

**Untersuchung der gesteigerten Zytotoxizität
von Trabectedin
durch Hyperthermie in Tumorzellen**



Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Dominique Harnicek

München, 08. April 2015

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist. Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

München, den.....

.....

(Unterschrift)

Dissertation eingereicht am: 08. April 2015

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juli 2015

1. Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Leonhardt

2. Gutachter: PD Dr. Bettina Bölter

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen November 2011 und März 2015 unter der Leitung von Prof. Rolf D. Issels in der klinischen Kooperationsgruppe „Tumorthherapie durch Hyperthermie“ der medizinischen Klinik und Poliklinik III, Ludwig-Maximilians-Universität München und dem Helmholtz Zentrum München durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	v
Abkürzungen.....	v
Einheiten.....	vii
Zusammenfassung	viii
Summary	x
1 Einleitung	1
1.1 Sarkome	1
1.1.1 Weichgewebesarkome	1
1.1.2 Osteosarkome	3
1.2 Trabectedin	4
1.2.1 Die chemische Struktur von Trabectedin	4
1.2.2 Die Interaktion von Trabectedin mit der DNA.....	5
1.2.3 Zelluläre Effekte der Trabectedin-Behandlung.....	7
1.2.4 Effekte von Trabectedin auf den Tumor und seine Mikroumgebung	8
1.2.5 Trabectedin als Zweitlinientherapie bei Weichgewebesarkomen	8
1.3 Die Hyperthermie zur Krebstherapie	9
1.3.1 Effekte eines Hitzeschocks auf molekularer und zellulärer Ebene	9
1.3.2 Die Hyperthermie in der Klinik	12
1.3.2.1 Die Hyperthermie zur Radiosensitivierung	12
1.3.2.2 Die Hyperthermie zur Chemosensitivierung	12
1.3.3 Methoden und Geräte zur Hyperthermieapplikation.....	13
1.3.4 Die Hyperthermie in der Sarkomtherapie	14
1.4 DNA-Reparatur	15
1.4.1 Die Nukleotidexzisionsreparatur	15
1.4.1.1 Der Mechanismus der Nukleotidexzisionsreparatur.....	15
1.4.1.2 Erkrankungen aufgrund defekter NER-Proteine	17
1.4.2 DNA-Doppelstrangbrüche und ihre Reparatur	17
1.4.2.1 ATM und die Signalisierung von DNA-Doppelstrangbrüchen	18
1.4.2.2 Mechanismus der Homologen Rekombinationsreparatur	19
1.4.2.3 Die Funktion von BRCA2 in der Homologen Rekombinationsreparatur	21
1.4.2.4 Erkrankungen aufgrund defekter HR-Proteine.....	21
1.5 Zielsetzung der Arbeit	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Materialien	23
2.1.1 Geräte	23
2.1.2 Chemikalien.....	24
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	25

Inhaltsverzeichnis

2.1.4 Kits	26
2.1.5 Chemotherapeutikum/Zytostatikum	26
2.1.6 Software	26
2.1.7 Medien und Zellkulturkomponenten	26
2.1.8 Zelllinien	27
2.1.9 Proteine	28
2.1.9.1 Proteinmarker	28
2.1.9.2 Enzyme	28
2.1.9.3 Primäre Antikörper	28
2.1.9.4 Sekundäre Detektionsantikörper	29
2.1.10 Synthetische Oligonukleotide	29
2.1.10.1 Primer für cDNA-Synthese	29
2.1.10.2 Primer für qRT-PCR	29
2.1.10.3 siRNAs (short interfering RNAs)	30
2.1.11 Puffer und Lösungen	31
2.2 Methoden	34
2.2.1 Zellkultur	34
2.2.1.1 Kultivierungsverfahren adhärenter, eukaryotischer Zellen	34
2.2.1.2 Ernte adhärenter Zellen für anstehende Analysen	34
2.2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	34
2.2.1.4 Mykoplasmentest	35
2.2.2 Behandlungen	35
2.2.2.1 Behandlung mit Trabectedin	35
2.2.2.2 Hitzeschockbehandlung	35
2.2.3 Zytotoxizitätsuntersuchungen	36
2.2.3.1 Klonogener Assay	36
2.2.3.2 Analyse des Zellzyklus und des subG1-Bereiches	36
2.2.3.3 Caspase-Aktivitätstest	37
2.2.3.4 Seneszenz-assoziiertes β -Galaktosidase-Test	38
2.2.4 Proteinchemische Methoden	39
2.2.4.1 Proteinisolierung für den Caspase-Aktivitätstest	39
2.2.4.2 Proteinisolierung für SDS-PAGE	39
2.2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	39
2.2.4.4 Vorbereiten der Proteinextrakte für die SDS-PAGE	39
2.2.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
2.2.4.6 Western Blot-Transfer auf PVDF-Membranen	40
2.2.4.7 Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen	40
2.2.4.8 Immunzytochemische Färbungen	40

2.2.4.9 Immunfluoreszenzmikroskopie und Prozessierung der Daten	41
2.2.5 Quantifizierung der Proliferation	41
2.2.5.1 SYBR-Green Assay	41
2.2.5.2 Sensitivitätsstudie	42
2.2.6 RNA-Interferenz durch siRNAs (<i>short interfering RNAs</i>)	42
2.2.6.1 Stilllegen der Genexpression einzelner Genprodukte.....	42
2.2.6.2 Transfektion mit einer siRNA-Library (Hochdurchsatzanalysen).....	43
2.2.7 Quantitative Realtime RT-PCR (qRT-PCR)	44
2.2.8 Statistische Analysen	45
3 Ergebnisse.....	46
3.1 Klonogenes Überleben nach einer kombinierten Trabectedin- und Hitzeschockbehandlung.....	46
3.1.1 Erarbeiten des effektivsten Behandlungsregimes	46
3.1.2 Bestätigung einer Wirkungsverstärkung an STS-Zelllinien.....	50
3.2 Die mRNA Expression von XPG, BRCA1 und ERCC1	52
3.3 Die molekularen Mechanismen zur Wirkungssteigerung von Trabectedin und einem Hitzeschock.....	54
3.3.1 Charakterisierung des Zellzyklusarrest nach Trabectedin und Hitzeschock	54
3.3.2 Quantifizierung der Apoptose	56
3.3.3 Analyse der Seneszenz bei U2Os und SW872 Zellen	58
3.4 Proteinchemische Analyse der DNA-Reparatur.....	61
3.4.1 Die Degradierung von BRCA2 nach einem Hitzeschock bei 41,8°C und 43°C.....	61
3.4.2 Die Quantifizierung des DNA-Schadens durch H2AX-Phosphorylierung	63
3.4.3 Kolokalisation von γ H2AX und RAD51	64
3.5 Die Involvierung von BRCA2 in die thermale Chemosensitivierung.....	65
3.5.1 Das klonogenen Überleben nach einem BRCA2- <i>Knockdown</i> bei U2Os Zellen.....	65
3.5.2 Das klonogene Überleben bei BRCA2-defizienten DLD1 Zellen	69
3.5.3 Zellzyklus- und subG1-Analysen bei DLD1 Zellen	70
3.6 Einfluss der Kombinationstherapie auf Hitzeschockproteine	72
3.7 Die Identifizierung prädiktiver Marker und Kombinationspartner mittels Hochdurchsatzanalysen.....	73
3.7.1 Das Ermitteln der optimalen Behandlungskonzentration.....	73
3.7.2 Hochdurchsatzanalysen mittels Transfektion einer siRNA- <i>Library</i>	75
3.7.3 Validierung der Ergebnisse der Hochdurchsatzanalysen	79
3.7.4 Die Bewertung der Relevanz weiterer Proteine durch Streudiagramme.....	82
4 Diskussion	85
4.1 Die Bestätigung des Wirkprinzips einer kombinierten Trabectedin- und Hitzeschockbehandlung.....	85

4.2 Die mRNA Expression von XPG, BRCA1 und ERCC1 ermöglicht keine Korrelation mit der Toxizität von Trabectedin <i>in vitro</i>.....	87
4.3 Zellzyklusarrest und Zellüberleben nach Trabectedin und einem Hitzeschock ...	88
4.4 Die Hitzeschock-bedingte Reduktion der Assemblierung von DNA-Reparaturfoci und Erhöhung des DNA-Schadens.....	91
4.5 Die BRCA2-Degradierung ist in die thermale Chemosensitivierung involviert	92
4.6 Die Expression von Hitzeschockproteinen wird durch eine Trabectedin/Hitzeschock Kombination nicht beeinflusst	93
4.7 Die Auswertung der Daten aus den Hochdurchsatzanalysen	95
4.7.1 Die Kombination von Trabectedin mit DNA-schädigenden Behandlungen.....	95
4.7.2 Die Identifizierung prädiktiver Marker und weiterer Kombinationspartner.....	96
4.7.3 Proteine der Homologen Rekombinationsreparatur sind an der thermalen Chemosensitivierung maßgeblich beteiligt.....	100
4.8 Fazit und Ausblick	101
5 Referenzen.....	104
5.1 Literaturreferenzen	104
5.2 Internetreferenzen.....	114
6 Anhang.....	115
Abbildungsverzeichnis.....	115
Tabellenverzeichnis.....	117
Publikationen	118
Fachartikel.....	118
Kurzbeiträge und Abstracts.....	118
Poster.....	119
Vorträge.....	120
Kongressteilnahmen	120
Lebenslauf.....	121
Danksagungen	122
Abkürzungen aus Tab. 3.3	123

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

(-/-)	Homozygot <i>Knockout</i>
AA	Acrylamid, Polyacrylamid
Akt	<i>alias</i> Proteinkinase B
Asp	Asparaginsäure
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated</i>
BER	Basenexzisionsreparatur
BRCA1	<i>breast cancer 1, early onset</i>
BRCA2	<i>breast cancer 2, early onset</i>
C	Kohlenstoff
C/N myc	<i>avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (C,N)</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNS
C-erbB2	Erb-b2 Rezeptortyrosinkinase 2
CHK1/2	<i>checkpoint kinase 1/2</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CtIP	<i>CtBP interacting protein</i>
CSA/B	Cockayne Syndrom Protein A/B
CXCL-8	Chemokin Ligand 8
DDB 1/2	<i>DNA damage binding protein 1/2</i>
ddH ₂ O	Demineralisiertes Wasser
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure (DNS)
DSB	<i>DNA double-strand break</i> , DNA-Doppelstrangbruch
dsDNA	<i>double stranded DNA</i> , doppelsträngige DNA
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERCC1	<i>excision repair cross-complementation group 1</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FA	Fanconi Anämie DNA-Reparaturweg
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FANCA-I	Fanconi-Protein, Komplementationsgruppe A-I
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G1/2-Phase	<i>Gap 1/2</i> , von Lücke
Glu	Glutaminsäure

Abkürzungsverzeichnis

H	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hHR23B	<i>human homologue of the yeast protein RAD23</i>
His	Histidin
IgG	Immunglobulin G
IL-6	Interleukin 6
MDM2	<i>mouse double minute 2 homolog</i>
MDR1	<i>multidrug resistance protein 1</i>
MRE11	<i>meiotic recombination 11</i>
mTOR	<i>mammalian target of Rapamycin</i>
NBS1	<i>nijmegen breakage syndrom 1</i>
NHEJ	<i>Non homologous end joining</i>
O	Sauerstoff
ORC2	<i>origin recognition complex subunit 2</i>
p38	p38 Kinase
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
ras	<i>rat sarcoma</i>
Rb	Retinoblastoma
RFC	<i>replication factor C</i>
RHT	Regionale Hyperthermie
RPA	Replikationsprotein A
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure (RNS)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S-Phase	Synthese-Phase
ssDNA	<i>single stranded DNA</i> , einzelsträngige DNA
TFIIH	Transcription Factor II H
TP53	Tumor protein 53

Abkürzungsverzeichnis

ü.N.	über Nacht
Val	Valin
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WB	Western Blot
XP A-G	Xeroderma pigmentosum, Komplementationsgruppe A-G
XRCC2/3	<i>X-ray repair cross-complementing protein 2/3</i>

Einheiten

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
cm	Zentimeter
h	Stunde(n)
kDa	Kilodalton
M	Molar
m ²	Quadratmeter
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
nxg	n-fache Erdbeschleunigung
pH	-log [H ⁺]
s	Sekunde(n)
V	Volt
v/v	Volumen per Volumen
w/v	Gewicht per Volumen

Zusammenfassung

Adulte Weichgewebesarkome (engl. *soft tissue sarcoma*; STS) werden zu einer Gruppe seltener maligner und teilweise aggressiver Tumoren klassifiziert, die eine Tendenz zur Bildung von hämatogenen Fernmetastasen aufweisen. Die Kombination der Regionalen Hyperthermie mit einer Chemotherapie erwies sich in vorangegangenen Studien als eine vielversprechende Behandlungsoption beim lokalisierten Hochrisiko STS. Es wurde gezeigt, dass eine neoadjuvante Chemotherapie mit Regionaler Hyperthermie bei diesen Sarkomen das Tumoransprechen, das lokale progressionsfreie und das krankheitsfreie Überleben im Vergleich zu einer alleinigen Chemotherapie signifikant verbessert. Auf zellulärer Ebene induziert ein Hitzeschock (HS) bei klinisch relevanten Temperaturen (41,8°C/43°C) unter anderem eine temporäre Defizienz der Homologen Rekombinationsreparatur (HR), einem essentiellen Mechanismus für die fehlerfreie Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB). Dies steht im Zusammenhang mit einer hitzeinduzierten proteosomalen Degradierung von BRCA2, einer unerlässlichen Komponente der HR.

Trabectedin (Tr) ist eine antiproliferativ wirksame Substanz, die ursprünglich aus dem marinen Tunikat *Ecteinascidia turbinata* isoliert wurde. Die vielfältigen zytotoxischen Aktivitäten von Tr umfassen neben dem Interferieren mit der aktivierten Transkription und der Modulation der Tumor-Mikroumgebung hauptsächlich die Induktion von DSBs. Seit 2007 wird Tr in der Zweitlinientherapie zur Behandlung refraktärer STS, sowie bei Patienten eingesetzt, bei denen die Erstlinientherapie (Ifosfamid und/oder Doxorubicin) nicht angewendet werden kann.

In Anbetracht der hitzeinduzierten Inaktivierung von BRCA2 und den DNA schädigenden Eigenschaften von Tr wurde in dieser Arbeit untersucht, ob und wie die Hyperthermie zu einer Wirkungsverstärkung der zytotoxischen Effekte von Tr beitragen kann.

Tr bewirkt *in vitro* bei Zelllinien unterschiedlicher Sarkomentitäten (U2Os, SW872, SW982) eine dosisabhängige Reduktion des klonogenen Überlebens, das durch einen HS zusätzlich verstärkt wird. Die erhöhte antiproliferative Aktivität von Tr nach einem HS wird als thermale Chemosenitivierung definiert. Zudem konnte durch die Analyse der DNA-Verteilung bei U2Os und SW872 Zellen eine Intensivierung und Verlängerung der Tr-induzierten G2/M-Blockade nachgewiesen werden. Darüber

hinaus wurden Zelllinien-spezifische Unterschiede bezüglich einer behandlungsinduzierten Apoptoseinduktion oder Senseszenzantwort identifiziert. SW872 Zellen weisen einen dosis- und temperaturabhängigen Anstieg des Anteiles apoptotischer Zellen auf, der mit einer starken Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 einhergeht. Dem entgegen gehen U2Os Zellen in eine ausgeprägte behandlungsinduzierte zelluläre Seneszenz über. Anhand der quantitativen Analyse Tr-induzierter γ H2AX Foci hat sich ein relevanter Anstieg an DSBs durch eine zusätzliche Hitzeexposition herausgestellt, der eine Beeinträchtigung der BRCA2-vermittelten vollständigen Assemblierung der DNA-Reparaturfoci vermuten lässt.

Die Hypothese einer thermalen Chemosensitivierung gegenüber Tr durch eine hitzeinduzierte HR-Defizienz – insbesondere im Rahmen der hitzeinduzierten BRCA2 Degradierung – wurde zudem durch das Ausbleiben der hitzebedingten Verstärkung der Tr-induzierten Zytotoxizität bei BRCA2-defizienten Zellen bekräftigt. Darüber hinaus wurde durch Hochdurchsatzanalysen bestätigt, dass eine hitzevermittelte, erhöhte antiproliferative Aktivität von Tr nach einem *Knockdown* zahlreicher HR-spezifischer Komponenten ausbleibt.

