

靶向胶质母细胞瘤中的复制应激

陈佳敏, 吴亮*

中国药科大学, 江苏 南京

收稿日期: 2022年3月7日; 录用日期: 2022年3月24日; 发布日期: 2022年4月7日

摘要

胶质母细胞瘤是成人常见的原发性脑肿瘤, 病程短, 预后差, 具有极强的治疗抗性, 目前临床治疗仍然以手术切除辅以放化疗为主。近期, 新兴的电场疗法被加入到胶质母细胞瘤的辅助疗法中, 其是否有效尚存在争议。在过去50年里, 胶质母细胞瘤的药物研发停滞不前, 临床急需有效的药物改善患者预后。早期研究表明, 由于DDR通路的异常上调, GBM (Glioblastoma)是一种先天耐受放化疗的肿瘤。基于现有治疗GBM的方法均会造成DNA损伤的特点, 抑制DDR通路激活, 加剧复制应激可能是改善GBM患者预后的有效策略。因此, 我们对目前GBM的治疗概况以及靶向GBM中的DDR通路, 增强现有DNA损伤疗法的相关研究进展进行了综述。

关键词

胶质母细胞瘤, 替莫唑胺, 复制应激, DNA损伤反应, 合成致死

Targeting the Replication Stress of Glioblastoma

Jiamin Chen, Liang Wu*

China Pharmaceutical University, Nanjing Jiangsu

Received: Mar. 7th, 2022; accepted: Mar. 24th, 2022; published: Apr. 7th, 2022

Abstract

Glioblastoma is a common primary brain tumor among adults with a short course of disease, poor prognosis and elevated treatment resistance. Currently, clinical treatment of GBM is still based on surgical resection supplemented by radiotherapy and chemotherapy. Recently, the emerging tumor-treating fields (TTFs) therapy has been approved to treat GBM as adjuvant therapy, and its

*通讯作者。

effectiveness is still controversial. In the past 50 years, drug development for glioblastoma has stagnated, and there is an urgent need for new drug to improve the outcomes of GBM patient. Early studies have shown that GBM is innately resistant to chemotherapy and radiotherapy due to abnormal upregulation of the DDR pathway. Therefore, based on the characteristics of existing therapies which cause DNA damage to inhibit tumor growth, we reviewed the current treatment of GBM and the related research progress of targeting the DDR pathway in GBM to enhance existing DNA damage therapies.

Keywords

Glioblastoma, TMZ, Replication Stress, DNA Damage Response, Synthetic Lethality

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 胶质母细胞瘤及其治疗

1.1. 胶质母细胞瘤疾病概况

胶质瘤是成人常见的原发性脑瘤, 发病率占恶性脑肿瘤的 81% [1]。世界卫生组织(WHO)根据胶质瘤恶性程度将其分为 I 至 IV 级, 胶质母细胞瘤(GBM)属于 IV 级胶质瘤, 约占胶质瘤发病率的 47% [2], 其高度恶性, 表现为治疗耐药, 疾病进展迅速, 患者预后差等。目前, 临床上治疗胶质母细胞瘤的手段为手术切除, 辅以放疗和替莫唑胺(TMZ)化疗。即便如此, 患者最终还是会上复发耐药, 中位生存期在 12~15 个月左右, 5 年生存率低于 10% [3]。

1.2. 胶质母细胞瘤的治疗

手术切除占位肿瘤是 GBM 治疗的首选方案, 医生必须在保证患者神经功能不受损害的情况下最大安全程度地切除肿瘤。由于脑组织结构复杂, 且 GBM 呈弥漫性和浸润性生长, 手术无法将肿瘤组织切除干净, 为术后复发埋下了种子[4]。

替莫唑胺(TMZ)是目前临床上用于治疗 GBM 的一线化疗药, 属于第二代抗肿瘤烷化剂类化疗药物, 相对安全。TMZ 脂溶性较好, 易于透过血脑屏障。然而, 替莫唑胺的加入仅能将患者的生存期提高 2.5 个月, 患者最终将发生耐药[5]。

胶质母细胞瘤与低级别胶质瘤的区别在于其具有微血管增殖的特点, GBM 表现为高度的血管化并高表达血管内皮生长因子(VEGF) [6]。2009 年, 血管生成抑制剂贝伐单抗被 FDA 批准用于复发性胶质母细胞瘤的治疗。然而其疗效因肿瘤类型和患者疾病进展状况而异[7] [8], 影响抗血管生成治疗无进展生存期(PFS)和总体生存率 OS 的因素仍然不明确, 贝伐单抗是否能改善不同亚型新诊断和复发性 GBM 患者的生存率和生活质量仍需要进一步探究[7] [8] [9]。

近几年肿瘤治疗电场(TTFs)被美国 FDA 和一些国家批准作为辅助疗法与 TMZ 联合治疗 GBM, 这是一种通过中低频电场干扰肿瘤细胞有丝分裂来发挥抗肿瘤作用的治疗方法, 其 III 期临床试验结果显示, TTFs 联合 TMZ 可将 GBM 患者无进展生存期(PFS)由 TMZ 单用的 4 个月提高至 6.7 个月[10] [11]。但 TTFs 治疗设备费用较为高昂, 普通人无法承担, 且患者几乎需要全天佩戴治疗设备, 对于患者日常生活来说较为不便[12], 其是否能改善患者的总生存期还需要时间来验证。

