



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

Laboratory of Radiobiology &
Experimental Radiooncology
Prof. Dr. Kai Rothkamp
Head of Laboratory

Abschlussbericht zum medizinischen Doktorandenprojekt im Bereich der Krebsforschung

Die Rolle von Tumorstammzellen für die Strahlenresistenz des Triple-
negativen Mammakarzinoms

Stipendiatin

Anna-Maria Engel

Jesuitengasse 12

86152 Augsburg

Telefon: +4917638752002

E-mail: anna-maria.engel@gmx.de

AG Homologe Rekombination und Genomische Instabilität

Prof. Dr. Kerstin Borgmann (AG Leitung)

Labor für Strahlenbiologie & Experimentelle Radiooncologie

Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiooncologie

Onkologisches Zentrum

Campus Forschung, N27

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Martinistraße 52

20246 Hamburg

Telefon: 040 74105 3596

Telefax: 040 74105 5139,

E-mail: borgmann@uke.de

Die Strahlentherapie ist neben der Operation und der Chemotherapie eine wichtige Säule der Tumorthherapie. Trotz ständiger Weiterentwicklung und zunehmender Behandlungserfolge kommt es zu Resistenzen. Dies führt zur Bildung von Lokal- und Fernrezidiven. Ein Grund dafür sind strahlenresistente Tumorstammzellen (*Cancer Stem Cells*, CSC). Deren erhöhte Strahlenresistenz wird vor allem auf eine verstärkte Aktivierung der DNA-Schadensantwort mit effektiveren DNA-Reparaturprozessen zurückgeführt. Ein genaues Verständnis der molekularen Mechanismen, die zur Strahlenresistenz von CSC beitragen, könnte neue Therapieoptionen bei der Behandlung des rezidivierenden Mammakarzinoms eröffnen.

Für die Untersuchung strahlenresistenz-vermittelnder Mechanismen wurden aus vier Mammakarzinomzelllinien durch wiederholte Bestrahlungen (10x4Gy) radioresistente Klone hergestellt. Diese zeigten einen signifikant höheren Anteil ALDH1-positiver CSC und ein signifikant höheres Überleben nach Bestrahlung im Vergleich zu ihren Ursprungszelllinien. Um zu untersuchen, ob die Strahlenresistenz auf eine verbesserte DNA-Reparatur zurückzuführen war, wurde die Anzahl residueller DNA-Doppelstrangbrüche nach Bestrahlung bestimmt. Dabei mittels Hinzugabe des Basenanalogs EdU zwischen proliferierenden (S-Phase-Zellen) und ruhenden Zellen unterschieden. Tatsächlich zeigten die radioresistenten Klone eine generell signifikant geringere Anzahl residueller DNA-DSBs als ihre Ursprungszelllinien. Diese Unterschiede waren besonders stark ausgeprägt, wenn die Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase waren.

In der S-Phase ist die Homologe Rekombination (HR) der wichtigste DNA-Doppelstrangbruchreparaturweg. Deshalb wurde untersucht, ob die HR-Kapazität in den Radioresistenten Klonen erhöht ist. Dies wurde durch Transfektion mit einem HR-spezifischen Reparaturkonstrukt (DR-GFP) überprüft. Tatsächlich zeigten die Radioresistenten Klone eine generell deutlich gesteigerte HR-Kapazität.

Um zu untersuchen, ob die gesteigerte HR-Kapazität tatsächlich auf den höheren Anteil ALDH1-positiven CSC zurückzuführen war, wurde diese flusszytometrisch isoliert und somit reine CSC-Population aus allen Ursprungszelllinien und radioresistenten Klonen hergestellt. Tatsächlich bestätigte sich, dass die ALDH1-positiven Zellen eine jeweils signifikant höhere HR-Kapazität aufwiesen als die Zelllinien, aus denen sie isoliert wurden.

Neben der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen schützt die HR in der S-Phase geöffnete DNA-Replikationsgabeln vor nukleolytischer Degradation. Um dies zu überprüfen, wurde die Stabilität der Replikationsgabeln mittels DNA-Fiber Assay gemessen. Hierfür wurde replizierenden Zellen sequenziell zwei synthetische Nukleoside (Label) über einen definierten Zeitraum angeboten, auf Objektträgern aufgebracht und mittels Immunfluoreszenz gefärbt. Für die Untersuchung der Replikationsgabel-Stabilität wurden die Zellen zwischen den beiden Labeln mit Hydroxyharnstoff behandelt. Tatsächlich zeigte sich, dass die ALDH1-positiven CSC angehaltene Replikationsgabeln effizient schützen konnten, während die Ursprungszelllinien zahlreiche degradierte DNA-Replikationsgabeln aufwiesen. Dies bestätigte, dass die ALDH1-positiven CSC eine besonders effektiv funktionierende HR aufwiesen.

Für die Aktivierung der HR ist die Funktionalität des ATR-CHK1 Signalwegs Voraussetzung. Um zu überprüfen, ob dies für die Strahlenresistenz der ALDH1-positiven CSC von Bedeutung ist, wurden ATR und CHK1 durch spezifische *small-molecule* Inhibitoren gehemmt und das zelluläre Überleben nach Bestrahlung überprüft. Die Inhibition von ATR oder CHK1 führten zu einem signifikant geringeren zellulären Überleben nach Bestrahlung in allen untersuchten Zelllinien. Die Strahlensensibilisierung war in den radioresistenten Klonen und den isolierten,

ALDH1-positiven CSC besonders ausgeprägt (Verstärkungsfaktor 3).

Die Ergebnisse zeigen, dass CSC strahlenresistent sind und dies auf eine verstärkte DSB-Reparatur und Schutz von geöffneten DNA-Replikationsgabeln durch HR zurückgeführt werden kann. Die Inhibition der S-Phase-Schadensantwort durch ATR- oder CHK1-Inhibition führte zu einer signifikanten Strahlensensibilisierung. Daher vermuten wir, dass Inhibitoren zur Inaktivierung der DNA-Schadensantwort der S-Phase, wie z. B. ATR oder CHK1, in Zukunft zur Weiterentwicklung bestehender Therapien eingesetzt werden könnten. Eine Publikation mit Daten aus diesem Projekt ist bereits eingereicht worden.