Durch Hochdurchsatzanalysen sowie durch anschließende Validierungsexperimente wurden Proteine identifiziert, die sich als relevant für weitere präklinische und klinische Untersuchungen herausgestellt haben. Die Proteine BRCA1, PARP1 und CHEK1 stellen dabei potentielle molekulare Marker für ein Tumoransprechen auf die Kombinationstherapie von Tr und Hyperthermie dar. Deren Inhibition erwies sich zudem als eine weitere Strategie, um die Effektivität der ursprünglichen Behandlung zusätzlich zu erhöhen. Darüber hinaus wurde die Funktion von FANCD2 als prädiktiver Marker und von ERCC1 als Resistenzmarker für das Therapieansprechen einer alleinigen Tr-Behandlung *in vitro* bestätigt.

Die herausgearbeitete thermale Chemosensitivierung gegenüber Tr mit Hyperthermie durch die induzierte HR-Defizienz mittels passagerer BRCA2 Degradierung (induzierte synthetische Letalität) sowie die Identifizierung weiterer Proteine, deren medikamentöse Inhibition die Effektivität der Kombinationsbehandlung zusätzlich erhöhen könnte, eröffnen neue Möglichkeiten in der Therapie solider Tumoren.

Summary

Adult soft tissue sarcomas (STS) belong to a group of rare malignant tumors of mesenchymal origin with a tendency to metastasize and a partially aggressive potential. It has been shown, that the use of Regional Hyperthermia in addition to neoadjuvant chemotherapeutic standards of care significantly improves tumor response, progressionfree and diseasefree survival in comparison to chemotherapy alone in localized high risk STS. On the cellular level a heat shock (HS) at clinical relevant temperatures (41.8°C/43°C) decreases BRCA2-levels by proteosomal degradation, which is an orchestrating protein of the Homologous Recombination repair (HR), an essential repair mechanism responsible for the repair of DNA double-strand breaks (DSB).

Trabectedin (Tr) is an agent which was isolated originally from the marine tunicate *Ecteinascidia turbinata*. Besides of interfering with activated transcription and modulation of the tumor microenvironment, the main cytostatic activity of Tr is anchored in the induction of DSBs. Since 2007 Tr is employed as a treatment option for STS in the second line therapy or for patients who are unsuited to receive the chemotherapeutic regimen of ifosfamide and/or doxorubicin.

In view of the heat-induced inactivation of BRCA2 and the DNA-damaging properties of Tr, we hypothesized that hyperthermia might enhance the cytotoxic effects of Tr.

Analysis of clonogenic survival of different sarcoma cell lines (U2Os, SW872, SW982) reveals a dose-dependent reduction which is further augmented by HS. The enhancement of the antiproliferative activity of Tr by HS is termed thermal chemosensitization. Moreover, cell cycle analyses in U2Os and SW872 cells elucidate a heat-mediated amplification and extension of the Tr-induced G2/M-block. Furthermore, the combination treatment of Tr and HS causes a dose-dependent increase in the number of apoptotic cells which is paralleled by a strong activation of the effector caspases -3 and -7 in SW872 cells. However U2Os cells show a treatment-related strong senescence response, which is further augmented by HS, indicating different outcomes of the treatment, dependent of the analyzed cell line. The analysis of the number of Tr-induced γ H2AX foci also revealed a remarkable increase in DSBs after an additional HS, suggesting the impaired BRCA2-mediated complete assembly of DNA-repair foci.

The hypothesis of a thermal chemosensitization to Tr by a heat-induced HR-deficiency - in particular by heat mediated BRCA2 degradation - was further confirmed by the missing thermal chemosensitization in BRCA2-deficient cells. Moreover, high throughput analyses also revealed a reduction of HS-mediated enhancement of Tr efficacy after knockdowns of several HR-specific components.

By high throughput analyses and subsequent validation experiments, the proteins BRCA1, PARP1 and CHEK1 were identified to be relevant as potential predictive molecular markers for tumor response after combined Tr and Hyperthermia treatment. Furthermore, the inhibition of those proteins turned out to be a strategy to further improve treatment efficacy. Apart from this, the function of FANCD2 as a predictive marker for tumor response after a single Tr treatment and of ERCC1 for resistance towards Tr has been confirmed.

The observed thermal chemosensitization of Tr by hyperthermia caused by induced HR deficiency by heat-mediated BRCA2 degradation (induced synthetic lethality) and the identification of further proteins which may represent potential additional combination partners may open new opportunities in the treatment of solid tumors.

1 Einleitung

1.1 Sarkome

Sarkome sind eine genetisch und histologisch heterogene Gruppe bösartiger solider Tumoren mesenchymalen Ursprungs (Eriksson 2010; Somaiah & von Mehren 2012). Bei Erwachsenen treten Sarkome mit etwa 1% aller malignen Tumorerkrankungen selten auf, wohingegen sie 15% aller pädiatrisch malignen Tumoren ausmachen (Demetri et al. 2010; Joseph et al. 2014).

Allgemein werden Sarkome in zwei Gruppen unterteilt: In Weichgewebesarkome (Fett, Muskel, Blutgefäße und andere Bindegewebe; STS, engl. *soft tissue sarcoma*) und Osteosarkome (aus der Gruppe der Knochensarkome) (Demetri et al. 2010).

1.1.1 Weichgewebesarkome

Weichgewebesarkome (STS) sind mit mehr als 50 histologischen Subtypen eine sehr heterogene Gruppe von malignen Tumorerkrankungen (Grosso et al. 2009; Eriksson 2010). Hinsichtlich ihrer Morphologie werden die einzelnen STS-Entitäten zu dem Gewebe kategorisiert, dem sie mikroskopisch ähneln (Mastrangelo et al. 2012). In mehr als der Hälfte aller Fälle (59%) sind STS an den Extremitäten lokalisiert, treten aber auch am Rumpf (19%), im Retroperitoneum (15%) und im Kopf-Hals-Bereich (9%) auf (Cormier & Pollock 2004).

Als Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von STS werden eine frühere Bestrahlung des betroffenen Gewebes oder auch eine Exposition gegenüber bestimmten Chemikalien angesehen. Auf molekularer Ebene können Sarkome durch die Amplifikation bestimmter Protoonkogene (MDM2, N-myc, c-erbB2 und Mitglieder der ras-Familie) sowie durch Translokationen, die bestimmte Protoonkogene betreffen, ausgelöst werden. Weitere Ursachen stellen auch Störungen des Akt/mTOR Signalweges (Blay 2011) und Mutationen in den Tumorsuppressorgenen *TP53* und *Rb* dar, welche in 30-60% aller auftretenden STS vorzufinden sind (Cormier & Pollock 2004).

Die Inzidenz der STS-Neuerkrankungen liegt bei 3,3 Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr bei einer Mortalität von 1,3 pro 100.000 (Lopez et al. 2014). Aufgrund des relativ häufigen Auftretens von Metastasen oder Lokalrezidiven überleben durchschnittlich nur 50-60% der Patienten die ersten fünf Jahre nach der

Diagnosestellung (Cormier & Pollock 2004; Grosso et al. 2009). Ein geschlechterspezifisches gehäuftes Auftreten wird nicht beobachtet.

Das Erkrankungsstadium bei STS wird mit Hilfe der TNM-Klassifikation und der darauf aufbauenden UICC-Klassifikation eingestuft. Eine höhere Klassifikation geht dabei mit einer schlechteren Prognose einher. Aufgrund der Tumorgöße wird in T1 Läsionen (< 5 cm) und T2 Läsionen (\geq 5 cm) eingeteilt, wobei zusätzlich zwischen einer oberflächlichen (T1 oder 2 „a“) oder tiefen Lage (T1 oder 2 „b“) in Beziehung zur Körperfaszie unterschieden wird (Cormier & Pollock 2004). Mit N und M werden im TNM-System Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen kodiert. Ein daneben weiterer sehr wichtiger prognostischer Faktor ist der histopathologische Differenzierungsgrad (*Grading*). Nach dem *Grading*-System der FNCLCC (*Fédération Nationale des Centres de Lutte le Cancer*) werden STS in *low-grade* (G1-; prognostisch günstig) oder *high-grade* (G2- oder G3-; prognostisch ungünstig) Tumoren eingestuft. Die herangezogenen Kriterien umfassen die zytomorphologische Differenzierung, die Mitoserate, den Nekroseanteil und die histologische Subentität des Tumors. Bei unterschiedlich differenzierten Arealen innerhalb der Tumormasse wird für das *Grading* der ungünstigste Tumorbezirk berücksichtigt (Coindre 2006).

Die heutzutage einzige kurative Therapieoption bei lokalisierter Erkrankung ist eine vollständige operative Entfernung des Tumorgewebes mit ausreichenden tumorfreien Resektionsrändern. Da STS meist spät diagnostiziert werden, ist eine vollständige Resektion oftmals nicht möglich. Bei den meisten T2-Tumoren mit G2- oder G3-*Grading* ist eine multimodale Therapie bestehend aus Chemotherapie, Strahlentherapie und Operation indiziert.

Seitens der systemischen medikamentösen Therapie haben die anthracyclin-basierten chemotherapeutischen Regime aktuell den höchsten Stellenwert (Eriksson 2010). Die Indikation zu einer systemischen Therapie besteht als

- neoadjuvante (präoperative) Therapie zur eventuellen Verkleinerung der Tumorgöße, um bei primär nicht resektablen Tumoren eine Operation zu ermöglichen oder um das Operationsergebnis bei primär resektablen Tumoren zu verbessern. Außerdem sollen eventuell radiologisch nicht erfassbare lokoregionale Mikrometastasen behandelt werden.

- adjuvante (postoperative) Therapie bei Vorliegen von wesentlichen Risikofaktoren (Großer Tumor, hohes *Grading*, tiefe Lage im Bezug zur Faszie) und zur Senkung des Risikos eines lokalen oder systemischen Rezidives.
- palliative Therapie bei metastasierter Erkrankung.

Die höchste Effektivität in der Erstlinientherapie bei STS ist bisher für die Zytostatikakombination aus Doxorubicin und Ifosfamid beschrieben (Eriksson 2010).

Bei Therapieversagen kommen in der Zweitlinientherapie die Substanzen Trabectedin (Blay et al. 2014), Pazopanib (van der Graaf et al. 2011) oder Dacarbacin (Fayette et al. 2009), Gemcitabin oder Docetaxel zum Einsatz (Maki et al. 2007). Das Zytostatikum Trabectedin ist seit 2007 von der Europäischen Kommission auf Empfehlung der Europäischen Arzneimittel-Agentur EMA (engl. **European Medicines Agency**) zur Behandlung refraktärer STS zugelassen (Samuels et al. 2013).

Unter Beachtung der Risikofaktoren und der zu erwartenden Nebenwirkungen sollte eine Strahlentherapie in die Therapie lokal fortgeschrittener STS entweder neoadjuvant oder adjuvant nach Möglichkeit integriert werden (Eriksson 2010; Somaiah & von Mehren 2012; Lopez et al. 2014).

1.1.2 Osteosarkome

Osteosarkome sind maligne Neoplasien, die mit einer Osteoidproduktion in Verbindung mit mesenchymalen Zellen einhergehen (Luetke et al. 2014). Sie treten gehäuft in zwei unterschiedlichen Altersklassen auf, zum einen bei überwiegend männlichen Jugendlichen und jungen Erwachsenen (15 – 29 Jahre) und zum anderen in der Altersgruppe über 60 Jahren. Die Ursachen für die Entstehung von Osteosarkomen sind unbekannt, es wird allerdings angenommen, dass ein schnelles Knochenwachstum, eine frühere Strahlenexposition und eventuelle genetische Einflüsse wie z.B. Mutationen im *TP53*- oder *Rb*-Gen involviert sind (Niforou et al. 2008). Osteosarkome entstehen vor allem an den langen Röhrenknochen, wie dem Femur (40 %), der Tibia (20 %) und dem Humerus (10 %) (Joseph et al. 2014; Luetke et al. 2014). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung haben sich in vielen Fällen bereits Metastasen gebildet, die zu 90 % in der Lunge lokalisiert sind.

Die klassische Therapie umfasst eine neoadjuvante Chemotherapie, gefolgt von einer operativen Resektion des Tumors und einer anschließenden adjuvanten

Chemotherapie. Als effektivste Zytostatika haben sich hochdosiertes Methotrexat, Doxorubicin, Cisplatin und Ifosfamid herausgestellt. Osteosarkome weisen eine ausgeprägte Strahlenresistenz auf. Dennoch kann eine Strahlentherapie unter Umständen zusätzlich zur Wirkungssteigerung einiger chemotherapeutischer Agenzien wie dem Platinsalz Cisplatin und dem alkylierenden Agens Ifosfamid, das zur Gruppe der Oxazaphosphorine gehört, eingesetzt werden (Luetke et al. 2014).

1.2 Trabectedin

Die antineoplastisch wirksame Substanz Trabectedin (Abk. Tr, Ecteinascidin 743, Handelsname Yondelis®) ist aus einer neuen Strategie zur Findung neuartiger Wirkstoffe im Kampf gegen Tumoren hervorgegangen, bei der bioaktive Substanzen aus natürlich vorkommenden Organismen auf mögliche antiproliferative und zytotoxische Eigenschaften für die Entwicklung neuer Tumormedikamente untersucht wurden. Der Wirkstoff Tr wurde bereits 1969 aus dem marinen Tunikat *Ecteinascidia turbinata* isoliert (Erba et al. 2001; Angelo et al. 2013). Diese zu den Seescheiden klassifizierten Meerestiere sind im karibischen Meer vorzufinden, sowie auch vereinzelt in den wärmeren Regionen des Atlantik und des Mittelmeers (Ghielmini et al. 1998; Cuevas & Francesch 2009). Seit 1996 wird Tr komplett synthetisch hergestellt (Cuevas & Francesch 2009; D'Incalci & Galmarini 2010; Gounaris et al. 2014).

1.2.1 Die chemische Struktur von Trabectedin

Tr gehört zu der Gruppe der Tetrahydroisochinolin-Alkaloide und setzt sich strukturell aus drei Untereinheiten zusammen. Den aus Tetrahydroisoquinolinderivaten bestehenden Untereinheiten A und B, die DNA-bindende Eigenschaften besitzen und zusätzlich aus der Untereinheit C, einem Tetrahydro- β -carbolin Ring, der bestimmte Proteine binden kann.

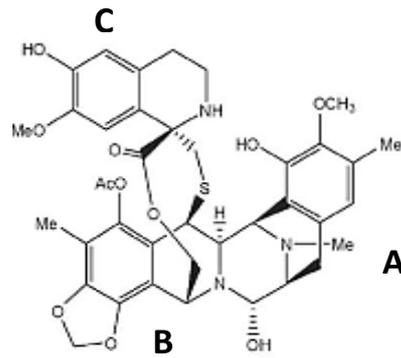


Abb. 1.1 links: Aquakultur von *Ecteinascidia turbinata* (Cuevas & Francesch 2009); rechts: Strukturformel von Tr (nach D’Incalci & Galmarini 2010)

1.2.2 Die Interaktion von Trabectedin mit der DNA

Tr bindet als alkylierendes Agens an der kleinen Furche der DNA innerhalb GC-Tripletts mit einer Sequenzpräferenz von 5’-AGC, 5’-GGC und 5’-GGG (Zewail-Foote & Hurley 1999). Dort entsteht ein kovalentes Addukt am N₂ von Guanin. Durch eine zusätzliche Bindung mit einer bis zwei Basen des komplementären Strangs durch Wasserstoffbindungen ähnelt das durch Tr entstandene DNA-Addukt einem *Interstrand Crosslink* (ICL) (Casado et al. 2008; Martínez et al. 2013; D’Incalci et al. 2014). Die Bindungsposition unterscheidet sich von der anderer alkylierender Agenzien, die für gewöhnlich am N₇ oder O₆ von Guanin binden. Die Bindung von Tr induziert eine Krümmung der DNA zur großen Furche hin und eine Weitung der kleinen Furche (Cassier et al. 2008; Cuevas & Francesch 2009). Die C-Untereinheit ist an dieser Reaktion nicht beteiligt und ragt aus der DNA heraus. Dort kann sie mit DNA-bindenden Proteinen interagieren, vor allem mit Transkriptionsfaktoren und DNA-Reparaturproteinen wie z.B. XPG (Cuevas & Francesch 2009; D’Incalci & Galmarini 2010), einer Endonuklease der Nukleotidexzisionsreparatur (NER).