总体来说, 自 2005 年 TMZ 获批用于治疗 GBM 以来, 再无新的有效改善 GBM 患者预后的疗法出现。

1.3. 胶质母细胞瘤药物研发面临的挑战

近年来, 抗肿瘤领域取得了巨大的成就, 免疫疗法的迅猛发展改变了肿瘤治疗的格局。CAR-T 疗法的问世和更迭为治愈血液瘤患者带来了巨大的希望, 免疫检查点 PD-1/PD-L1 抑制剂更是将非鳞非小细胞肺癌患者的五年生存率从 5% 提高至 26% [13], 极大地改善了患者的生存状况。而在胶质母细胞瘤临床治疗领域, 类似振奋人心的新疗法和治疗策略从未出现。我们经过分析, 胶质母细胞瘤治疗困难的原因有如下几点:

首先, 区别于其他实体瘤, 胶质母细胞瘤生长在颅内。星形胶质细胞, 周细胞和血管内皮细胞之间的紧密连接形成了血脑屏障(BBB), 它可保护脆弱的神经组织免受全身循环中的有害因素的影响, BBB 的紧密连接和蛋白外排体系将许多潜在有效的药物拒之门外[14]。因此, 在 GBM 的药物筛选过程中, 经体外筛选验证有效的药物还需要进行 BBB 渗透性评价。目前, 已建立的体外 BBB 透过性筛选评价模型包括体外共培养 BBB 组成细胞和祖细胞衍生的脑类器官, 但二者均不能很好地代表人脑的结构功能。而通过放射性同位素标记法和荧光基团标记法在体内示踪药物则可能造成药物作用性质的改变。因此, 目前为止还没有有效的筛选体系来评价药物血脑屏障透过性[15] [16], 这也是造成 GBM 药物研发进展缓慢的原因。

其次, 胶质母细胞瘤属于高度异质性的肿瘤, 根据 GBM 的组织病理学和分子学特征, TCGA 将 GBM 分为经典型(*EGFR* 扩增), 前神经型(高表达 OPC 相关基因 *PDGFR α* 和 *olig2*, *TP53* 突变或杂合缺失)和间充质型(*NFI* 杂合缺失, 表达间充质标志), 并指出这几类亚型常常共同存于同一肿瘤中[17]。2019 年, 一项大型的 GBM 单细胞 RNA 测序结果进一步佐证了 GBM 具有高度的异质性的特点, 研究显示, GBM 中的恶性细胞主要对应于神经前体细胞样(NPC-like), 少突胶质细胞 - 祖细胞样(OPC-like), 星形胶质细胞样(AC-like)和间充质样细胞(MES-like)状态中的一种, 同时研究指出, 四种状态的恶性细胞可以互相转化, 并且这种转化能力与不同状态细胞对应的胶质瘤干细胞密切相关[18]。GBM 中存在着不同的干细胞亚型, 或者说 GBM 具有多种可塑性状态, 依靠单一疗法无法有效治疗 GBM。

除此之外, 胶质母细胞瘤是一种对放疗和化疗具有高度耐药性的肿瘤, 这些特征使 GBM 成为一种非常难以治疗的肿瘤[19]。GBM 增强的 DNA 损伤修复系统活性导致诱导 DNA 损伤的疗法无效。尽管 GBM 先天抗性的分子基础尚未完全阐明, 但初步研究显示, 这种 DNA 损伤修复通路的异常上调与胶质瘤干细胞的存在有关, GBM 干细胞样细胞已被证明能够更有效地修复辐射引起的 DNA 损伤, 相比于普通 GBM 细胞具有更强的抗辐射能力[20] [21]。

最后, GBM 分子病理十分复杂, 尽管不同阶段(形成/维持、治疗和进展)的 GBM 样本为我们提供了丰富的遗传学、基因表达和启动子甲基化的数据, 但目前暂无明确的可有效靶向的特征性分子靶点。此外, 大脑独特的发育、遗传、表观遗传和微环境特征以及脑瘤患病人数的稀少为深入研究 GBM 的病理机制又加上了一道难关[22]。

2. 复制应激与胶质母细胞瘤

2.1. 复制应激

复制应激又称复制压力, 广义地来讲, 复制应激是指 DNA 复制过程中基因组所处的一种不稳定的状态[23]。复制应激时刻伴随着哺乳动物细胞的各种生理、病理进程, 可由多种因素诱导产生, 包括核苷酸库的缺乏、错误掺入的核苷酸、复制转录冲突、RNA-DNA 杂合体的生成、DNA 交联、致癌基因诱导的复制起点增加、复制叉功能障碍以及染色质结构的改变等[24]。

不同类型的复制压力可造成不同类型的损伤, 为了防止损伤对基因组的完整性造成影响, 我们的机

体衍生出了一套复杂的信号通路和完备的修复体系来应对, 即复制应激反应(RSR), 其中占据主要地位的是 DNA 损伤反应(DDR), 其可通过延缓细胞周期进程, 阻滞 DNA 复制以及上调 DNA 修复蛋白活性等多个方面来修复 DNA 损伤, 从而恢复 DNA 复制[25] [26] [27]。若细胞未能正确克服此类损伤则会导致染色体复制无法完成, 进而导致有丝分裂灾难、复杂的染色体重排和细胞死亡[28]。

