				
KRAS(wt)cl11 -	0,0096	**	0,2348	ns
KRAS(G12V)cl22				

\* = p<0,05, \*\* = p<0,01, \*\*\* = p<0,001, \*\*\*\* = p<0,0001, ns = nicht signifikant.

Tabelle 12: Sensibilität der einzelnen Mutanten-KRAS exprimierenden Klone auf Cisplatin, sowie IQD und Nu1025.

 $\downarrow$  = Abnahme, ↑ = Zunahme, - = kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp. \* = p<0,05, \*\* = p<0,01, \*\*\*\* = p<0,001, \*\*\*\* = p<0,0001.

Klon	Cisplatin	IQD	Nu1025
KRAS(wt)cl4	-	-	-
KRAS(G12C)cl2	↓ (**)	-	-
KRAS(G12D)cl2	↓ (****)	-	↑ (**)
KRAS(G12V)cl9	↓ (**)	-	↑ (***)
KRAS(wt)cl11	-	-	-
KRAS(G12C)cl4	↓ (*)	-	↑ (*)
KRAS(G12D)cl3	↓ (****)	-	-
KRAS(G12V)cl22	-	↑ (**)	-
KRAS(wt)cl4	-	Nicht untersucht	Nicht untersucht
KRAS(G12C)cl1	-	Nicht untersucht	Nicht untersucht
KRAS(G12V)cl1	↓ (**)	Nicht untersucht	Nicht untersucht

## Tabelle 13: Übersicht über alle Ergebnisse aufgeschlüsselt nach den drei Mutationsvarianten KRAS(G12C), KRAS(G12D) und KRAS(G12V).

↓ = Abnahme, ↑ = Zunahme, - = kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp. Für die Rekombinationsfrequenz entspricht die erste Angabe dem Klonsatz H1299.1, die zweite dem Klonsatz H1299.2, Foci-Bildung und Proteinmengen wurden nur für den Klonsatz H1299.1 bestimmt.

	KRAS(G12C)	KRAS(G12D)	KRAS(G12V)
Rekombinationsfrequenz			
HR	$\downarrow/\downarrow$	$\downarrow/\downarrow$	$\downarrow/\uparrow$
SSA	↓/-	$\downarrow / \downarrow$	↓/↑
cNHEJ	$\downarrow/\downarrow$	$\downarrow/\downarrow$	↓/↑
MMEJ	↓/-	$\downarrow/\downarrow$	↓/↑
Foci-Bildung			
BRCA1	Ļ	-	-
RAD51	-	-	-
53BP1	Ļ	-	-
FANCD2	-	-	↑ (
RPA	-	-	-
γΗ2ΑΧ	$\downarrow$	$\downarrow$	Ļ
Proteinmengen			
(anbehandelte Zellen)			
BRCA1	-	-	-
RAD52	$\downarrow$	-	Ļ
BACH1	$\downarrow$	$\downarrow$	-
53BP1	-	-	-
KU70	-	-	-
ERCC1	-	-	-
MLH1	$\downarrow$	-	-
PCNA	-	-	-

## Danksagung

Zu aller erst möchte ich mich bei Frau Prof. Wiesmüller für die umfassende und engagierte Betreuung meiner Arbeit bedanken. Vor allem während des experimentellen Teils waren Sie eine große Unterstützung!

Besonderer Dank gilt Dr. Daniela Salles und Sarah Kostezka, die mich beide mit viel Geduld eingearbeitet haben. Dani, dir möchte ich außerdem für die ständige Bereitschaft danken, dich mit mir gemeinsam mit meinem Thema auseinanderzusetzen und es immer wieder neu zu diskutieren. Du hast mir die Wissenschaft nahe gebracht und mich ermutigt sie für mich zu entdecken! Sarah, dir möchte ich dafür danken, dass du mir bei meiner Laborarbeit so eine große Hilfe warst.

Vielen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe für die offenen Ohren und die gemeinsamen Mittagessen. Ich hatte eine wirklich schöne Zeit bei euch.

Ein ganz liebes Dankeschön auch an Kathi, die meine überschießende Motivation beim Kommasetzen korrigiert hat.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken. Für eure Unterstützung und dafür, dass ihr immer da seid, wenn ich euch brauche. Ohne euch hätte ich diese Arbeit nicht schreiben können.
## Lebenslauf

1991

Geburt in München

1997-2000

Besuch der Bønes Skole, Bergen, Norwegen

2000-2001 Besuch der Söckinger Grundschule, Starnberg

**2001-2010** Besuch des Gymnasium Starnberg

2007 Besuch des Liceo scientifico E. Fermi, Bagnara Calabra, Italien

10/2010-11/2017 Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm

**10/2014-02/2015** Erasmus-Semester an der Universitá Campus Bio-Medico di Roma, Rom, Italien

03/2014-12/2017 Erstellen der vorliegenden Arbeit Sektion Gynäkologische Onkologie Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Universitätsklinikum Ulm