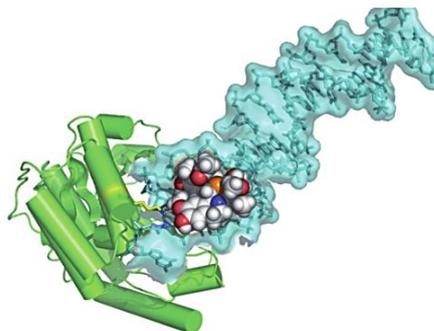


Abb. 1.2 DNA-Tr-XPG Komplex (Cuevas & Francesch 2009)

In vitro Analysen haben gezeigt, dass die DNA-Reparaturmechanismen der NER und der Homologen Rekombinationsreparatur (HR) für die Toxizität von Tr von besonderer Bedeutung sind. Der exakte Wirkmechanismus von Tr wurde bisher nicht im Detail aufgeklärt, es wird allerdings angenommen, dass Tr zusammen mit der DNA und dem COOH-Terminus von XPG einen Ternärkomplex ausbildet, der die Transkriptionsgekoppelte NER (TC-NER) zur Beseitigung des Adduktes blockiert. Durch die Rekrutierung weiterer Proteine der NER-Maschinerie an die Alkylierungsstelle entstehen toxische Proteinkomplexe, die letztendlich während der S-Phase des Zellzyklus zu DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) prozessiert werden und in einer G2/M-Blockade des Zellzyklus resultieren. Die HR ist das wichtigste Reparaturprogramm für DSBs in der S-Phase und G2-Phase. Ebenso scheint die Replikationsgabel während der S-Phase durch den Ternärkomplex blockiert zu werden, was ebenfalls zu der Entstehung von DSBs führt. (Takebayashi et al. 2001; Herrero et al. 2006; Cuevas & Francesch 2009). Das Modell dieses Wirkmechanismus wird durch die Beobachtungen unterstützt, dass NER-defiziente Tumorzellen eine reduzierte Sensitivität gegenüber Tr aufweisen (Damia et al. 2001; Takebayashi et al. 2001), wohingegen HR-defiziente Zellen ausgesprochen sensitiv auf Tr reagieren (Soares et al. 2007; Tavecchio et al. 2008; D’Incalci & Galmarini 2010). Darüber hinaus wurden in Zellkulturexperimenten DSBs nach einer Tr Behandlung mehrfach nachgewiesen (Soares et al. 2007; Tavecchio et al. 2008; Guirouilh-Barbat et al. 2008).

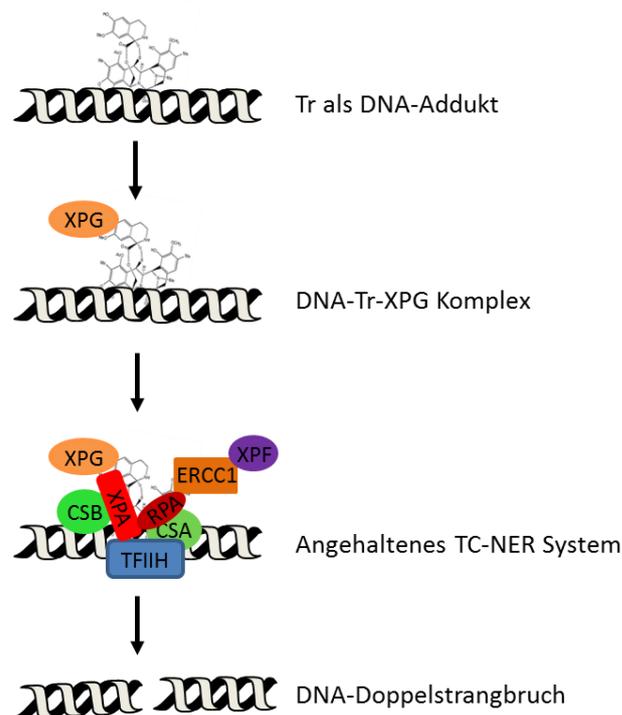


Abb. 1.3 Wirkmechanismus von Tr Tr bindet an der kleinen Furche der DNA an GC-Triplets und veranlasst eine Krümmung des DNA-Stranges in Richtung der großen Furche. XPG bindet als Komponente der TC-NER an dem Addukt. Weitere Proteine der NER-Maschinerie werden rekrutiert und bilden einen toxischen Proteinkomplex, der im weiteren Verlauf in der S-Phase des Zellzyklus in der Bildung von DSBs resultiert.

Die Bedeutung der NER und der HR für die Effektivität von Tr, die durch *in vitro* Analysen ermittelt wurde, entsprechen zudem Beobachtungen aus klinischen Untersuchungen. In einer retrospektiven Analyse von STS-Biopsien von Patienten, die eine Tr-Behandlung erhalten haben, korrelierten hohe mRNA-Werte an XPG und niedrige an BRCA1 (HR spezifisch) mit einem positiven klinischen Verlauf in Bezug auf das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben (Schöffski et al. 2011). Zusätzlich wurde in einer retrospektiven Analyse, die sich mit dem Genstatus relevanter Proteine beschäftigte gezeigt, dass eine hohe Expression von ERCC1, eine hohe Expression des häufigen XPG-Allels (Asp) in Bezug auf den Asp1104His Polymorphismus und das Vorliegen eines bestimmten BRCA1 Haplotypen ebenfalls mit einem positiven klinischen Ansprechen assoziiert sind (Italiano et al. 2011).

1.2.3 Zelluläre Effekte der Trabectedin-Behandlung

Neben den direkten Wirkungen an der DNA inhibiert Tr Promotor-spezifisch die Induktion einiger für die Proliferation relevanter Gene, wie p21, c-Jun, c-Fos und MDR1 (Simoens et al. 2003), sowie die Expression von Hsp70 durch das Interferieren mit NF- κ B (engl. *Nuclear Factor Y*), das unter normalen Bedingungen zusammen mit c-Myc und CBF (oder CEBP ζ , engl. CCAAT/enhancer binding protein ζ) einen Komplex bildet (Taira et al. 1999). Dieser induziert die Genexpression von Hsp70 durch das Binden an die CCAAT-Box in der Promoterregion (Minuzzo et al. 2000; Kabe et al. 2005).

Die transkriptionshemmende Eigenschaft - im Übrigen ausschließlich auf die aktivierte Transkription (Jimeno et al. 2004) - unterscheidet die Wirkungsweise von Tr erneut von der anderer zytotoxischer Agenzien, durch die meist ausschließlich proliferierende Zellen betroffen sind (Guirouilh-Barbat et al. 2008).

Zudem induziert Tr bei manchen Tumorentitäten - wie dem myxoiden Liposarkom - die Tumorzellendifferenzierung (Gounaris et al. 2014). Tr inhibiert die Aktivierung von MDR (engl. *multidrug resistance*) Signalwegen (Jimeno et al. 2004) und der Einsatz hoher Konzentrationen resultiert in der Disorganisation des Zusammenbaus von Mikrotubuli und der Inhibition der Topoisomerase I (Erba et al. 2001).

1.2.4 Effekte von Trabectedin auf den Tumor und seine Mikroumgebung

Die zytostatische Wirkung von Tr beschränkt sich nicht nur auf proliferierende Zellen. Es wurde berichtet, dass auch Monozyten und Makrophagen – die als nur wenig sensitiv gegenüber DNA-schädigenden Agenzien angesehen werden – selektiv depletiert werden (Germano et al. 2013; D’Incalci et al. 2014). Es wurde ebenfalls beobachtet, dass Tr die Synthese proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wie IL-6, CCL2, CXCL-8, Angiopoietin 2 und VEGF vermindert, die sowohl von Monozyten und Makrophagen sowie von den Tumorzellen selbst sekretiert werden. Hierdurch vermindert Tr neben der lokalen Entzündungsreaktion auch die Angiogenese im Tumor (Allavena et al. 2005; Angelo et al. 2013; D’Incalci et al. 2014).

1.2.5 Trabectedin als Zweitlinientherapie bei Weichgewebesarkomen

Mit einer antiproliferativen Wirkung bei malignen Tumoren des Ovars, der Prostata, der Lunge, der Brust, bei Melanomen, Osteosarkomen und bei pädiatrischen Tumoren zeigt Tr ein breites Wirkungsspektrum bei unterschiedlichen Tumorentitäten. Die stärkste antineoplastische Aktivität weist Tr allerdings bei STS auf (Damia et al. 2001; Cuevas & Francesch 2009; Angelo et al. 2013). Tr erhielt 2007 in der europäischen Union die Zulassung als Zweitlinientherapie bei Patienten mit refraktären STS nach einer vorangegangenen Anthracyclin- und Ifosfamid-haltigen Chemotherapie, oder für Patienten bei denen diese Wirkstoffe nicht eingesetzt werden können. Im Jahr 2009 erhielt Tr in Kombination mit pegyliertem liposomalem Doxorubicin ebenfalls eine Zulassung für die Zweitlinientherapie bei refraktären Platin-sensitiven Ovariakarzinomen (D’Incalci & Galmarini 2010; Germano et al. 2013).

Die Verabreichung von Tr erfolgt als eine 24-stündige Infusion (1,5 mg/m²) in dreiwöchigen Intervallen (Cassier et al. 2008). Die Therapie zeichnet sich durch eine hohe Rate der Wachstumshemmung (ca. 40 - 45 %) und eine niedrige Remissionsrate (5%) bei einer relativ guten Verträglichkeit aus (Samuels et al. 2013).

1.3 Die Hyperthermie zur Krebstherapie

Zur Behandlung von Krebserkrankungen existieren generell drei klassische Strategien: Eine operative Entfernung des Tumorgewebes, eine Radiotherapie und eine Chemotherapie (Bettaieb et al. 2013). Diese drei Therapieoptionen werden je nach Erkrankungsfall separat, oder in Kombination eingesetzt. Trotz dieser Maßnahmen und vielfältiger Zytostatika ist die jährliche Zahl der Krebstoten sehr hoch, die sich allein im Jahr 2012 in Deutschland auf 228.289 (<http://de.statista.com>) belief. Aufgrund des mäßigen Erfolges der konventionellen Behandlungsoptionen wurden im Laufe der letzten Jahrzehnte diverse Alternativ- und Zusatzstrategien entwickelt, von denen die Hyperthermie einen erfolgsversprechenden Ansatz darstellt.

1.3.1 Effekte eines Hitzeschocks auf molekularer und zellulärer Ebene

Die Toxizität einer Hitzeexposition hängt von der angesetzten Temperatur und der Dauer ab. Dabei sind *in vitro* Variationen innerhalb unterschiedlicher Zelllinien und auch innerhalb der Zellzyklusphasen einer Zelllinie beobachtet worden. Die stärkste Hitzesensitivität liegt während der S-Phase des Zellzyklus vor (Westra & Dewey 1971). Bei einer Exposition gegenüber Temperaturen $\geq 41^{\circ}\text{C}$ reagieren Zellen unter anderem mit der Induktion von Hitzeschockproteinen (HSP's), die zur Ausbildung einer transienten Thermotoleranz beitragen können und weitere hitzevermittelte Effekte in dieser Phase mildern können (Issels 2008; Bettaieb et al. 2013).

HSP's wie beispielsweise Hsp70 und Hsp90 sind molekulare Chaperone, die insbesondere bei zellulären Stresssituationen eine essentielle Rolle bei der Faltung und Entfaltung der Sekundärstruktur von Proteinen und dem Zusammenschluss von Multiproteinkomplexen einnehmen. Zudem sind konstitutiv exprimierte HSP's bei der Zellzykluskontrolle und dem Schutz von Zellen gegen Auswirkungen von Zellstress und Apoptose involviert (Li & Srivastava 2004; Blagosklonny 2002).

Hsp70 (Molekulargewicht 70 kDa) wird in der G1- und S-Phase des Zellzyklus exprimiert, kann aber durch zellulären Stress wie z.B. Hitze, sowie durch einige Onkogene wie c-Myc und p53 zellzyklusunabhängig induziert werden (Taira et al. 1999). Neben der Unterstützung bei der Faltung neu synthetisierter und nicht nativer Proteine interagiert Hsp70 mit Schlüsselregulatoren aus Signaltransduktionswegen zur Kontrolle der zellulären Homöostase, der Proliferation, Differenzierung und der Apoptose (Mayer & Bukau 2005). Es bildet mitunter zusammen mit Hsp90 einen

Multichaperonkomplex, der für die Zellviabilität von extremer Bedeutung ist (Wegele et al. 2004).

Hitzeinduziertes Hsp70 weist daneben immunstimulatorische Eigenschaften auf. Bei einem subletalen HS wird Hsp70 auf der Zelloberfläche einiger Tumorzellen exprimiert, was eine verstärkte Lyse durch NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) zur Folge hat (Jolesch et al. 2012). Induzieren Temperaturen eines letalen HS die Nekrose der Zellen, geht das mit der Freisetzung von zellulären Bestandteilen wie Hsp70 und anderen HSP-Peptid-Komplexen einher (Issels 2008), die das Immunsystem durch T-Zellaktivierung weiter stimuliert (Sauter et al. 2000; Noessner et al. 2002).

Hsp90 (Molekulargewicht 90 kDa) wird ubiquitär exprimiert und nimmt substratspezifisch eine zentrale Rolle bei der Regulation von Signaltransduktionskaskaden und der Hormonantwort ein (Prodromou et al. 1997; Blagosklonny 2002; Fujita et al. 2002) und agiert ebenfalls antiapoptotisch (Young 2001; Fujita et al. 2002). Unter nicht-physiologischen Bedingungen wurde eine verstärkte Expression von Hsp90-Proteinen beobachtet (Redaelli et al. 2001).

Liegt die Temperatur des HS höher als im subletalen Bereich (40°C) und oberhalb eines zellspezifischen Schwellenwerts (41°C – 43°C) findet eine stärkere Schädigung der Zellen statt. Auf molekularer Ebene kommt es zur Denaturierung von nukleären und zytosolischen Proteinen sowie Membranproteinen, was zum Funktionsverlust der betroffenen Proteine und zur Ansammlung von intrazellulären Aggregaten denaturierter Proteine führt. Es kommt unter anderem zu einer Inhibition der DNA-Reparatur und einer Störung der Regulation des Zellzyklus wegen nachweisbaren Veränderungen in der Chromatinstruktur. Ein HS, dessen Temperatur über dem Schwellenwert, also im letalen Bereich liegt, induziert bei Zellen direkt Apoptose oder Nekrose (Harmon et al. 1990; Yonezawa et al. 1996; Milani & Noessner 2006).

Durch einen HS werden Apoptose-stimulierende Signaltransduktionskaskaden aktiviert, die beispielsweise durch p53 oder JNK (engl. *c-Jun N-terminal* kinase) vermittelt werden (Miyakoda et al. 2002; Ohnishi & Ohnishi 2007). Allerdings induziert ein HS ebenso die Aktivierung anderer Signalwege mit antiapoptotischen und proliferationsstimulierenden Funktionen. Hierzu zählen unter anderem der Akt-, p38- und ERK-Signalweg und eine gezielte zusätzliche Inhibition der Komponenten dieser Transduktionskaskaden erwies sich als eine vielversprechende Strategie in der hyperthermen Krebstherapie (Ohnishi & Ohnishi 2007).



Abb. 1.4 Die Sensitivierung gegenüber Hitze durch die gezielte Inhibition apoptose- und proliferationsstimulierender Signalwege (nach Ohnishi & Ohnishi 2007)

Ein Charakteristikum vieler Krebserkrankungen ist die Überexpression von Signalwegskomponenten oder ihre konstitutive Aktivität (Hanahan & Weinberg 2011). Die daraus resultierenden hyperaktiven Signaltransduktionskaskaden nehmen eine essentielle Rolle in der Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps ein. Es besteht auch ein empfindliches Gleichgewicht innerhalb des Tumorzellmilieus mit Herunterregulation paralleler Signalwege und kompensatorischer Aktivierung antagonistischer Signalwege. Die aktivierende Wirkung eines HS auf Signaltransduktionswege dysreguliert die zelluläre Balance weiter, was final zum Zelltod führen kann (Weinstein & Joe 2008).

In den vergangenen Jahrzehnten wurde ein Zusammenhang zwischen einem HS und dem Aufkommen von DNA-Schäden vermutet. Beispielsweise wurde mehrfach postuliert, dass ein HS zu DNA-Schädigungen und der Formation von DSBs beiträgt, indem hitzelabile Reparaturproteine wie die DNA Polymerase β in ihrer Funktion gehemmt werden (Spiro et al. 1982; Dahm-Daphi et al. 1997). Später wurde zudem beschrieben, dass ein HS nicht direkt chromosomale Strangbrüche verursacht, sondern die Chromatinstruktur verändern kann, was die DNA-Reparatur beeinflusst (Kampinga & Dikomey 2001; Kampinga & Laszlo 2005; Issels 2008).