2.2. DNA 损伤反应(DDR)

DNA 损伤反应是一种由激酶介导的级联反应, 由共济失调毛细血管扩张突变激酶(ATM), 共济失调毛细血管扩张和 Rad3 相关激酶(ATR)和 DNA 依赖性蛋白激酶(DNA-PK)共同介导, 这三种蛋白均属于磷酸肌醇 3-激酶相关激酶(PIKK)家族, 是 DNA 损伤反应通路的核心传导分子, 作为复制应激的早期响应部分, ATM 和 DNA-PK 主要响应双链断裂损伤(DSBs), 而 ATR 则响应单链断裂损伤[29] [30] [31]。它们可为复制压力的解除供充足的时空条件[26] [32]。三者既有各自独立的信号通路, 在某些情况下功能也存在冗余和重叠[33]。

ATM 被多种刺激激活, 包括 DSBs、缺氧和活性氧(ROS)等。当 DNA 的两条链都受损时, 传感器复合物 MRN (Mre11-Rad50-Nbs1)会在受损部位与 DNA 结合, 进而招募 ATM, ATM 经自磷酸化激活, 启动信号级联[30] [34]。ATM 的下游响应器为检查点蛋白 CHK2 和 p53, 其可通过激活 G1/S 检查点(p53/p21), S 期内检查点(cdc25A/CDK2)和 G2/M 期检查点(cdc25c/cdk1)来调控细胞周期进程[26] [34]。除此之外, ATM 参与了同源重组修复(HR)中 DNA 末端切除过程。HR 需要对 DSB 末端加工来产生单链 DNA (ssDNA), 生成的 ssDNA 与重组酶 RAD51 结合后插入到姐妹染色单体的双链 DNA 中并以其为模板进行修复, 因此末端切除是 DSB 修复途径的关键决定因素。ATM 参与末端切除中单链 DNA 的牵引, 在同源重组修复中具有重要作用[35]。ATM 常常在癌症中缺失, 研究显示 ATM 的缺失会导致“轻度”HR 受损[36]。

ATR 响应单链 DNA (ssDNA)的产生, 单链 DNA 通常在停止活动的复制叉处形成, DNA 解旋酶和聚合酶解偶联暴露出一段单链 DNA, 除此之外, ssDNA 也在修复 DSB 位点期间产生。复制蛋白 A(RPA)覆盖 ssDNA 以使其稳定并避免形成破坏性二级结构[31]。ATR 与 ATR 相互作用蛋白(ATRIP)结合, 被募集到 RPA 包被的 ssDNA。一旦被募集到损伤部位, 9-1-1 (Rad9-HUS1-Rad1)等调节复合物就会进一步募集到受损部位并激活 ATR。ATR 下游响应器为 CHK1, CHK1 通过去磷酸化 cdc25 家族蛋白, 阻止 CDK 的活化, 同时 chk1 可激活下游蛋白 Wee1, 负调控 CDK/Cyclin 复合物的活性, 抑制 S 期和 G2/M 期进展[34] [37] [38]。ATR/CHK1 通路的活化促进了复制叉的稳定, 同时抑制新的复制起点的活化, 从而防止因 RPA 蛋白的耗竭而造成 DNA 断裂和复制叉塌陷[39]。最终, ATR 可通过磷酸化激活解旋酶 SMARCA1 和染色质重塑因子 SWI/SNF 等蛋白[33] [40]以及核苷酸的供应重启复制叉[41]。复制应激发生时, ATR/CHK1 通路在恢复 DNA 复制的多个方面发挥了关键的作用, 故 ATR, CHK1 以及 Wee1 蛋白是目前针对复制应激药物研发的重点对象。

不同于 ATM 和 ATR, DNA-PK 下游信号较少, 仅作为支架募集 DNA 修复蛋白并磷酸化下游 X 线修复交叉互补基因 4 (XRCC4)和 γ -H2AX 信号, 参与非同源末端链接修复[29] [40]。

2.3. DNA 损伤修复

当 DNA 复制过程受到不良因素干扰时, 可产生各种类型的损伤, 包括碱基修饰和错配、DNA 链间或链内交联、单链断裂和双链断裂, 其中双链断裂损伤是最致命的损伤类型, 可由其它未修复的损伤类型累积转化而来。单链损伤修复分为碱基切除修复(BER), 核苷酸切除修复(NER)和错配修复(MMR), 其共同特点为通过识别和切除少量受损的碱基, 然后以另一条链为模板链来合成新的序列[27] [35]。早期

BER, NER 和 MMR 系统的活化可防止少量的碱基损伤累积和进一步转化成严重的 DNA 断裂损伤。

双链损伤修复中涉及的两种修复系统是同源重组(HR)和非同源末端连接(NHEJ), 由于涉及两条链的修复, 机制更加复杂。HR 需要以姐妹染色单体为模板合成修复的链, 故只能发生在 DNA 复制后的 S/G2 期, 这是一种高度保真的修复方式[42]。而在缺乏可供参考的姐妹染色体单链时, NHEJ 就会被调用。由于没有可复制的模板, NHEJ 通过连接 DSB 的两端来发挥作用。虽然该系统能够修复 DSB, 但不能将 DNA 恢复到损伤前的原始状态[43]。链间交联是一种特殊的 DNA 损伤修复方式, 由范可尼贫血途径修复[44]。