Krawczyk *et al.* haben das Phänomen der hitzeinduzierten Beeinträchtigung der Reparatur von DNA-Schäden näher untersucht. Auf zellulärer Ebene wurde gezeigt, dass durch ionisierende Strahlung induzierte DSBs nach einem zusätzlichen HS für einen Zeitraum von etwa fünf bis sechs Stunden nicht repariert werden. Als Grund hierfür wurde die hitzebedingte Degradierung von BRCA2 nachgewiesen, welches ein essentieller Bestandteil der HR zur Reparatur von DSBs ist (Krawczyk et al. 2011). Dieser Arbeitsgruppe ist es gelungen, durch einen HS eine temporäre und lokal begrenzte Defizienz der HR zu induzieren. Die Reduktion des Zellüberlebens nach der

Kombination von Hyperthermie und DNA-schädigenden Agenzien wurde als induzierte synthetische Letalität bezeichnet.

1.3.2 Die Hyperthermie in der Klinik

In der Klinik wird die Hyperthermie in Kombination mit einer Chemotherapie oder einer Radiochemotherapie zur Behandlung solider Tumoren eingesetzt. Generell ist eine kombinierte Hyperthermiebehandlung bei einer Vielzahl von Tumoren möglich und wird derzeit verstärkt bei unter anderem Mamma-Karzinomen, Kopf- und Halstumoren, Zervix- und Blasenkarzinomen, Lungen- und Hepatozellulären Karzinomen und vor allem bei STS eingesetzt (Bettaieb et al. 2013).

1.3.2.1 Die Hyperthermie zur Radiosensitivierung

Bei soliden Tumoren herrscht eine desorganisierte Anordnung der Blutgefäße, was besonders in hochproliferativen Bereichen des Tumors zu Hypoxie und einem niedrigen pH-Wert führt (Jain 2005; Issels 2008). Durch Hyperthermie kommt es reflektorisch zur Relaxierung der Blutgefäße, was zu einer verstärkten Oxygenierung des Tumorgewebes führt und somit die Sensitivität gegenüber einer Bestrahlungstherapie steigert (Pandita et al. 2011; Lindner & Issels 2011), ohne dabei eine weitere onkogene Transformation zu begünstigen (Miller et al. 1994; Issels 2008). Der Effekt einer Radiotherapie wird zusätzlich erhöht, da durch Hitze DNA-Reparaturproteine inhibiert werden, die bei der Behebung von DNA-Schäden involviert sind (Krawczyk et al. 2011).

1.3.2.2 Die Hyperthermie zur Chemosensitivierung

Hyperthermie verstärkt auch die Wirkung vieler Chemotherapeutika in der Tumorregion, wie z.B. die von Platinderivaten (z.B. Cisplatin) und alkylierenden Agenzien (z.B. Ifosfamid), ohne dabei die systemische Toxizität zu beeinflussen. Durch den hitzebedingten verstärkten Blutfluss und die erhöhte Gefäßpermeabilität werden verabreichte Zytostatika im Zielgewebe verstärkt aufgenommen, was zu erhöhten Reaktionsraten beispielsweise in Form von Alkylierungen oder anderen durch die Zytostatika induzierten DNA-Schäden führen kann, die aufgrund der hitzeinduzierten Inhibition der DNA-Reparatur in einem nur geringeren Ausmaß behoben werden. Die Temperaturspanne für eine maximale Wirkungssteigerung beträgt 40,5°C – 43°C (Issels 2008; Lindner & Issels 2011).

1.3.3 Methoden und Geräte zur Hyperthermieapplikation

Lokale Hyperthermie

Oberflächliche Tumoren werden über ein Kontaktmedium mit elektromagnetischen Wellen oder Radiokurzwellen behandelt. Hierbei beträgt die Reichweite allerdings nur wenige Zentimeter (cm) und die Anwendung wird durch unebenes Gewebe wie beispielweise bei Hals- und Nackentumoren weiter limitiert.

Interstitiale und Endokavitäre Hyperthermie

Bei Tumoren im Interstitium und in Endokavitäten, die einen Durchmesser von 5 cm nicht überschreiten, besteht die Möglichkeit einer direkten, jedoch invasiven Hyperthermiebehandlung. Hierbei werden Antennen oder Applikatoren direkt in den Tumor implantiert.

Regionale Hyperthermie und *part-body* Hyperthermie

Bei tiefsitzenden Tumoren wird die Regionale Hyperthermie (RHT) als nichtinvasive Methode angewandt, bei der ringförmig angebrachte Antennen ein elektromagnetisches Feld erzeugen und den Tumor gezielt erwärmen. Zur Überprüfung der Behandlungstemperatur können mittels invasiver Thermosonden, Blasen- oder Rektumkatheter oder als Goldstandard mittels MRT (Magnetresonanztomographie) Temperaturmessungen durchgeführt werden. Bei einer *part-body* Hyperthermie können größere anatomische Regionen wie z.B. das Abdomen oder das Retroperitoneum erwärmt werden (Wust et al. 2002; Lindner & Issels 2011).

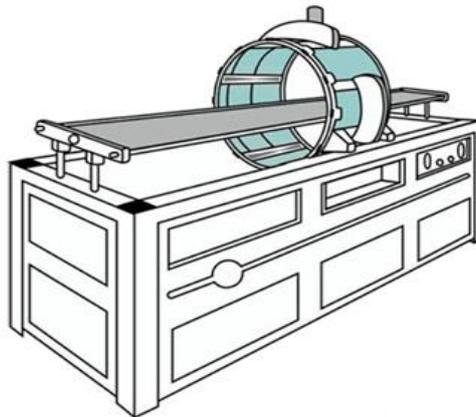


Abb. 1.5 Darstellung eines Applikators für Regionale Tiefenhyperthermie (aus Lindner & Issels 2011)

1.3.4 Die Hyperthermie in der Sarkomtherapie

Seit 1986 forscht die Arbeitsgruppe für Sarkome am Klinikum der Universität München an den therapeutischen Auswirkungen der regionalen Tiefenhyperthermie in Verbindung mit einer systemischen Chemotherapie bei Patienten mit hochgradig fortgeschrittenem STS.

Bereits bei einer ersten Phase II Studie wurde bei 59 Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder wieder aufgetretenem Hochrisiko STS beobachtet, dass eine Chemotherapie aus Etoposid, Ifosfamid und Doxorubicin (EIA) in Kombination mit RHT in einem medianen Überleben von 52 Monaten resultierte. Die 5-Jahres Überlebensrate betrug hier 49% (Issels et al. 2001).

Die Ergebnisse einer randomisierten Phase III Studie aus dem Jahr 2010 haben eindeutige Therapieerfolge bei Patienten mit lokalem Hochrisiko STS nachgewiesen. In dieser Studie wurden 341 Patienten entweder mit einem alleinigen neoadjuvanten chemotherapeutischen EIA-Regime behandelt (172) oder zusätzlich mit RHT (169). Das lokale progressionsfreie Überleben lag hier bei den mit EIA und RHT behandelten Patienten bei 76 % im Vergleich zu 61 % bei der alleinigen Chemotherapie. Auch das krankheitsfreie Überleben (32 vs. 18 Monate) und die Ansprechrate (28,8 % vs. 12,7 %) wurde durch die Kombination von EIA und RHT im Vergleich zu EIA allein signifikant verbessert (Issels et al. 2010).

Auch aus der Pädiatrie wird von Erfolgen einer Thermochemotherapie berichtet. Kinder mit STS und Chondrosarkomen, die bereits mit anderen Zytostatika vorbehandelt wurden und eine sehr schlechte Prognose aufwiesen, zeigten nach einer Kombination aus Etoposid, Ifosfamid und Cisplatin mit RHT ein Tumoransprechen von 73 % (15 Patienten, darunter fünf komplette Remissionen und sechs partielle Remissionen) (Wessalowski et al. 2003).

Zusammenfassend stellt eine neoadjuvante oder adjuvante Chemotherapie in Kombination mit RHT eine vielversprechende Behandlungsoption für Patienten mit lokalen Hochrisiko STS dar.

1.4 DNA-Reparatur

Wie bereits beschrieben sind für die Wirkung von Tr zwei DNA-Reparatursysteme von besonderer Bedeutung. Die NER ist für die Tr vermittelte Entstehung von DSBs essentiell. Durch die HR werden Tr-induzierte DSBs nach Möglichkeit repariert. Das anschließende Kapitel erläutert diese beiden DNA-Reparaturmechanismen im Detail.

1.4.1 Die Nukleotidexzisionsreparatur (NER)

Die NER wird als das DNA-Reparaturprogramm mit dem breitesten Wirkungsspektrum angesehen, das eine Fülle von strukturell sehr unterschiedlichen DNA-Einzelstrangschäden reparieren kann (Boer & Hoeijmakers 2000). Die meisten Läsionen, für die die NER zuständig ist, haben eine exogene Quelle (Hoeijmakers 2001) und stören die DNA-Helixstruktur erheblich. Die häufigsten dieser Läsionen sind durch ultraviolette Strahlung (UV) induzierte kovalente Verknüpfungen benachbarter Basen wie Cyclobutanpyrimidin-Dimere (CPDs) und Pyrimidin-(6,4)-Pyrimidin Photoprodukte (6-4 PPs). Andere Substrate der NER sind die sogenannten *bulky adducts* und DNA-Quervernetzungen (Troelstra et al. 1990; Laat et al. 1999), die durch DNA-reaktive Chemikalien wie Ifosfamid verursacht werden.

1.4.1.1 Der Mechanismus der Nukleotidexzisionsreparatur

Die NER kann nach der Art der Schadenserkenkung in zwei anfänglich unterschiedliche Signalwege unterteilt werden: Die GG-NER (*global genome*), die das gesamte Genom kontinuierlich nach strukturellen Veränderungen der DNA-Helix absucht und die TC-NER (*transcription coupled*), die DNA-Schäden bei aktiven Genen repariert, wenn die RNA-Polymerasen bei der Transkription blockiert werden (Sugasawa et al. 1998; Laat et al. 1999; Kamileri et al. 2012). Bei der GG-NER werden Läsionen von einem XPC-hHR23B Proteinkomplex und dem UV-DDB-Komplex (bestehend aus DDB1 und DDB2) erkannt (Sugasawa et al. 1998; Kamileri et al. 2012). Die Schadenserkenkung bei der TC-NER erfolgt während der Transkription durch die Arretierung der RNA Polymerase II (RNA Pol II), die die Elongation ausführt. Die angehaltene RNA Pol II wird dann durch die TC-NER spezifischen Faktoren CSB und CSA von der DNA entfernt (Hoeijmakers 2001). Die Reparatur der Läsion läuft nun bei beiden Signalwegen gleich ab. Durch den Proteinkomplex TFIIH, der unter anderem auch die beiden Proteine XPB und XPD beinhaltet, wird die DNA an der Stelle der Läsion entwunden und die einzelsträngige DNA (ssDNA, von engl. *single stranded*) wird mit Hilfe von XPG stabilisiert. Das Entwinden der DNA zu einer 27 Nukleotide

umfassenden sogenannten Reparaturblase beruht hauptsächlich auf der ATPase-Aktivität von XPB. Durch die Proteine XPA und RPA wird das geöffnete DNA-Intermediat weiter stabilisiert. RPA bindet zudem an ein 30 Nukleotide langes Fragment des zum Schaden komplementären DNA-Stranges und macht ihn unzugänglich für die Inzision durch die nachfolgende endonukleolytische Aktivität von XPG und ERCC1/XPF und hilft zusätzlich bei deren Positionierung an den Schnittstellen (Houtsmuller 1999; Laats et al. 1999). Anschließend wird zuerst durch XPG am 3'-Ende und dann durch den ERCC1/XPF-Komplex am 5'-Ende ein 24-32 Nukleotide langes DNA-Fragment, das den DNA-Schaden beinhaltet, heraus geschnitten. Die entstandene Lücke wird komplementär zum unbeschädigten Strang durch die DNA Polymerasen δ und ϵ zusammen mit Hilfe von PCNA und RFC wieder aufgefüllt und durch die DNA Ligase III-XRCC1 und DNA-Ligase I versiegelt (Houtsmuller 1999; Kamileri et al. 2012).

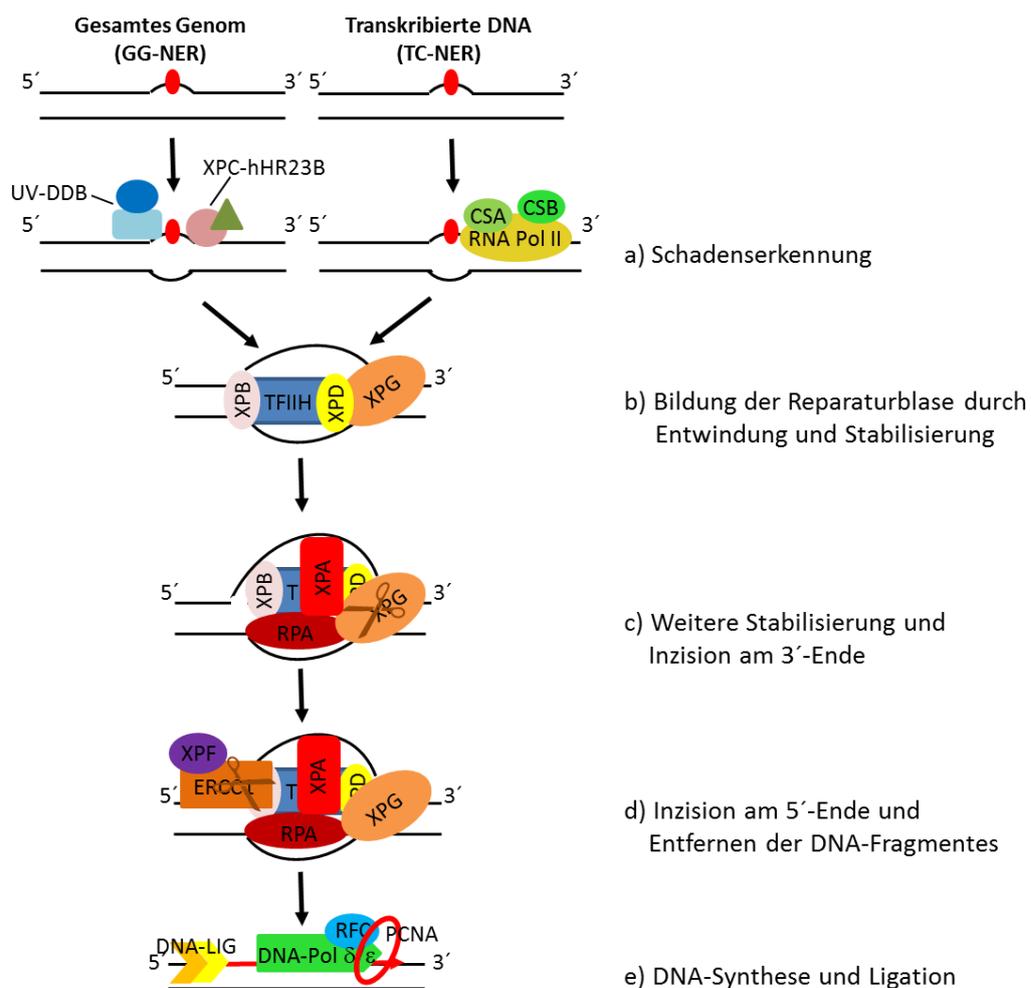


Abb. 1.6 Schematische Darstellung der GG-NER und der TC-NER a) Läsionen werden durch den XPC-hHR23B- und UV-DDB-Komplex (GG-NER) oder eine blockierte RNA Pol II (TC-NER) erkannt. Entfernung der angehaltene RNA Pol II durch CSB und CSA. b) Bildung der Reparaturblase durch Entwinden der doppelsträngigen DNA und Stabilisierung der ssDNA durch den TFIIH-Komplex und XPG. c) Weitere Stabilisierung durch XPA und RPA und Inzision am 3'-Ende durch XPG. d) Inzision am 5'-Ende durch ERCC1/XPF und Entfernen des DNA-Fragmentes mit Läsion. e) DNA-Synthese durch DNA-Polymerasen δ und ϵ mit Hilfe von PCNA und RFC. Verschließen der Lücken durch DNA Ligase III-XRCC1 und DNA-Ligase I.

1.4.1.2 Erkrankungen aufgrund defekter NER-Proteine

Defekte in der NER sind mit vielseitigen Erbkrankheiten verbunden. Zu den prominentesten gehören hier Xeroderma pigmentosum (XP), das Cockayne Syndrom (CS) und die Trichothiodystrophy (TTD), die alle eine extreme Empfindlichkeit gegenüber Sonneneinstrahlung gemeinsam haben. Die Erkrankung XP beruht auf der Mutation eines von den sieben Genen, die für die Proteine XPA bis XPG kodieren. Patienten haben ein mehr als 1000-fach erhöhtes Risiko, an Hautkrebs zu erkranken und das Auftreten von endogen wachsenden Tumoren ist ebenfalls erhöht. Im Zusammenhang mit XP wird häufig eine Neurodegeneration beobachtet. Patienten mit CS, die Mutationen im CSA- oder CSB-Gen tragen, zeigen hingegen keine Prädisposition für Krebserkrankungen. Dies liegt vermutlich daran, dass die CS-assoziierten Defekte sehr häufig in einer Läsions-induzierten Apoptose resultieren. Allerdings führt dies zu einer Beeinträchtigung der körperlichen und neurologischen Entwicklung, die in Zwergenwuchs, vorzeitigem Altern und Demyelinisierung resultiert. Mutationen in Untereinheiten des TFIIH-Komplexes werden bei TTD Patienten beobachtet (Hoeijmakers 2001; Friedberg 2001). Die Symptome erstrecken sich von Entwicklungsstörungen bis hin zu neurologischen Defiziten. Ein weiteres Charakteristikum ist sehr sprödes und brüchiges Haar aufgrund einer Störung der Synthese schwefelhaltiger Keratine (Kamileri et al. 2012).

1.4.2 DNA-Doppelstrangbrüche und ihre Reparatur

DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) werden als die schädlichsten DNA-Läsionen erachtet, da an beiden DNA-Strängen ein Bruch vorliegt und somit eine einfach zugängliche Matritze für deren Reparatur fehlt. Exogene Faktoren für DSBs sind ionisierende Strahlung und chemische Agenzien wie Bleomycin. Sie können aber auch durch endogene Faktoren entstehen, wie z.B. durch Sauerstoffradikale, die bei metabolischen Prozessen freigesetzt werden oder durch die Replikation von DNA-Einzelstrangbrüchen (Karran 2000; Hoeijmakers 2001; Gent et al. 2001). Eine defekte

oder unzureichende Reparatur von DSBs kann zu einem permanenten Zellzyklusarrest oder zur Apoptose der Zellen führen. Die Anhäufung des DNA-Schadens kann aber auch in chromosomalen Aberrationen resultieren. Hierbei können Chromosomenfragmente verloren gehen oder amplifiziert werden, was zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen oder einer Aktivierung von Protoonkogenen führen und eine maligne Transformation auslösen kann (Gent et al. 2001).

Bei Eukaryoten existieren zwei Hauptmechanismen zur Reparatur von DSBs. Eine davon ist die Homologe Rekombinationsreparatur (HR), die auf die S- und G2-Phase des Zellzyklus beschränkt ist, da sie auf die Sequenzhomologie eines Schwesterchromatids angewiesen ist. Die genetische Information des homologen Schwesterchromatids dient hierbei als Matrize und gewährleistet eine möglichst fehlerfreie DNA-Reparatur (Karran 2000; Gent et al. 2001; Bergs et al. 2013). Die Nichthomologe Endverknüpfung (NHEJ, engl. *non homologous end joining*) beruht auf der direkten Ligation der offenen DNA-Enden ohne Sequenzhomologie. Dieser Reparaturmechanismus ist größtenteils fehlerbehaftet, kann aber in jeder Zellzyklusphase – hauptsächlich jedoch in G0/G1 – DSBs reparieren (Dudás & Chovanec 2004).

1.4.2.1 ATM und die Signalisierung von DNA-Doppelstrangbrüchen

Um die Replikation geschädigter DNA zu vermeiden, entwickelten sich bei eukaryotischen Zellen Kontrollpunkte an unterschiedlichen Stellen der Interphase, um die weitere Progression im Zellzyklus zu verhindern. Die Serin/Threonin Proteinkinase ATM kann bei auftretenden DNA-Schäden zu allen drei wesentlichen Kontrollpunkten (G1/S, intra-S und G2/M) einen Zellzyklusarrest und die DNA-Reparatur initiieren. ATM phosphoryliert und aktiviert hierbei zahlreiche Proteine, die in der Kontrolle des Zellzyklus, der Apoptose und der DNA-Reparatur involviert sind, wie beispielsweise p53, CHK2, BRCA1, RPA, FANCD2 und NBS1 (Eppink et al. 2012).

Beinahe unmittelbar nach dem Auftreten eines DSBs wird ATM durch eine Autophosphorylierung am Serin 1981 und durch eine enge Interaktion mit dem MRN-Komplex (bestehend aus MRE11, NBS1 und RAD50) aktiviert. Der MRN-Komplex ist der primäre Sensor für DSBs und rekrutiert ATM zum DNA-Schaden (Eppink et al. 2012; Bergs et al. 2013). Die nachfolgenden an der DSB-Reparatur beteiligten Proteine akkumulieren überwiegend an der Bruchstelle und bilden sogenannte IRIFs (engl. *ionizing radiation induced foci*) (Krawczyk et al. 2011; Bergs et al. 2013). Ein

weiteres Phosphorylierungsziel von ATM und eine Schlüsselkomponente der DSB-Reparatur ist die Histonvariante H2AX, die nach der Phosphorylierung am Serin 139 γ H2AX genannt wird. Etwa 30 Minuten nach dem Auftreten des DSBs werden an den betroffenen Chromatindomänen eine Vielzahl von γ H2AX-Molekülen durch diese Phosphorylierung generiert, was allgemein als einer der frühesten Marker für einen DSB gilt (Lowndes & Toh 2005; Foster & Downs 2005; Bonner et al. 2008).

1.4.2.2 Mechanismus der Homologen Rekombinationsreparatur

Die Reparatur von DSBs durch die HR kann generell in drei Abschnitte unterteilt werden. Im ersten Abschnitt, der sogenannten Präsynapse wird ATM durch das Auftreten eines DSB aktiviert und phosphoryliert daraufhin NBS1, welches im Komplex mit RAD50 und MRE11 vorliegt (MRN-Komplex). Die DNA-Bruchstellen werden durch RAD52 identifiziert (Gent et al. 2001) und durch den MRN-Komplex zusammen mit CtIP und einem BRCA1-Komplex zu ssDNA-Strangenden mit einem 3'-Überhang prozessiert (Krawczyk et al. 2011; Eppink et al. 2012). An dieser Stelle binden RPA-Proteine, um einer Fehlbindung des freien Stranges vorzubeugen. Anschließend wird RPA mit Hilfe von BRCA2 und RAD51 Paralogen (RAD51B, RAD51C, RAD51D; XRCC2 und XRCC3) durch die Rekombinase RAD51 ersetzt. Im zweiten Abschnitt, der Synapse identifiziert das Nukleoproteinfilament aus RAD51 das homologe Schwesterchromatid und initiiert mit Hilfe von RAD52 und der ATPase RAD54 (Gent et al. 2001) die Stranginvasion, indem die DNA-Enden sich der intakten DNA-Matrize annähern und eine D-Schleife (von *D-loop*; engl. *displacement loop*) ausbilden (Hoeijmakers 2001; Davies et al. 2001; Eppink et al. 2012). An den Verzweigungsstellen beginnt am 3'-Ende des eingedrungenen Stranges die DNA-Synthese. Nach vollständiger Wiederherstellung der DNA durch Polymerasen werden vorhandene Lücken durch Ligasen geschlossen. Im finalen Abschnitt, der Postsynapse, liegen die rekombinierten DNA-Moleküle als X-förmige Struktur aus vier DNA-Strängen (Holliday Struktur) vor (Eppink et al. 2012). Letztendlich wandert die Verzweigungsstelle über die DNA hinweg (*branch migration*) und die überkreuzte Struktur wird durch Resolvasen in zwei separate dsDNA-Stränge (dsDNA, von engl. *double stranded*) gelöst (Hoeijmakers 2001; Eppink et al. 2012).

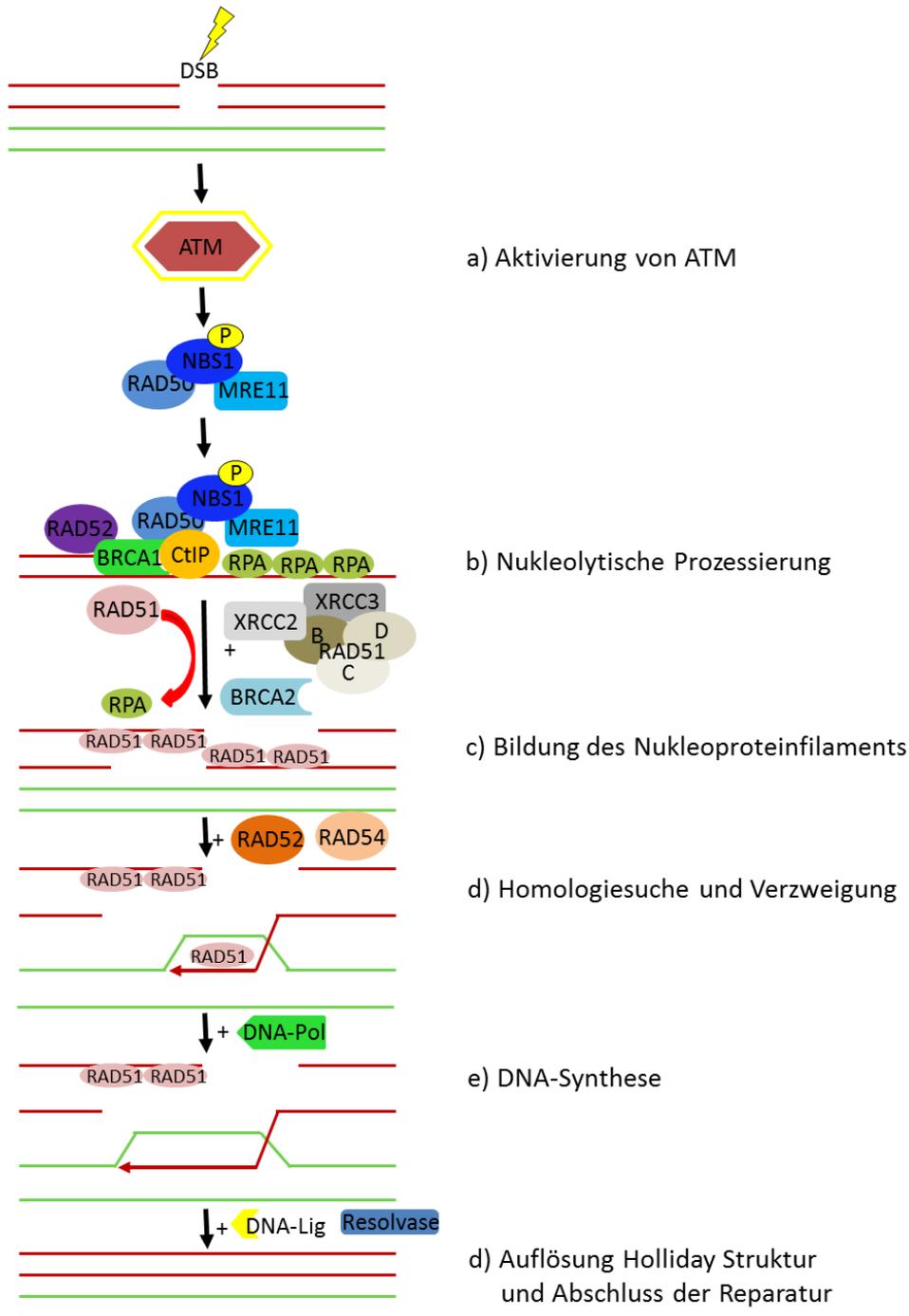


Abb 1.7 DSB-Reparatur durch HR a) Auftreten eines DSBs und Aktivierung von ATM mit anschließender Phosphorylierung von NBS1. b) Identifizierung der DNA-Bruchstellen und Prozessierung durch den MRN-Komplex, CtIP und einem BRCA1-Komplex zu ssDNA-Strängen mit 3'-Überhang. Bindung von RPA an Überhänge. c) Verdrängung von RPA und Bildung eines RAD51 Nukleoproteinfilamentes durch BRCA2 und RAD51 Paraloga (RAD51B, RAD51C, RAD51D; XRCC2 und XRCC3). d) Identifizierung des homologen Bereiches auf Schwesterchromatid durch RAD51. Initiierung der Stranginvasion mit Hilfe von RAD52 und RAD54 und Ausbildung einer D-Schleife e) Polymerasen-vermittelte DNA-Synthese und schließen der Lücken durch Ligasen. f) Auflösen der Holliday Struktur in zwei einzelne dsDNA-Stränge durch Resolvasen.

1.4.2.3 Die Funktion von BRCA2 in der Homologen Rekombinationsreparatur

Das Tumorsuppressorprotein BRCA2 wird vorrangig während der S- und G2-Phase des Zellzyklus exprimiert und ist im Nukleus lokalisiert. Es erfüllt essentielle Funktionen bei der Zellzykluskontrolle, der Rekombination, der Transkription und vor allem bei der HR von DSBs (Venkitaraman 2002; Park et al. 2014). Ein mutationsbedingter Verlust von BRCA2 resultiert in chromosomaler Instabilität, die sich insbesondere durch Chromosomenbrüche und Translokationen äußert (Jensen et al. 2010) und die Entstehung von Krebserkrankungen begünstigt. BRCA2 gilt als essentieller Kofaktor der RAD51-vermittelten DNA-Reparatur (Patel et al. 1998). Es bindet mit seinem Carboxylterminus direkt die RAD51-Rekombinase (Venkitaraman 2002; Jensen et al. 2010) und reguliert dessen intrazelluläre Lokalisation und Oligomerisation (Davies et al. 2001).

1.4.2.4 Erkrankungen aufgrund defekter HR-Proteine

Defekte bei Signalwegen, die die Reparatur von DSBs initiieren oder bei der HR mitwirken, führen zu multiplen Krankheitsbildern und einer starken Prädisposition, an Krebs zu erkranken (Karran 2000).

Erkrankte, die an Ataxia telangiectasia (AT) leiden, tragen eine autosomal-rezessiv vererbte Mutation im *ATM*-Gen (Eppink et al. 2012). Neben einem verstärkten Vorkommen von chromosomalen Translokationen und gehäuften Fällen maligner Lymphome (Gent et al. 2001) zeigt sich bei AT-Patienten eine eingeschränkte Bewegungskoordination, neurologische Störungen und Gefäßerweiterungen vor allem am Auge und der Haut. Mutationen im *MRE11*-Gen resultieren in einem AT-ähnlichen Krankheitsbild. Darüber hinaus verursachen Mutationen im *NBS1*-Gen das Nijmegen *breakage* Syndrom, welches unter anderem von Mikrozephalie und Wachstumsstörungen geprägt ist. Diese Erkrankungen werden zudem durch eine erhöhte Krebsprädisposition, Immundefizienz, einer Hypersensitivität gegen ionisierende Strahlung und chromosomale Instabilität charakterisiert. Erbliche Defekte bei den Tumorsuppressorgenen *BRCA1* und *BRCA2* erhöhen das Brustkrebsrisiko enorm (Hoeijmakers 2001), sowie die Prädisposition für Ovarial-, Kolon-, Pankreas- und Prostatakarzinome.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Dem Zytostatikum Tr wird eine Vielfalt zytotoxischer Wirkungsweisen zugeschrieben. Neben der Inhibierung von Transkriptionsfaktoren, die aus der direkten DNA-Bindung resultiert (Louneva et al. 2003) und der Modulation der Zytokinsynthese (Allavena et al. 2005) sowie der Depletion von Makrophagen (Germano et al. 2013) beruht die antiproliferative Wirkung von Tr überwiegend auf der Induktion von DNA-Schäden, insbesondere von DSBs (D'Incalci & Galmarini 2010).

In früheren Publikationen wurde bereits gezeigt, dass durch Hyperthermie die Reparatur von DSBs beeinträchtigt wird (Dahm-Daphi et al. 1997). Krawczyk *et al.* haben dann im Jahr 2011 gezeigt, dass die HR durch Hyperthermie aufgrund einer temporären Degradierung von BRCA2 inhibiert wird (Krawczyk et al. 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit soll *in vitro* eine mögliche Steigerung der tumoriziden Wirkung von Tr durch eine Hyperthermiebehandlung untersucht werden. Die DSB-induzierenden Eigenschaften von Tr und die hitzevermittelte Beeinträchtigung der HR resultierten in der Fragestellung, ob die zytotoxischen Effekte von Tr durch einen HS verstärkt werden können. Dies soll zu Beginn der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Anschließend sollen die zugrunde liegenden Mechanismen einer möglichen Wirkungssteigerung der Kombinationsbehandlung auf molekularer und Proteinebene ergründet werden und die Wichtigkeit des Proteins BRCA2 für den Wirkmechanismus analysiert werden.