3. 靶向激活 GBM 中的复制应激

3.1. 靶向 DDR 通路

未能缓解和改善的复制应激常常导致肿瘤的发生, 而由于肿瘤细胞 DNA 损伤修复通路的缺陷和癌基因的驱动, 其有丝分裂旺盛, 加上化疗药物的干扰, 肿瘤处于高度复制应激的状态。一方面, 高水平复制应激所诱导的基因突变可能促进肿瘤细胞的突变和进化, 另一方面, 高水平的复制应激使得肿瘤细胞在加剧复制应激的疗法面前变得脆弱不堪。DDR 通路是肿瘤细胞复制进程的守护者和“刹车”, 当 DDR 通路被抑制时, 细胞失去检查点的控制, 此时细胞犹如一辆即将散架却在高速行驶的破马车, 带着受损的 DNA 进入不可逆的有丝分裂, 最终导致复制灾难的发生。因此, 利用 DDR 通路的抑制剂与化疗联用诱导肿瘤细胞产生复制灾难可能是目前治疗 GBM 有效的合成致死策略。

TMZ 诱导 DNA 鸟嘌呤的 N7 和 O6 发生甲基化, 一方面, O(6)-甲基鸟嘌呤(O(6)-MeG)的存在阻止了 DNA 复制, 诱导 DDR 通路的活化, 导致 G2/M 期停滞[45] [46]。另一方面, MMR 系统被激活, 由于 MMR 将子链中错配的嘧啶切除留下缺口, 持续的 O(6)-MeG 的产生和 MMR 系统的活化最终导致复制叉的塌陷和 DNA 断裂, 细胞发生凋亡[47]。

研究显示, O(6)-MeG 触发 ATM 和 ATR 的活化, 介导 TMZ 的耐药, ATM 和 ATR 突变的胶质瘤细胞对替莫唑胺敏感。相比于 ATM/CHK2 通路, ATR/CHK1 在介导 TMZ 耐药中占主要地位[48]。此外, TMZ 诱导的 ATM/ATR 激活导致 p53 的 15 和 20 位丝氨酸磷酸化, 使细胞周期停滞在 G1/S 期, 促进促生存基因的转录[49]。AZD6738 是基于 AZ20 结构进行优化的第二代 ATR 抑制剂, 是唯一一个 BBB 透过性较好的小分子 ATR 抑制剂, 遗憾的是, 其无法改善 GIC 驱动的 GBM 模型小鼠的放疗敏感性[50]。而在另一项研究中, 抑制 ATR 可抑制 GSC 的生长, 和 PARP 的双重抑制可显著抑制 GSC 的生长($p < 0.001$), 消除其辐射抗性[51]。因此, ATR 抑制是否能改善 GBM 患者的预后, 以及 ATR 抑制剂是否针对某类 GBM 患者亚群, 未来需要更多的研究来支持。KU-60019 是一种新型 ATM 激酶抑制剂, 其与放疗联用可增加 GBM 原位异种移植模型小鼠的生存率, 并且 p53 突变的细胞对 ATM 抑制剂联合放疗更加敏感。虽然在小鼠模型中表现出优异的疗效, 但是 KU-60019 的 BBB 渗透性不佳, 需要局部递送[52]。AZD1390 是一种专为透过 BBB 而设计的 ATM 抑制剂, 在 GBM 临床前模型中显示出优异的放疗增敏效果[53]。C11 放射性标记实验表明, AZD1390 可透过人的完整的 BBB, 为 AZD1390 应用于 GBM 等脑部肿瘤提供了依据[54]。目前, AZD1390 正在一项联合放疗的临床试验中评估其在原发性和复发性 GBM 患者安全性和耐受性(NCT03423628)。

ATR/ATM 下游的靶点 Chk1 也一直是靶向 DDR 小分子抑制剂研发领域的重点关注对象。Bao 等人的研究显示, 抑制 Chk1 可显著增强 GSC 对放疗的敏感性[55], 在 GBM 动物模型中, Chk1 抑制剂可显著增强了 DNA 损伤疗法的作用, 且 p53 突变的细胞更加敏感, 因为 p53 突变的细胞缺乏 G1/S 期检查点, 主要依赖 Chk1 通路解决复制压力[56]。Chk1 抑制剂如 MK8776 和 LY2606368 在临床前模型中显示出良

好的 BBB 透过性, 目前正在 I/II 期临床试验中进行评估, 尚未涉及 GBM 患者。

Wee1 是一种由 Chk1 激活的激酶, 可抑制 CDK1 的活性, 从而阻止有丝分裂进入。迄今为止, 唯一可用的 Wee1 抑制剂是 MK1775, 它具有良好的 BBB 渗透性, 目前正在接受 IR 和 TMZ 治疗的 GBM 患者中进行测试(NCT02207010) [57]。

3.2. 靶向 DNA 损伤修复蛋白

TMZ 与 DNA 碱基形成甲基化加合物诱导 DNA 单链断裂损伤积累。TMZ 的耐药机制被认为与 O6-DNA 甲基转移酶 MGMT 和碱基切除修复(BER)有关[58] [59]。不依赖于任何蛋白和辅因子, MGMT 可将 O6-DNA 上的甲基直接至自身半胱氨酸残基上, 修复 TMZ 造成的损伤[58]。研究显示, MGMT 甲基化发生在 45%~70% 的高级别胶质瘤中[60] [61], MGMT 高甲基化给接受烷化剂和放疗的患者带来了生存益处, 在 MGMT 启动子甲基化的患者中, 应用 TMZ 的患者生存率提高了 6.7 个月[62]。Jackson CB 等人的研究表明, ATR 抑制剂使 MGMT 缺陷的细胞对 TMZ 更敏感, 这可能为 MGMT 突变患者进一步带来治疗益处[63]。O-6-苄基鸟嘌呤(O6BG)是 MGMT 的假底物, 可透过 BBB [64], 但早期研究显示, O6BG 与 TMZ 联用无法为 GBM 患者带来生存益处[65], 而其它 MGMT 假底物如 Lomeguatrib, 其与 GBM 相关的探索目前仍处于临床前研究阶段。