Zudem soll eine Methode zur Hochdurchsatzanalyse etabliert und validiert werden, durch die die Identifizierung von Proteinen ermöglicht wird, deren Inhibition eine weitere Kombinationsstrategie für die Behandlung durch Tr und einem HS darstellen könnte. Durch diese Methode könnten zudem Proteine identifiziert werden, die als Prädiktivmarker für das Therapieansprechen in klinischen Ansätzen dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Branson Sonifier 250	Branson, Dietzenbach
Brutschrank (37°C)	Binder, Tuttlingen
Brutschrank (41,8°C)	Binder, Tuttlingen
Brutschrank (43°C) Hera <i>cell</i>	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Durchflusszytometer, BD Accuri C6	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer, LSRII cytometer	BD Biosciences, Heidelberg
Elektronische Thermometer	Greisinger Electronics, Regenstauf
Konfokales Mikroskop Leica TCS SP5 II	Leica Microsystems, Wetzlar
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen
LC480 qPCR cyclers	Roche, Penzberg
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Mini Trans-Blot® Cell	BioRad, München
Nano Drop 2000c Spectrometer	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Nassblot-Apparatur 422 Electro Eluter	BioRad, München
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Optimax X-Ray Film Processor	PROTEC, Oberstenfeld
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Pipetten (Pipetman)	Gilson, Middleton, WIS, USA
Pipettierhelfer <i>accu jet</i> ® pro	Brand, Wertheim
Plattenphotometer SPECTROStar Nano	BMG Labtech, Offenburg
Plattenphotometer Synergy Mx	BioTek, Bad Friedrichshall
Rollenmischgerät	Hecht, Sondheim
Spannungsquelle PowerPac 3000	BioRad, München
Sterilbank HeraSafe KSP18	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühler (-20°C)	Siemens, München
Tiefkühler (-80°C) HeraFreeze	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Tischwaage	Kern, Balingen
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg

Ultrazentrifuge Sigma 2K15	SIGMA Laborzentrifugen, Osterode am Harz
Vortexer Reax top	Heidolph, Schwabach
Wasserbäder W45	Haake, Karlsruhe
Zählstift e-count TM	Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, USA
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

2.1.2 Chemikalien

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Albumin Standard	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Ammonium Oxalat	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bafilomycin A1	Tocris, Bristol, UK
C ₁₂ FDG-FITC	Molecular probes, Eugene, OR, USA
DEVD-AMC Peptid	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Entwicklerlösung	Calbe Chemie, Calbe
Ethanol absolut (EtOH)	Merck, Darmstadt
Fixiererlösung	Calbe Chemie, Calbe
Formaldehyd 37%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Merck, Darmstadt
Halt TM Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
HiPerFect Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Methanol absolut (MeOH)	Merck, Darmstadt
Milchpulver	BioRad, München
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nonidet P-40 (NP40)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Oligofectamin Transfektionsreagenz	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
PBS	Gibco, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propidium Iodid	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Roti®Load 1 (Ladepuffer für SDS-PAGE)	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30 (Polyacrylamid 30%)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Staurosporin	Sigma-Aldrich, Steinheim
SYBR® Green	Lonza, Basel, Schweiz
Tetramethylethylenamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Vectashield	Vector, Burlingame, CA, USA
Western Blot Detektions Reagenz (Amersham ECL)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Western Blot Detektions Reagenz (Super Signal® West Dura)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Zellysepuffer	Cell Signaling Technology, Frankfurt

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Riedel--de Häén (Seelze), Sigma-Aldrich (Steinheim), Merck (Darmstadt) und Fermentas (St. Leon-Rot) im Reinheitsgrad *pro analysis* bezogen.

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Blotting-/Chromatographie-Papier Whatman	Roth, Karlsruhe
Deckgläschen (18x18 mm)	Menzel Gläser, Braunschweig
Einmalpipetten (2/5/10/25 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
FACS-Analyseröhrchen	Eppendorf, Hamburg
Kryoröhrchen (1,8 ml)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Objektträger (76x26 mm)	Menzel Gläser, Braunschweig
Parafilm	Sigma-Aldrich, Steinheim

Pipettenspitzen	Gilson, Middleton, WIS, USA
Pipettenspitzen mit Filter	Biozym, Hessisch Oldendorf
Polypropylen Reaktionsgefäße (15/50 ml)	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
PVDF-Membran	Merck Millipore, Darmstadt
Reaktionsgefäße (1,5/2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme Amersham Hyperfilm™ MP	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Zellkulturflaschen (T75, T25)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturplatten (6/12/24/96 – well)	BD, Franklin Lakes, NJ, USA

2.1.4 Kits

MycoAlert™	Lonza, Basel, Schweiz
NucleoSpin®RNA	Macherey-Nagel, Düren
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.5 Chemotherapeutikum/Zytostatikum

Trabectedin [Tr] (Ecteinascidin-743, Yondelis®)	Apotheke des Klinikums der Universität München, Großhadern
--	---

2.1.6 Software

BD Accuri C6 Software	BD Biosciences, Heidelberg
FACSDiva Software	BD Biosciences, Heidelberg
Gen5 data Analysis Software	BioTek, Bad Friedrichshall
ImageJ Analysis Software	www.computerbild.de/download/ImageJ
Leica image analysis software (LAS AF)	Leica Microsystems, Wetzlar
Mendeley Version 1.12.1	Mendeley Inc., New York City, NY, USA
Microsoft Office 2007	Microsoft, Unterschleißheim
SigmaPlot 12.0	Systat Software Inc, San Jose, CA, USA
SpectroStar Nano Software	BMG Labtech, Offenburg
SPSS Statistics Version 22	IBM, Armonk, NY, USA

2.1.7 Medien und Zellkulturkomponenten

DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	Gibco, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	Pan Biotech, Aidenbach
L-Glutamin (L-Glut)	Sigma-Aldrich, Steinheim

MEM (<i>Minimum Essential Medium</i>)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat (NaPyr)	PAA, Pasching, Österreich
NEAA (<i>Non Essential Amino Acids</i>)	Gibco, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Gibco, Karlsruhe

2.1.8 Zelllinien

Tab. 2.1 In der Arbeit verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Tumorentität	Kulturmedien und Zusätze	Bezugsquelle
U2Os	Humanes Osteosarkom	DMEM + 10% FCS	(*)
SW872	Humanes dediff. Liposarkom	DMEM + 5% FCS	CLS (Cell line Service)
SW982	Humanes Synovialsarkom	DMEM + 5% FCS	CLS (Cell line Service)
SKUT-1	Humanes uterines Leiomyosarkom	MEM + 10% FCS + je 1% NaPyr, NEAA, L-Glut	ATCC (American Type Culture Collection)
RD-ES	Humanes Ewing-Sarkom	MEM + 10% FCS + je 1% NaPyr, NEAA, L-Glut	ATCC (American Type Culture Collection)
DLD1 parental	Humanes Kolorektales Adenokarzinom	DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep	(**)
DLD1 BRCA2^{-/-}	Humanes Kolorektales Adenokarzinom (BRCA2 defizient)	DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep	(**)

(*) Zur Verfügung gestellt von Prof. Roland Kanaar, Erasmus MC, University Medical Center Rotterdam

(**) Zur Verfügung gestellt von PD Dr. Eike Gallmeier, Medizinische Klinik und Poliklinik II, Klinikum Großhadern, München

2.1.9 Proteine

2.1.9.1 Proteinmarker

HiMark™ Pre-stained Protein Standard	Life technologies, Carlsbad, CA, USA
Precision Plus Protein™	BioRad, München
Kaleidoscope™ Standards	

2.1.9.2 Enzyme

Aprotinin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pepstatin	Sigma-Aldrich, Steinheim
RevertAid Reverse Transkriptase	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.9.3 Primäre Antikörper

Kaninchen-anti -BRCA1	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Kaninchen-anti -ERCC1	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Kaninchen-anti -Hsp90	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Kaninchen-anti -PARP1	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Kaninchen-anti -ph p53 (Ser20)	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Kaninchen-anti -phChk1 (Ser345)	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Kaninchen-anti -RAD51	(1:10.000)	Calbiochem, Darmstadt
Kaninchen-anti -β-Aktin	(1:10.000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Kaninchen-anti-ORC2	(1:3000)	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
Maus-anti-BRCA2	(1:500)	Calbiochem, Darmstadt
Maus-anti-Chk1	(1:500)	Santa Cruz Biotech, Dallas, TX, USA
Maus-anti-FANCD2	(1:500)	Santa Cruz Biotech, Dallas, TX, USA
Maus-anti-p21	(1:500)	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
Maus-anti-p53	(1:100)	Dako, Santa Clara, CA, USA
Maus-anti-phH2AX (Ser139)	(1:200)	Merck Millipore, Darmstadt
Ratte-anti-Hsp70 (ind.)	(1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt

2.1.9.4 Sekundäre Detektionsantikörper

Peroxidase-konjugiert

Anti-Kaninchen IgG	(1:3000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Anti-Maus IgG	(1:3000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Anti-Ratte IgG	(1:3000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt

Fluorophor-konjugiert

Alexa Fluor 488 Ziege-anti-Kaninchen IgG	(1:500)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Alexa Fluor 546 Ziege-anti-Maus IgG	(1:500)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

2.1.10 Synthetische Oligonukleotide

2.1.10.1 Primer für cDNA-Synthese

Oligo(dT) ₁₈ Primer	Fermentas, St. Leon-Rot
Random Hexamer Primer	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.10.2 Primer für qRT-PCR

<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>
18S rRNA <i>forward</i>	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'
18S rRNA <i>reverse</i>	5'-AGCTGGAATTACCGCGGC-3'
hALAS1 <i>forward</i>	5'-TCCACTGCAGCAGTACACTACCA-3'
hALAS1 <i>reverse</i>	5'-ACGGAAGCTGTGTGCCATCT-3'
hβ-2-Microglobulin <i>forward</i>	5'-TGCTCGCGCTACTCTCTCTTTC-3'
hβ-2-Microglobulin <i>reverse</i>	5'-TCTCTGCTGGATGACGTGAGTAAAC-3'
hBRCA1 <i>forward</i>	5'-GCTATTTCTGGGTGACCCAGTC-3'
hBRCA1 <i>reverse</i>	5'-GATTCTCTTGCTCGCTTTGGA-3'
hERCC1 <i>forward</i>	5'-TGCCCTGTTCCCTCAGCCTC-3'
hERCC1 <i>reverse</i>	5'-GCCGCCCATGGATGTAGTC-3'
hXPG <i>forward</i>	5'-CGATGCCCGAGCAGACACA-3'
hXPG <i>reverse</i>	5'-TTTCGCTGGCTGCTGCTT-3'

2.1.10.3 siRNAs (*short interfering RNAs*)

<u>Name</u>	<u>Zielsequenz</u>	<u>Hersteller</u>
AllStars Negative Control	vorbehalten	Qiagen
Hs_BRCA1_14	5'-CAGGAAATGGCTGAACTAGAA-3'	Qiagen
Hs_BRCA2_1	5'-CAGCGTTTGTGTATCGGGCAA-3'	Qiagen
Hs_BRCA2_3	5'-TACGTACTCCAGAACATTTAA-3'	Qiagen
Hs_BRCA2_6	5'-CAGGACACAATTACAACACTAAA-3'	Qiagen
Hs_BRCA2_7	5'-TTGGAGGAATATCGTAGGTAA-3'	Qiagen
Hs_CHEK1_13	5'-TTGGAATAACTCACAGGGATA-3'	Qiagen
Hs_ERCC1_4	5'-CACCGTGAAGTCAGTCAACAA -3'	Qiagen
Hs_ERCC1_5	5'-ACCGTGAAGTCAGTCAACAAA-3'	Qiagen
Hs_FANCD2_14	5'-CGGCTTCTCGGAAGTAATTTA-3'	Qiagen
Hs_PARP1_5	5'-CCGAGAAATCTCTTACCTCAA-3'	Qiagen
siRNA Flexi Plate	Katalognummer 1027411	Qiagen

2.1.11 Puffer und Lösungen

APS-Lösung 10%ig (w/v) 1 g APS in 10 ml H₂O

Caspase-Lysepuffer 20 mM HEPES-K (pH 7,4)
84 mM KCl
10 mM MgCl₂
0,2 mM EDTA
0,2 mM EGTA
0,5% NP40

Unmittelbar vor der Proteinextraktion wurden 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin und 5 µg/ml Aprotinin hinzu gegeben.

DEVDase Reaktionspuffer (10x) 375 mM HEPES-Na pH 7,4
750 mM NaCl
75% Saccharose
0,75% CHAPS

Der 10x DEVDase Reaktionspuffer wurde zur Herstellung eines 2x DEVDase Reaktionsmixes verwendet, welcher direkt vor der Reaktion mit 20 mM DTT und 100 µM des AMC-konjugierten Peptides versetzt wurde.

Elektrophorese-Puffer 25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1% SDS (w/v)
pH 8,3

Geltransfer-Puffer 25 mM Tris
192 mM Glycin
20% Methanol (v/v)

Kristallviolett-Lösung 20% Ethanol
0,8% Ammonium Oxalat
2% Kristallviolett

Material und Methoden

Nicoletti-Lösung	50 µg/ml Propidium Iodid 0,1% tri-Natriumcitrat Dihydrat 0,1 % Triton X-100
PBS	1,06 mM KH ₂ PO ₄ 2,96 mM Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O 155,17 mM NaCl pH 7,4
PBS-T	PBS mit 0,05% (v/v) Tween 20
Präinkubationspuffer	20 mM HEPES 0,5% Triton X-100 50 mM NaCl 3 mM MgCl ₂ 300 mM Saccarose pH 7,9
SDS-Lösung 10%ig (w/v)	1 g SDS in 10 ml H ₂ O
SDS-PAGE Sammelgel	2,7 ml ddH ₂ O 0,67 ml AA 0,5 ml Tris-HCl (pH 6,8) 40 µl SDS (10%) 40 µl APS (10%) 4 µl TEMED
SDS-PAGE Trenngel (5; 6; 10; 12%)	(5,7; 5,3; 4,0; 3,3 ml) ddH ₂ O (1,7; 2,0; 3,3; 4,0 ml) AA 2,5 ml Tris-HCl (pH 8,8) 100 µl SDS (10%) 100 µl APS (10%) (16; 8; 4; 4 µl) TEMED

TBS (<i>Tris buffered saline</i>)	0,2 M Tris 1,5 M NaCl pH 7,4
TBS-T	TBS mit 0,05% (v/v) Tween 20
Zellysepuffer	20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl 1 mM Na ₂ EDTA 1 mM EGTA 1% Triton X-100 2,5 mM Natriumpyrophosphat 1 mM β-Glycerophosphat 1 mM Na ₃ VO ₄ 1 µg/ml Leupeptin

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierungsverfahren adhärenter, eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in T75-Zellkulturflaschen bei 37°C und 5 % CO₂ in wassergesättigter Atmosphäre. Das Passagieren der Zellen erfolgte zweimal pro Woche bei einer Konfluenz von 80-100 %. Hierfür wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 3-5 min mit der Protease Trypsin-EDTA (0,05 %) bei 37°C inkubiert, um die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abzulösen. Die Zellen wurden anschließend mit FCS-haltigem Medium abgespült und die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Nach einem Zentrifugationsschritt (300xg, 5 min, RT) wurden 1 Mio. Zellen in frischem Zellkulturmedium in T75-Zellkulturflaschen überführt.

2.2.1.2 Ernte adhärenter Zellen für anstehende Analysen

Für die Analyse behandelter Zellen wurde zunächst das Wachstumsmedium aus den Zellkulturgefäßen abgenommen und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Zum Ablösen adhärenter Zellen erfolgte eine 3-5 minütige Inkubation mit Trypsin-EDTA (0,05 %) bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen mit serumhaltigen Medium von den Zellkulturgefäßen abgespült, in einem Reaktionsgefäß gesammelt und zentrifugiert (300xg, 5 min). Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die Zellen nochmals zentrifugiert und die Zellpellets bei - 20°C oder - 80°C gelagert oder unmittelbar im Anschluss für anstehende Analysen verwendet.

2.2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen geerntet (siehe 2.2.1.1) und in einer Konzentration von 2-3 Mio. Zellen pro ml in frisches Zellkulturmedium überführt. 900 µl der Zellsuspension wurden mit demselben Volumen Einfriereserum (FCS + 10 % DMSO) in einem Kryoröhrchen vermengt und in einer isopropanolhaltigen Einfrierbox für 24 h bei - 80°C gelagert. Anschließend wurden die Kryoröhrchen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen kryokonservierter Zellen erfolgte durch schrittweises Antauen mit vorgewärmtem Kulturmedium. Nachdem alle Zellen in das Kulturmedium überführt wurden, erfolgte ein Zentrifugationsschritt (300xg, 5 min) um das enthaltene DMSO zu entfernen. Das gewonnene Zellpellet wurde in frisches Kulturmedium aufgenommen und in eine T75-Zellkulturflasche überführt. Nach einer 24-stündigen

Inkubation wurde das Medium nochmals gewechselt, um restliches DMSO zu entfernen.

2.2.1.4 Mykoplasmentest

Die in Kultur gehaltenen Zellen wurden regelmäßig mit Hilfe des Mykoplasmen-Detektionskits MycoAlert™ (Lonza) nach den Angaben des Herstellers auf eine Kontamination mit Mykoplasmen untersucht.

2.2.2 Behandlungen

2.2.2.1 Behandlung mit Trabectedin

Tr wurde als Lösung (0,25 mg/ 5 ml = 65,6 µM) von der Hausapotheke des Klinikums der Universität München, Großhadern bezogen. Die Stocklösung wurde mit 10 % DMSO versetzt und in einer Konzentration von 59 µM bei - 80°C gelagert. Um häufige Auftau- und Einfrierzyklen zu vermeiden, wurde Tr zudem mit FCS-freiem Medium auf eine Konzentration von 5,9 µM und 590 nM verdünnt und in Aliquots bei - 80°C gelagert.

Für eine Tr-Behandlung wurden die Zellen am Vortag in den entsprechenden Zellkulturformaten ausgesät. Die Dauer der Tr-Inkubation betrug 180 min. Im Anschluss an die Behandlung wurde das im Zellkulturmedium enthaltene Tr durch einen Mediumwechsel entfernt.

2.2.2.2 Hitzeschockbehandlung

Die Zellen wurden am Vortag eines Experimentes im jeweiligen Zellkulturformat ausgesät. Die Hitzeschockbehandlung erfolgte entweder im Brutschrank oder im Wasserbad. Die Temperaturen im Brutschrank betragen konstant 41,8°C oder 43°C bei 5 % CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre. Die Dauer des Hitzeschocks betrug eine therapeutische Stunde. Für die Hitzeexposition im Brutschrank wurden die Zellen 90 min bei der jeweiligen Temperatur inkubiert, da die ersten 30 min als Aufwärmphase definiert werden. Die Hitzeexposition im Wasserbad erfolgte ebenfalls bei 41,8°C und 43°C. Hierfür wurden die Zellkulturgefäße wasserdicht (vakuumiert oder mit Parafilm umschlossen) für 60 min im Wasserbad inkubiert. Aufgrund der erhöhten Wärmeleitfähigkeit von Wasser im Vergleich zur Luft besteht bei dieser Behandlungsmethode keine Notwendigkeit für eine Aufwärmphase.

2.2.3 Zytotoxizitätsuntersuchungen

2.2.3.1 Klonogener Assay

Durch einen klonogenen Assay wird die Koloniebildungsfähigkeit einzelner adhärent wachsender Zellen ermittelt. Diese Analyseform ist eine zuverlässige und gängige Methode, das reproduktive Zellüberleben nach einer Strahlenbehandlung oder einer Behandlung mit Zytostatika zu bestimmen (Franken et al. 2006). Für die Experimente wurden jeweils in Triplikaten 500 Zellen pro *well* in 6-*well*-Platten ausgesät und für 16 h bei 37°C inkubiert, um die Adhärenz zu gewährleisten. Am Folgetag wurden die Zellen behandelt und anschließend wurde das mit Zytostatika versetzte Zellkulturmedium gegen frisches Zellkulturmedium ausgetauscht. Es folgte eine ein- bis zweiwöchige Inkubation bei 37°C im Brutschrank. Nachdem durch eine mikroskopische Begutachtung eine ausreichende Kolonienzahl (mindestens 50 Zellen pro Kolonie) festgestellt wurde, wurden die Zellen für zwei Stunden mit einer Kristallviolettlösung fixiert und gefärbt. Um ein Absedimentieren des Farbstoffes zu vermeiden, erfolgte dies unter einer ständigen Rotation der 6-*well*-Platten. Nach dem Abwaschen der nicht gebundenen Farbstofflösung wurde die Anzahl der Kolonien in den einzelnen *wells* bestimmt.

2.2.3.2 Analyse des Zellzyklus und des subG1-Bereiches

Die Untersuchung der Verteilung der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen der Interphase erfolgte mittels Anfärben zellulärer DNA durch eine Nicoletti-Lösung (Nicoletti et al. 1991) und einer anschließenden durchflusszytometrischen Messung. Zu Beginn der Interphase steht die G1-Phase mit einem Ein-Chromatid Chromosomensatz. Dem folgt die S-Phase, in der die DNA-Replikation stattfindet und an deren Ende die Zellen einen Zwei-Chromatid Chromosomensatz aufweisen. Als letzte Phase gilt die G2-Phase, in der sich die Zellen auf den Eintritt in die mitotische Phase vorbereiten.

Diese Methode erlaubt es zudem, den Anteil apoptotischer Zellen zu ermitteln. Apoptotische Zellen weisen im Vergleich zu vitalen Zellen einen niedrigeren DNA-Gehalt auf, da membranumhüllte Chromatinfragmente abgeschnürt werden (Nicoletti et al. 1991; Trump et al. 1997). Dies wird im Zellzyklushistogramm im subG1-Bereich unterhalb des G1-Bereiches detektiert.

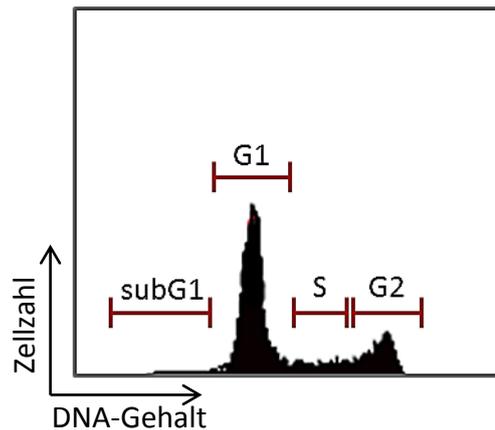


Abb. 2.1 Darstellung eines Zellzyklushistogramms mit den angegebenen Bereichen für subG1-, G1-, S- und G2-Phase. Aufgetragen wurde die Messung von 10.000 Zellen.

Für die Experimente wurden die Zellen in Duplikaten in 12-*well*-Platten ausgesät und nach einer 24-stündigen Erholungsphase behandelt. Nach weiteren 24, 48 und 72 h wurden die Zellen geerntet, die Pellets entsprechend der Zellzahl in 150 - 200 µl Nicoletti-Lösung aufgenommen und der Zellzyklus unmittelbar im Anschluss im Durchflusszytometer BD Accuri C6 untersucht. Die Verteilung der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen sowie der Anteil apoptotischer Zellen (subG1) wurde durch die BD Accuri C6 Software bestimmt.

2.2.3.3 Caspase-Aktivitätstest

Die Apoptose ist eine Form des Zelltodes, die genetisch programmiert und streng reguliert ist (Majno & Joris 1995; Adams 2003). Eine Form der Apoptoseregulation ist die Aktivierung von Caspasen, Cystein-Proteasen, die ihre Substrate spezifisch nach Aspartat-Resten proteolytisch schneiden. Sie gehören mitunter zu den wichtigsten Bestandteilen der apoptotischen Kaskade. Caspasen sind in Initiator- und Effektorcaspasen zu unterscheiden (Salvesen & Dixit 1997). Die Effektorcaspasen 3 und 7 werden erst im letzten Teil der Kaskade aktiviert und initiieren die Fragmentierung der DNA durch das Schneiden von DFF (engl. *DNA fragmentation factor*). Ein weiteres Substrat ist die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), die an der DEVD-Sequenz (Asp-Glu-Val-Asp) geschnitten wird (Stennicke & Salvesen 1998). Die Fragmentierung von PARP gilt als früher Indikator für Apoptose (Simbulan-Rosenthal et al. 1998).

Die enzymatische Aktivität der Caspasen wurde mithilfe eines fluorogenen Peptides bestimmt. Als Substrat diente das synthetische Tetrapeptid Ac-DEVD-AMC. Es besteht aus der PARP-spezifischen Konsensussequenz DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) und

ist mit AMC (7-Amino-4-Methylcoumarin) konjugiert. Das Schneiden der DEVD-Sequenz resultiert im Freisetzen des fluoreszierenden AMC, das zur Quantifizierung der Aktivität von Effektorcaspasen 3 und 7 genutzt wird.

Für die Messung der Caspasen-Aktivität wurden je 20 µg des gewonnenen Proteinlysates (siehe Punkt 2.2.4.1) mit Caspase-Lysepuffer (ohne Zusätze) auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt und mit weiteren 100 µl eines vorgewärmten (37°C) 2x DEVDase-Reaktionsmixes versetzt. Unmittelbar vor Gebrauch wurde der 2x DEVDase-Reaktionsmix mit 20 mM DTT und 100 µM des AMC-konjugierten Peptides versetzt. Die Kinetik der AMC-Fluoreszenz wurde im Plattenphotometer Synergy Mx bei einer Exzitation von 360/9 nm und einer Emission von 460/9 nm für 1 h bei 37°C gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Gen5 data Analysis Software und die relative Aktivität der Caspasen 3 und 7 wurde durch die Steigung des linearen Bereiches der resultierenden Kurven ermittelt.

2.2.3.4 Seneszenz-assoziiertes β -Galaktosidase-Test

Das Enzym β -Galaktosidase ist neben dem Auftreten in Lysosomen proliferierender Zellen ausschließlich bei seneszenten Zellen vorzufinden. Daher stellt die Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase einen viel verwendeten Biomarker zur Identifizierung seneszenten Säuger-Zellen dar (Dimri et al. 1995; Gary & Kindell 2005). Um den Anteil seneszenten Zellen zu ermitteln, wurde im Folgenden die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität durch die Umsetzung des spezifischen fluorogenen Substrats C₁₂FDG (5-Dodecanoylamino fluorescein-di- β -Galaktopyranosid) untersucht. Hierfür wurden die Zellen im 24-*well*-Format kultiviert und behandelt. Nach einer Regenerationszeit von 24, 48, 72 und 144 h wurde das Kulturmedium der Zellen gegen 300 µl FCS-freies Medium mit dem Zusatz von 100 nM Bafilomycin 1 ersetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Bafilomycin 1 blockiert die lysosomale β -Galaktosidase, die auch bei nicht-seneszenten Zellen vorzufinden ist und gewonnene Messergebnisse verfälschen würde. Anschließend wurden 100 µl FCS-freies Medium mit dem Zusatz von C₁₂FDG-FITC hinzu pipettiert. Für die Substratumwandlung erfolgte eine erneute einstündige Inkubation bei 37°C. Unmittelbar danach wurden die Zellen geerntet und in FACS-Röhrchen in 100 µl gekühltes PBS aufgenommen. Der prozentuale Anteil seneszenten Zellen (von gemessenen 5000) wurde am LSR II Durchflusszytometer gemessen und mittels der FACSDiva Software ausgewertet.

Zellen mit einem starken FITC- und SSC-Signal (*Side Scatter*) wurden hierbei als seneszent angesehen.

2.2.4 Proteinchemische Methoden

2.2.4.1 Proteinisolierung für den Caspase-Aktivitätstest

Die Zellen wurden 24, 48 oder 72 h nach einer Behandlung geerntet und die Pellets je nach Zellzahl in 50-100 µl Caspase-Lysepuffer aufgenommen. Nachdem die Zellen 20 min auf Eis gevortext wurden, folgte ein Zentrifugationsschritt (13000xg, 10 min, 4°C) um vorhandenen Zelldebris zu entfernen. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei - 80°C gelagert.

2.2.4.2 Proteinisolierung für SDS-PAGE

Die Zellen wurden nach einer Behandlung geerntet, entsprechend der Zellzahl in Zellysepuffer (100 µl Puffer auf 1 Mio. Zellen) aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Zum weiteren Zellaufschluss und zur Fragmentierung hochmolekularer DNA wurden die Zellen anschließend sonifiziert (3 sek bei 50% Leistung, Output 5) und nach einer weiteren 10 minütigen Inkubation auf Eis zentrifugiert (13000 x g, 10 min, 4°C), um die Proteinextrakte vom Zelldebris zu trennen. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und in Reaktionsgefäßen bei - 20°C gelagert.

2.2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt der gewonnenen Proteinlysate wurde nach der BCA-Methode mit Hilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kits nach den Angaben des Herstellers bei 562 nm im Plattenphotometer SPECTROStar Nano bestimmt.

2.2.4.4 Vorbereiten der Proteinextrakte für die SDS-PAGE

Für die SDS-PAGE wurden die Proteinextrakte mit einem vierfach konzentrierten Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 95°C im Heizblock denaturiert. Neben seinen denaturierenden Eigenschaften überdeckt SDS zudem die Eigenladung der einzelnen Proteine, sodass sie eine konstante negative Ladung aufweisen und die elektrophoretische Auftrennung nach dem Molekulargewicht ermöglicht wird (Laemmli 1970).

2.2.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden entsprechend des Molekulargewichts SDS-Polyacrylamid-Gele gegossen, die einen Anteil von 5, 6, 10 oder 12% Polyacrylamid aufwiesen. Zur Herstellung der Gele wurden zuerst Trenngele

zwischen zwei Glasplatten gegossen und zum Glätten der Oberfläche mit Isopropanol überschichtet. Nach einer 20 minütigen Polymerisierungsdauer wurde das Trenngel mit Sammelgel überschichtet. In das Sammelgel wurde ein Kamm eingebracht, der für die Beladung der Gele 10 oder 15 Ladetaschen ausgespart hat. Die Gele wurden mit den Proben in stets gleichbleibender Proteinmenge beladen (20-50 µg). Die Auftrennung erfolgte in Elektrophoresepuffer bei 75 V in den ersten 15 min und dann bei 120 V für 1h 45 min.

2.2.4.6 Western Blot-Transfer auf PVDF-Membranen

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die nach ihrer Molekülmasse aufgetrennten Proteine mittels Nassblot-Apparatur auf eine PVDF-Membran transferiert. Hierfür wurde die PVDF-Membran zunächst aktiviert (5 s in MeOH, 3 min in H₂O dann bis Gebrauch in Geltransferpuffer) und der Western Blot (Schwamm, 2 x Whatmanpapier, PVDF-Membran, SDS-Gel, 2 x Whatmanpapier, Schwamm) wurde zusammen gebaut. Die Blotting-Zeit im Geltransferpuffer betrug 90 min bei 80 V (konstant) unter ständiger Kühlung durch Kühlakkus. Beim Blotten großer Proteine wie BRCA2 erfolgte das *Blotten* bei 4°C (mit Kühlakkus) für 2 h und 300 mA (konstant).

2.2.4.7 Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen

Nach dem *Blotten* wurden die Membranen für 1 h bei RT mit 5 % (w/v) Milch in TBS-T zur Absättigung unspezifischer Bindestellen geblockt und ü. N. bei 4°C unter ständigem Rollen mit dem primären Antikörper inkubiert. Die Antikörper wurden je nach Angabe des Herstellers in 5 % (w/v) Milch in TBS-T oder 5 % (w/v) BSA in TBS-T verdünnt. Nach einer einstündigen Inkubation mit den sekundären Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörpern (5 % (w/v) Milch in TBS-T) wurden die Proteine durch Chemolumineszenz auf Detektionsfilmen visualisiert.

2.2.4.8 Immunzytochemische Färbungen

Zur Untersuchung der Lokalisation und Frequenz intrazellulärer Proteine mittels Fluorophor-konjugierter Antikörper wurden 0,2 Mio. Zellen pro *well* in 6-*well*-Platten auf Deckgläschen (18 x 18 mm) ausgesät und bis zum Folgetag bei 37°C inkubiert. Nach einer Erholungsphase von 4 h im Anschluss an die Behandlung wurde das Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und für exakt eine Minute mit einem Präinkubationspuffer inkubiert, um das Hintergrundsignal bei den späteren Präparaten zu minimieren. Anschließend wurden die Zellen für jeweils 10 min mit 2 % (v/v) Formaldehyd fixiert, mit 0,5 % (v/v) Triton-X100 permeabilisiert und zur

Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 2 % (w/v) BSA geblockt. Es folgte eine einstündige Inkubation mit den primären Antikörpern bei RT. Nach weiteren Waschschritten mit PBS-T (PBS mit 0,5% (v/v) Tween 20) wurden die Zellen mit den entsprechenden Fluorophor-konjugierten sekundären Antikörpern für 1 h bei RT inkubiert. Bei beiden Antikörper-Inkubationen ist es besonders wichtig, dass es in der verwendeten Inkubationskammer dunkel und feucht ist, um ein Austrocknen und Ausbleichen der Präparate sicherzustellen. Anschließend wurden die Präparate mit 2 % (v/v) Formaldehyd postfixiert und die DNA mit 0,1 % (v/v) DAPI gegengefärbt. Die Deckgläschen wurden mit etwa einem Tropfen Vectashield Einbettmedium auf einen Objektträger aufgebracht und die Kanten wurden mit Nagellack versiegelt. Bei Dunkelheit und einer Temperatur von 4°C ist eine mehrwöchige Lagerung der Präparate möglich.