除了 O6-MeG, TMZ 可诱导 DNA 鸟嘌呤 N7-和 N3-位的甲基化, 该加合物由 BER 介导切除。PARP 是参与碱基切除修复(BER)途径的关键蛋白, 响应于 DNA 损伤, PARP-1 与单链 DNA 结合, 形成长链 ADP-核糖多聚体来为 BER 途径的修复蛋白 XRCC1, DNA 聚合酶, DNA 连接酶和 FEN-1 等提供募集平台, 形成 BER 复合物, 促进 DNA 修复[59] [66]。研究显示, 抑制 PARP 可导致 DNA 断裂损伤增加, 使细胞对 TMZ 的敏感性增加。除此之外, PARP 也促进了 MGMT 与染色质的结合, 参与 MGMT 对 O6MeG 的移除, PARP 的抑制可恢复表达 MGMT 的 GBM 对 TMZ 敏感性[67]。

TMZ 的获得性耐药与 MMR 基因的突变相关, 包括 *MSH2*、*MSH6*、*MLH1* 和 *PMS2*, 这些突变在原发性肿瘤中极为罕见。在 MMR 通路缺陷的 GBM 中, PARP 抑制剂可恢复 GBM 对 TMZ 的敏感性, 且与 BER 通路无关[68]。

携带 *BRCA1* 或 *BRCA2* 突变的肿瘤存在 HR 缺陷, 导致它们易受 PARP 抑制剂的影响。该合成致死策略最成功的案例是 PARP 抑制剂在 BRCA 突变的乳腺癌和卵巢癌中的应用[69] [70] [71]。在胶质瘤的背景下, 具有 *IDH1/2* 突变的肿瘤可能表现出“BRCAness”表型, 这可能与肿瘤代谢物水平升高导致 HR 抑制有关[72]。同时, 部分 *IDH* 突变的肿瘤对传统的 DNA 损伤化学疗法如替莫唑胺以及 PARP1 抑制剂敏感也支持这一观点[73] [74]。PARP 抑制剂 Niraparib 和 Veliparib 均具有良好的 BBB 渗透性, 一项在 Veliparib 联用放疗和 TMZ 治疗 MGMT 非甲基化的 GBM 患者的随机 II 期临床实验结果显示, 含 veliparib 的方案可行且耐受性良好, 但目前为止, Veliparib 的加入并未给患者带来足够的临床获益[75]。PARP 抑制剂是否能为 GBM 患者带来临床获益还有待观察, 未来还需要更多研究进一步探讨 PARP 在不同基因突变背景下介导修复的确切机制, 帮助不同亚型的 GBM 患者获得最大临床收益。

4. 回顾与展望

本综述讨论了目前 GBM 治疗概况以及靶向 DNA 损伤信号通路的相关研究进展, 可以看到, GBM 是一种异质性极强的肿瘤, 不同分子亚型的 GBM 对不同疗法的响应不同。目前, 针对复制应激反应, 已有一些可通过 BBB 的小分子抑制被开发出来, 接下来需要对 DNA 损伤信号通路之间的交互作用, 以及不同治疗背景下 DDR 通路响应的差异进行深入研究, 寻找相关标志物, 为有针对性地治疗 GBM 患者提供理论依据。

参考文献

- [1] Morgan, L.L. (2015) The Epidemiology of Glioma in Adults: A “State of the Science” Review. *Neuro-Oncology*, **17**, 623-624. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou358>
- [2] Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Liao, P., et al. (2014) CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro-Oncology*, **16**, iv1-iv63. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou223>
- [3] Jiang, T., Nam, D.H., Ram, Z., et al. (2021) Clinical Practice Guidelines for the Management of Adult Diffuse Gliomas. *Cancer Letters*, 499, 60-72. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.10.050>
- [4] Osswald, M., Jung, E., Sahm, F., et al. (2015) Brain Tumour Cells Interconnect to a Functional and Resistant Network. *Nature*, **528**, 93-98. <https://doi.org/10.1038/nature16071>
- [5] Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., et al. (2009) Effects of Radiotherapy with Concomitant and Adjuvant Temozolomide versus Radiotherapy Alone on Survival in Glioblastoma in a Randomised Phase III Study: 5-Year Analysis of the EORTC-NCIC Trial. *The Lancet Oncology*, **10**, 459-466. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70025-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70025-7)
- [6] Brandes, A.A., Tosoni, A., Franceschi, E., Reni, M., Gatta, G. and Vecht, C. (2008) Glioblastoma in Adults. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **67**, 139-152. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2008.02.005>
- [7] Sandmann, T., Bourgon, R., Garcia, J., et al. (2015) Patients with Proneural Glioblastoma May Derive Overall Survival Benefit from the Addition of Bevacizumab to First-Line Radiotherapy and Temozolomide: Retrospective Analysis of the AVAglio Trial. *Journal of Clinical Oncology*, **33**, 2735-2744. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.5005>
- [8] Pasqualetti, F., Gonnelli, A., Molinari, A., et al. (2018) Different Timing to Use Bevacizumab in Patients with Recurrent Glioblastoma: Early versus Delayed Administration. *Anticancer Research*, **38**, 5877-5881. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12930>
- [9] Chinot, O.L., Wick, W., Mason, W., et al. (2014) Bevacizumab plus Radiotherapy-Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, **370**, 709-722. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1308345>
- [10] Chaudhry, A., Benson, L., Varshaver, M., et al. (2015) NovoTTF™-100A System (Tumor Treating Fields) Transducer Array Layout Planning for Glioblastoma: A NovoTAL™ System User Study. *World Journal of Surgical Oncology*, **13**, Article No. 316. <https://doi.org/10.1186/s12957-015-0722-3>
- [11] Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A., et al. (2017) Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *Journal of the American Medical Association*, **318**, 2306-2316. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.18718>
- [12] Rominiyi, O., Vanderlinden, A., Clenton, S.J., Bridgewater, C., Al-Tamimi, Y. and Collis, S.J. (2021) Tumour Treating Fields Therapy for Glioblastoma: Current Advances and Future Directions. *British Journal of Cancer*, **124**, 697-709. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01136-5>
- [13] Murciano-Goroff, Y.R., Warner, A.B. and Wolchok, J.D. (2020) The Future of Cancer Immunotherapy: Microenvironment-Targeting Combinations. *Cell Research*, **30**, 507-519. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0337-2>
- [14] Gerstner, E.R. and Fine, R.L. (2007) Increased Permeability of the Blood-Brain Barrier to Chemotherapy in Metastatic Brain Tumors: Establishing a Treatment Paradigm. *Journal of Clinical Oncology*, **25**, 2306-2312. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.10.0677>
- [15] Bagchi, S., Chhibber, T., Lahooti, B., Verma, A., Borse, V. and Jayant, R.D. (2019) *In-Vitro* Blood-Brain Barrier Models for Drug Screening and Permeation Studies: An Overview. *Drug Design, Development and Therapy*, **13**, 3591-3605. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S218708>
- [16] Chowdhury, E.A., Noorani, B., Alqahtani, F., et al. Understanding the Brain Uptake and Permeability of Small Molecules through the BBB: A Technical Overview. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, **41**, 1797-1820. <https://doi.org/10.1177/0271678X20985946>
- [17] Verhaak, R.G., Hoadley, K.A., Purdom, E., et al. (2010) Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, **17**, 98-110. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>
- [18] Neftel, C., Laffy, J., Filbin, M.G., et al. (2019) An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell*, **178**, 835-849.E21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.024>
- [19] Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B. and Sharma, R.A. (2008) DNA Repair Pathways as Targets for Cancer Therapy. *Nature Reviews Cancer*, **8**, 193-204. <https://doi.org/10.1038/nrc2342>
- [20] Huang, Z., Cheng, L., Guryanova, O.A., Wu, Q. and Bao, S. (2010) Cancer Stem Cells in Glioblastoma-Molecular Signaling and Therapeutic Targeting. *Protein & Cell*, **1**, 638-655. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0078-y>
- [21] Morgan, M.A. and Canman, C.E. (2018) Replication Stress: An Achilles' Heel of Glioma Cancer Stem-Like Cells. *Can-*

- cer Research*, **78**, 6713-6716. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2439>
- [22] Aldape, K., Brindle, K.M., Chesler, L., *et al.* (2019) Challenges to Curing Primary Brain Tumours. *Nature Reviews Clinical Oncology*, **16**, 509-520. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0177-5>
- [23] Ngoi, N.Y.L., Pham, M.M., Tan, D.S.P. and Yap, T.A. (2021) Targeting the Replication Stress Response through Synthetic Lethal Strategies in Cancer Medicine. *Trends in Cancer*, **7**, 930-957. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2021.06.002>
- [24] Zeman, M.K. and Cimprich, K.A. (2014) Causes and Consequences of Replication Stress. *Nature Cell Biology*, **16**, 2-9. <https://doi.org/10.1038/ncb2897>
- [25] Harper, J.W. and Elledge, S.J. (2007) The DNA Damage Response: Ten Years after. *Molecular Cell*, **28**, 739-745. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.015>
- [26] Blackford, A.N. and Jackson, S.P. (2017) ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Molecular Cell*, **66**, 801-817. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.015>
- [27] Jackson, S.P. and Bartek, J. (2009) The DNA-Damage Response in Human Biology and Disease. *Nature*, **461**, 1071-1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>
- [28] Toledo, L., Neelsen, K.J. and Lukas, J. (2017) Replication Catastrophe: When a Checkpoint Fails Because of Exhaustion. *Molecular Cell*, **66**, 735-749. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.001>
- [29] Damia, G. (2020) Targeting DNA-PK in Cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **821**, Article ID: 111692. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2020.111692>
- [30] Stagni, V., Oropallo, V., Fianco, G., Antonelli, M., Cinà, I. and Barilà, D. (2014) Tug of War between Survival and Death: Exploring ATM Function in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, **15**, 5388-5409. <https://doi.org/10.3390/ijms15045388>
- [31] Armstrong, S.A., Schultz, C.W., Azimi-Sadjadi, A., Brody, J.R. and Pishvaian, M.J. (2019) ATM Dysfunction in Pancreatic Adenocarcinoma and Associated Therapeutic Implications. *Molecular Cancer Therapeutics*, **18**, 1899-1908. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-19-0208>
- [32] Curtin, N.J. (2012) DNA Repair Dysregulation from Cancer Driver to Therapeutic Target. *Nature Reviews Cancer*, **12**, 801-817. <https://doi.org/10.1038/nrc3399>
- [33] Maréchal, A. and Zou, L. (2013) DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **5**, a012716. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012716>
- [34] Shiloh, Y. and Ziv, Y. (2013) The ATM Protein Kinase: Regulating the Cellular Response to Genotoxic Stress, and More. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **14**, 197-210. <https://doi.org/10.1038/nrm3546>
- [35] Ferri, A., Stagni, V. and Barilà, D. (2020) Targeting the DNA Damage Response to Overcome Cancer Drug Resistance in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, Article No. 4910. <https://doi.org/10.3390/ijms21144910>
- [36] Bakr, A., Oing, C., Köcher, S., *et al.* (2015) Involvement of ATM in Homologous Recombination after End Resection and RAD51 Nucleofilament Formation. *Nucleic Acids Research*, **43**, 3154-3166. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv160>
- [37] Ciccia, A. and Elledge, S.J. (2010) The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Molecular Cell*, **40**, 179-204. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019>
- [38] Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., *et al.* (2000) Rapid Destruction of Human Cdc25A in Response to DNA Damage. *Science*, **288**, 1425-1429. <https://doi.org/10.1126/science.288.5470.1425>
- [39] Toledo, L.I., Altmeyer, M., Rask, M.B., *et al.* (2013) ATR Prohibits Replication Catastrophe by Preventing Global Exhaustion of RPA. *Cell*, **155**, 1088-1103. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.043>
- [40] Damia, G. (2020) Targeting DNA-PK in Cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **821**, Article ID: 111692. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2020.111692>
- [41] Zhang, Y.W., Jones, T.L., Martin, S.E., Caplen, N.J. and Pommier, Y. (2009) Implication of Checkpoint Kinase-Dependent Up-Regulation of Ribonucleotide Reductase R2 in DNA Damage Response. *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 18085-18095. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.003020>
- [42] Li, X. and Heyer, W.D. (2008) Homologous Recombination in DNA Repair and DNA Damage Tolerance. *Cell Research*, **18**, 99-113. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.1>
- [43] Chang, H.H.Y., Pannunzio, N.R., Adachi, N. and Lieber, M.R. (2017) Non-Homologous DNA End Joining and Alternative Pathways to Double-Strand Break Repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **18**, 495-506. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48>
- [44] Degan, P., Cappelli, E., Regis, S. and Ravera, S. (2019) New Insights and Perspectives in Fanconi Anemia Research. *Trends in Molecular Medicine*, **25**, 167-170. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.01.003>
- [45] Denny, B.J., Wheelhouse, R.T., Stevens, M.F., Tsang, L.L. and Slack, J.A. (1994) NMR and Molecular Modeling In-

- vestigation of the Mechanism of Activation of the Antitumor Drug Temozolomide and Its Interaction with DNA. *Biochemistry*, **33**, 9045-9051. <https://doi.org/10.1021/bi00197a003>
- [46] Tisdale, M.J. (1987) Antitumor Imidazotetrazines—XV. Role of Guanine O6 Alkylation in the Mechanism of Cytotoxicity of Imidazotetrazinones. *Biochemical Pharmacology*, **36**, 457-462. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(87\)90351-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(87)90351-0)
- [47] Mojas, N., Lopes, M. and Jiricny, J. (2007) Mismatch Repair-Dependent Processing of Methylation Damage Gives Rise to Persistent Single-Stranded Gaps in Newly Replicated DNA. *Genes & Development*, **21**, 3342-3355. <https://doi.org/10.1101/gad.455407>
- [48] Eich, M., Roos, W.P., Nikolova, T. and Kaina, B. (2013) Contribution of ATM and ATR to the Resistance of Glioblastoma and Malignant Melanoma Cells to the Methylating Anticancer Drug Temozolomide. *Molecular Cancer Therapeutics*, **12**, 2529-2540. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0136>
- [49] Matt, S. and Hofmann, T.G. (2016) The DNA Damage-Induced Cell Death Response: A Roadmap to Kill Cancer Cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **73**, 2829-2850. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2130-4>
- [50] Fròsina, G., Profumo, A., Marubbi, D., Marcello, D., Ravetti, J.L. and Daga, A. (2018) ATR Kinase Inhibitors NVP-BEZ235 and AZD6738 Effectively Penetrate the Brain after Systemic Administration. *Radiation Oncology*, **13**, Article No. 76. <https://doi.org/10.1186/s13014-018-1020-3>
- [51] Carruthers, R.D., Ahmed, S.U., Ramachandran, S., et al. (2018) Replication Stress Drives Constitutive Activation of the DNA Damage Response and Radioresistance in Glioblastoma Stem-Like Cells. *Cancer Research*, **78**, 5060-5071. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0569>
- [52] Biddlestone-Thorpe, L., Sajjad, M., Rosenberg, E., et al. (2013) ATM Kinase Inhibition Preferentially Sensitizes p53-Mutant Glioma to Ionizing Radiation. *Clinical Cancer Research*, **19**, 3189-3200. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3408>
- [53] Durant, S.T., Zheng, L., Wang, Y., et al. (2018) The Brain-Penetrant Clinical ATM Inhibitor AZD1390 Radiosensitizes and Improves Survival of Preclinical Brain Tumor Models. *Science Advances*, **4**, eaat1719. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aat1719>
- [54] Jucaite, A., Stenckrona, P., Cselényi, Z., et al. (2021) Brain Exposure of the ATM Inhibitor AZD1390 in Humans—A Positron Emission Tomography Study. *Neuro-Oncology*, **23**, 687-696. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa238>
- [55] Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., et al. (2006) Glioma Stem Cells Promote Radioresistance by Preferential Activation of the DNA Damage Response. *Nature*, **444**, 756-760. <https://doi.org/10.1038/nature05236>
- [56] Patties, I., Kallendrusch, S., Böhme, L., et al. (2019) The Chk1 Inhibitor SAR-020106 Sensitizes Human Glioblastoma Cells to Irradiation, to Temozolomide, and to Decitabine Treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **38**, Article No. 420. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1434-2>
- [57] Alexander, B., Supko, J., Agar, N., Ahluwalia, M., Desai, A., Dietrich, J., Kaley, T., Peereboom, D., Takebe, N., Desideri, S., et al. (2018) ACTR-14. Phase I Study of AZD1775 with Radiation Therapy (RT) and Temozolomide (TMZ) in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma (GBM) and Evaluation of Intratumoral Drug Distribution in Patients with Recurrent GBM. *Neuro-Oncology*, **20**, vi13-vi14. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now148.048>
- [58] Wick, W., Weller, M., van den Bent, M., et al. (2014) MGMT Testing—The Challenges for Biomarker-Based Glioma Treatment. *Nature Reviews Neurology*, **10**, 372-385. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.100>
- [59] Wood, R.D., Mitchell, M., Sgouros, J. and Lindahl, T. (2001) Human DNA Repair Genes. *Science*, **291**, 1284-1289. <https://doi.org/10.1126/science.1056154>
- [60] Hegi, M.E., Diserens, A.C., Gorlia, T., et al. (2005) MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, **352**, 997-1003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043331>
- [61] Mellai, M., Monzeglio, O., Piazzini, A., et al. (2012) MGMT Promoter Hypermethylation and Its Associations with Genetic Alterations in a Series of 350 Brain Tumors. *Journal of Neuro-Oncology*, **107**, 617-631. <https://doi.org/10.1007/s11060-011-0787-y>
- [62] Fan, C.H., Liu, W.L., Cao, H., Wen, C., Chen, L. and Jiang, G. (2013) O⁶-Methylguanine DNA Methyltransferase as a Promising Target for the Treatment of Temozolomide-Resistant Gliomas. *Cell Death & Disease*, **4**, e876. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.388>
- [63] Jackson, C.B., Noorbakhsh, S.I., Sundaram, R.K., et al. (2019) Temozolomide Sensitizes MGMT-Deficient Tumor Cells to ATR Inhibitors. *Cancer Research*, **79**, 4331-4338. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3394>
- [64] Middleton, M.R. and Margison, G.P. (2003) Improvement of Chemotherapy Efficacy by Inactivation of a DNA-Repair Pathway. *The Lancet Oncology*, **4**, 37-44. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(03\)00959-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(03)00959-8)
- [65] Quinn, J.A., Jiang, S.X., Reardon, D.A., et al. (2009) Phase II Trial of Temozolomide plus O⁶-Benzylguanine in Adults with Recurrent, Temozolomide-Resistant Malignant Glioma. *Journal of Clinical Oncology*, **27**, 1262-1267.

<https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.8417>

- [66] Hickson, I.D. (1997) Base Excision Repair of DNA Damage. Landes Bioscience and Chapman & Hall, Austin.
- [67] Wu, S., Li, X., Gao, F., de Groot, J.F., Koul, D. and Yung, W.K.A. (2021) PARP-Mediated PARylation of MGMT Is Critical to Promote Repair of Temozolomide-Induced O6-Methylguanine DNA Damage in Glioblastoma. *Neuro-Oncology*, **23**, 920-931. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab003>
- [68] Higuchi, F., Nagashima, H., Ning, J., Koerner, M.V.A., Wakimoto, H. and Cahill, D.P. (2020) Restoration of Temozolomide Sensitivity by PARP Inhibitors in Mismatch Repair Deficient Glioblastoma Is Independent of Base Excision Repair. *Clinical Cancer Research*, **26**, 1690-1699. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-2000>
- [69] Farmer, H., McCabe, N., Lord, C.J., *et al.* (2005) Targeting the DNA Repair Defect in BRCA Mutant Cells as a Therapeutic Strategy. *Nature*, **434**, 917-921. <https://doi.org/10.1038/nature03445>
- [70] Bryant, H.E., Schultz, N., Thomas, H.D., *et al.* (2005) Specific Killing of BRCA2-Deficient Tumours with Inhibitors of Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *Nature*, **434**, 913-917. <https://doi.org/10.1038/nature03443>
- [71] Mateo, J., Lord, C.J., Serra, V., *et al.* (2019) A Decade of Clinical Development of PARP Inhibitors in Perspective. *Annals of Oncology*, **30**, 1437-1447. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz192>
- [72] Ning, J. and Wakimoto, H. (2020) Therapeutic Application of PARP Inhibitors in Neuro-Oncology. *Trends in Cancer*, **6**, 147-159. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.12.004>
- [73] Sulkowski, P.L., Oeck, S., Dow, J., *et al.* (2020) Oncometabolites Suppress DNA Repair by Disrupting Local Chromatin Signalling. *Nature*, **582**, 586-591. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2363-0>
- [74] Wang, Y., Wild, A.T., Turcan, S., *et al.* (2020) Targeting Therapeutic Vulnerabilities with PARP Inhibition and Radiation in IDH-Mutant Gliomas and Cholangiocarcinomas. *Science Advances*, **6**, eaaz3221. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz3221>
- [75] Sim, H.W., McDonald, K.L., Lwin, Z., *et al.* (2021) A Randomized Phase II Trial of Veliparib, Radiotherapy, and Temozolomide in Patients with Unmethylated MGMT Glioblastoma: The VERTU Study. *Neuro-Oncology*, **23**, 1736-1749. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab111>