2.2.4.9 Immunfluoreszenzmikroskopie und Prozessierung der Daten

Zur Detektion der mit den Fluorophor-konjugierten Antikörpern gebundenen Proteine wurde das inverse konfokale Mikroskop Leica TCS SP5 II mit einem 63-Objektiv verwendet. Durch das auf das Präparat gestrahlte Anregungslicht (A433 und A546) wurden die Fluorochrome und somit auch das gebundene Protein visualisiert. Die emittierte Fluoreszenz wird von dem Okular oder von einer angeschlossenen Kamera detektiert. Mit Hilfe der *Leica Image analysis software* (LAS AF) wurden die Aufnahmen aus mehreren Fluoreszenzkanälen in einem Mehrkanalbild überlagert und analysiert.

2.2.5 Quantifizierung der Proliferation

2.2.5.1 SYBR-Green Assay

Für die Bestimmung der Proliferation wurde die Höhe des DNA-Gehaltes in den einzelnen *wells* ermittelt, der durch die Zellproliferation ansteigt. SYBR-Green ist ein an die DNA bindender fluoreszierender Farbstoff, dessen Anregungswellenlänge bei 485 nm liegt. Durch Bindung an die DNA liegt die Emission bei einer Wellenlänge von 530 nm.

Um das Eindringen von SYBR-Green zu ermöglichen wurden die Zellen lysiert. Hierfür wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen gewaschen. Dem folgte eine 45 minütige Inkubation mit 100 µl ddH₂O (Zelllyse) bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl ddH₂O mit 0,2 % SYBR-Green versetzt.

Die Fluoreszenzintensität von SYBR-Green wurde unmittelbar im Anschluss durch das Plattenphotometer Synergy Mx bestimmt und die Daten mittels Gen5 data Analysis Software ausgewertet.

2.2.5.2 Sensitivitätsstudie

Zur Ermittlung der optimalen Tr-Konzentration für die nachfolgenden Hochdurchsatzanalysen mittels siRNA-*Library* (Punkt 2.2.6.2) wurden 1500 Zellen pro *well* in 96-*well* Platten ausgesät. In Vorexperimenten wurde ermittelt, dass nach dem Aussäen von 1500 Zellen pro *well* die Konfluenz nach einer 7-tägigen Inkubation bei den benötigten 100 % liegt. Am Folgetag wurden die Zellen mit Tr in aufsteigenden Konzentrationen und einem Hitzeschock im Wasserbad behandelt. Die Sensitivität der Zellen auf die Behandlungen wurde durch einen SYBR-Green Proliferationsassay (Punkt 2.2.5.1) bestimmt.

2.2.6 RNA-Interferenz durch siRNAs

Für das transiente Unterdrücken der Synthese spezifischer Proteine wurden kommerziell erwerbliche siRNAs (Qiagen) mithilfe eines Transfektionsreagenzes aus kationischen Lipiden in die Zellen eingebracht. siRNAs sind 21-23 Nukleotide lange doppelsträngige RNAs (Bartlett & Davis 2006; Whitehead et al. 2009). Sobald siRNAs im Zytoplasma der Zellen vorzufinden sind, werden sie in einen RISC-Komplex (*RNA induced silencing complex*) eingebunden, in dem sie entwunden werden. Weist einer der beiden Stränge komplementäre Eigenschaften zu einer aktiven mRNA auf (*antisense strand* oder *guide strand*), wird die Translation verhindert oder die betroffene mRNA wird sequenzspezifisch abgebaut. Der aktivierte RISC-Komplex kann anschließend weitere Ziel-mRNAs binden und deren Abbau initiieren, so dass ein transientes Stilllegen der Genexpression für 3 – 7 Tage stattfindet (Whitehead et al. 2009).

2.2.6.1 Stilllegen der Genexpression einzelner Genprodukte

Für das Unterdrücken der Synthese bestimmter Genprodukte wurden die Zellen in einer Zahl von 0,2 Mio. Zellen pro *well* in 6-*well* Platten ausgesät, um für die Transfektion am Folgetag eine Konfluenz von 50-60 % zu gewährleisten. Die Transfektionslösung setzte sich aus OptiMEM® (Gibco, Karlsruhe), der entsprechenden käuflich erwerblichen siRNA und dem Transfektionsreagenz HiPerFect oder Oligofectamin zusammen. Die eingesetzten Mengen der jeweiligen Bestandteile beliefen sich auf 100 µl OptiMEM®, 7,5 nM oder 10 nM siRNA-Lösung

und 12 µl Oligofectamin bzw. 12 µl HiPerFect. Die für einen effektiven *Knockdown* (KD) benötigte siRNA-Konzentration und die Menge an einzusetzendem Transfektionsreagenz wurde in Optimierungsexperimenten ermittelt.

Tab. 2.2 Optimierter Einsatz von siRNA und Tansfektionsreagenz

Zielprotein	Einsatz siRNA	Transfektionsreagenz (TRF)	Einsatz TRF
BRCA1	10 nM	Oligofectamin	12 µl
BRCA2	7,5 nM	HiPerFect	12 µl
CHEK1	10 nM	Oligofectamin	12 µl
ERCC1	10 nM	Oligofectamin	12 µl
FANCD2	10 nM	Oligofectamin	12 µl
PARP1	10 nM	Oligofectamin	12 µl

Die Transfektionslösung wurde nach einer 20 minütigen Inkubationszeit bei RT zur Bildung der Transfektionskomplexe unter leichtem Schwenken tröpfchenweise zu den Zellen pipettiert. Die Effektivität des KD wurde 48 und 72 h nach der Transfektion im Western Blot (Punkt 2.2.4.2-7) überprüft.

2.2.6.2 Transfektion mit einer siRNA-Library (Hochdurchsatzanalysen)

Verwendet wurde eine käuflich erwerbliche siRNA-*Library* (Qiagen siRNA FlexiPlate, Katalognummer 1027411), die mit je drei unterschiedlichen siRNA-Sequenzen gegen die mRNA eines von 288 Ziel-Genprodukten aus DNA-Reparatur und Metabolismus gerichtet war. Aus dieser *Library* wurden für die Transfektion siRNAs ausgewählt, deren Sequenzen sich gegen insgesamt 139 Ziel-Genprodukte richteten. Die Auswahl erfolgte nach der Relevanz der jeweiligen Proteine für die Proliferation, DNA-Schadensantwort und –Reparatur anhand intensiver Recherchen in Gendatenbanken (www.pubmed.org; www.genecards.org).

Für die Experimente wurden je 1500 Zellen pro *well* in eine 96-*well* Platte ausgesät, um für die Transfektion am Folgetag eine Konfluenz von 40 - 50 % zu erhalten. Für das Herstellen der Transfektionslösung wurden 10 nM der jeweiligen siRNA mit 21,25 µl OptiMEM® versetzt und 0,5 µl Oligofectamin mit 2 µl OptiMEM®. Nach einer

Inkubationszeit von 5 min wurden beide Lösungen vereinigt und für die Bildung der Transfektionskomplexe weitere 20 min bei RT inkubiert. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Wachstumsmedium der Zellen gegen 100 µl serumfreies Zellkulturmedium ersetzt und pro *well* wurden 25 µl der Transfektionslösung pipettiert und vorsichtig resuspendiert. Nach einer vierstündigen Inkubationszeit bei 37°C wurde die Transfektion durch die Zugabe von 75 µl serumhaltigen Zellkulturmediums auf eine Serumkonzentration von 10 % abgestoppt.

Zur Identifikation der Primär-Hits diente nach einer sechstägigen Inkubation bei 37°C die Ermittlung der Wachstumsinhibition mittels SYBR-Green Assay, die als Proliferation jeder Probe geteilt durch die mittlere Proliferation der Kontrollproben definiert wird. Die Wachstumsinhibitionsratio wurde als Quotient der durchschnittlichen Wachstumsinhibition zwischen zwei wiederholten Test- und Kontrollbedingungen ermittelt (Gallmeier et al. 2007). Genprodukte, deren KD bei mindestens zwei unterschiedlichen siRNA-Sequenzen eine Wachstumsinhibitionsratio von $< 0,7$ aufwies, wurden bezüglich der Proliferation als relevant erachtet. Die präsentierten Daten wurden bereits für den zytotoxischen Effekt des alleinigen KDs korrigiert.

2.2.7 Quantitative *Realtime* RT-PCR (qRT-PCR)

Pro *well* wurden 0,5 Mio. Zellen in 6-well-Platten ausgesät und am Folgetag geerntet. Die Pellets wurden bis zur RNA-Isolierung bei - 80°C gelagert. Die Gesamt-RNA wurde mittels Nucleo[®]Spin RNA II Kit nach den Angaben des Herstellers isoliert und die RNA-Konzentration spektrometrisch am Nano Drop ermittelt.

Mit 1 µg der isolierten RNA wurde die Reverse Transkription mit 200 Einheiten der RevertAid Reverse Transkriptase durchgeführt. Der Reaktionsmix zur cDNA-Synthese beinhaltete zudem 50 µM Hexamer Primer, 5 µM Oligo(dT)₁₈ Primer, 400 µM dNTP's und 1,6 Einheiten/µl RiboLock RNase Inhibitor. Mit der gewonnenen cDNA wurden anschließend die qRT-PCR Analysen vorgenommen. Hierbei wurden die relativen Expressionslevel der untersuchten Produkte mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen bestimmt, um eine Effizienzkorrektur vornehmen zu können. Die qRT-PCR erfolgte neben der cDNA mit einer Primerkonzentration von 300 nM (Punkt 2.1.10.2) in einem 1 x Maxima SYBR Green qPCR Mastermix in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit dem PCR-Protokoll 10 min 95°C, 45x (15 s 95°C, 30 s 60°C) in einem LC480 qPCR Cycler.

Als Referenzgene auf deren Mittelwert die Ergebnisse normiert wurden, dienten die 18S rRNA, β -2-Microglobulin und ALAS (δ -Aminolävulinat Synthase). Anschließend wurde jeder Einzelwert auf den Mittelwert aller untersuchten Zelllinien kalibriert. Da die PCR eine exponentielle Methode darstellt, weist sie ebenfalls einen exponentiellen Fehler auf, der als Hintergrundrauschen (Werte von 0,5 – 2,0) bezeichnet wird.

2.2.8 Statistische Analysen

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Daten wurden, wo angegeben, mit einer univariaten ANOVA (Varianzanalyse, engl. *analysis of variance*) untersucht und p-Werte $< 0,05$ oder $< 0,01$ wurden mit “*” oder “***” gekennzeichnet. Die statistischen Berechnungen wurden mithilfe einer SPSS Software durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Klonogenes Überleben nach einer kombinierten Trabectedin- und Hitzeschockbehandlung

Zur Überprüfung einer erhöhten Zytotoxizität von Trabectedin (Tr) in Kombination mit einem Hitzeschock (HS) wurde das klonogene Überleben behandelter Sarkomzellen untersucht. Zuerst galt es für den experimentellen Aufbau ein Behandlungsschema zu erarbeiten, das *in vitro* eine hohe Effektivität zeigt und gleichzeitig den Bedingungen in klinischen Ansätzen entspricht. In Vorexperimenten hat sich gezeigt, dass das optimale Zeitintervall zwischen dem Aussähen von Zellen und einer anschließenden Behandlung 16 h beträgt und die für den klonogenen Assay optimale Behandlungsdosis zwischen 0,5 und 4 nM Tr liegt (nicht gezeigt).

3.1.1 Erarbeiten des effektivsten Behandlungsregimes

Der effektivste zeitliche Ablauf für eine Kombinationsbehandlung aus Tr und einem HS wurde an der Osteosarkom Zelllinie U2Os erarbeitet. Die Zellen wurden einer dreistündigen Inkubation mit Tr (1 und 2 nM, 37°C) unterzogen und zusätzlich einem 90 minütigen HS im Zellkulturinkubator bei 41,8°C oder 43°C ausgesetzt. Das klonogene Überleben der Zellen wurde nach drei unterschiedlichen zeitlichen Anordnungen untersucht, die Abbildung 3.1 zu entnehmen sind: A) ein HS, dem eine Tr-Behandlung angeschlossen wurde, B) eine Tr-Behandlung, der ein HS folgte und C) eine simultane Tr-Behandlung und Hitzeexposition.

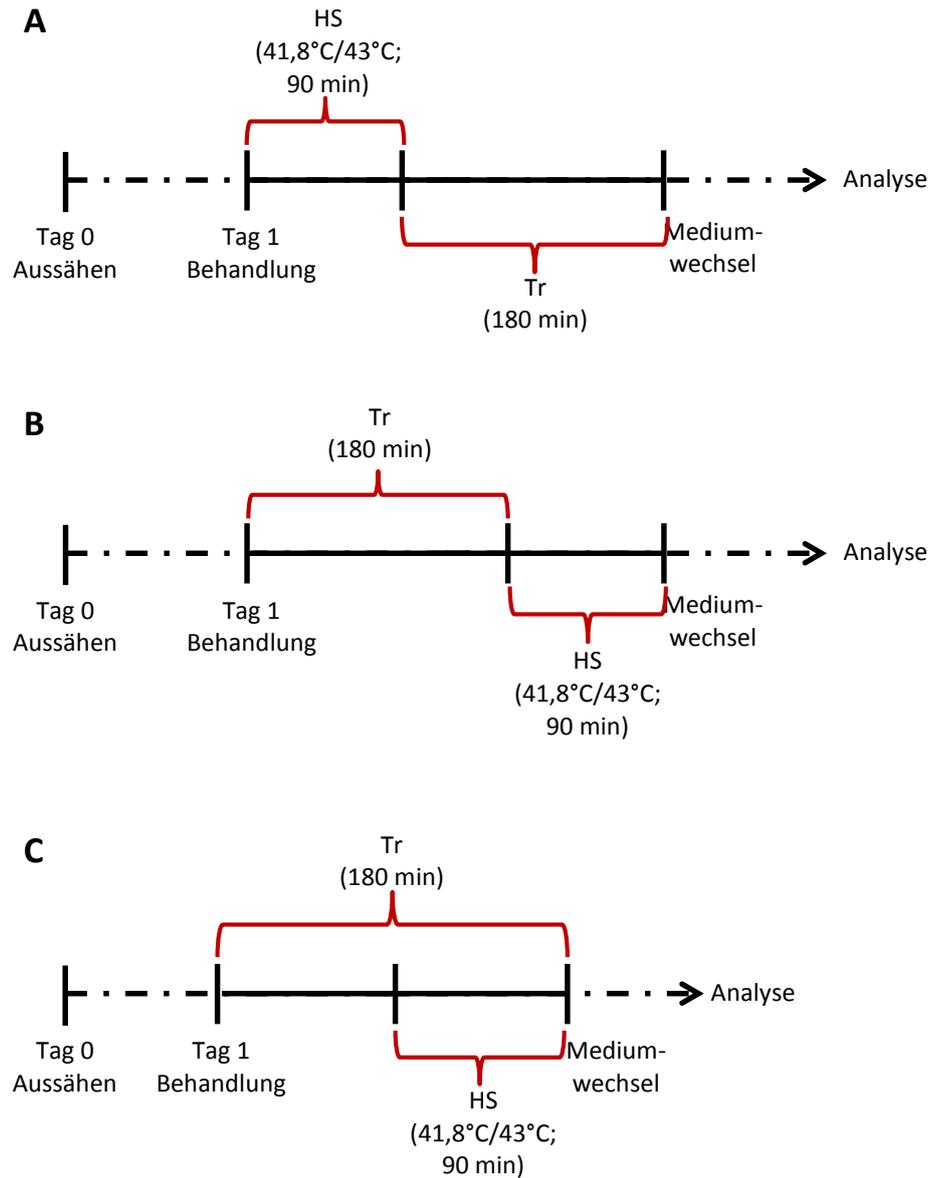


Abb. 3.1 Schematische Darstellung der drei unterschiedlichen Behandlungsregime Behandlung der Zellen A) mit einem HS und einer anschließenden Tr-Inkubation, B) mit Tr, gefolgt von einem HS oder C) mit einer gleichzeitigen Tr- und HS-Applikation. Der HS wurde 90 min nach Beginn der Tr-Inkubation angesetzt. Die Tr-Behandlung umfasste 180 min und der HS 90 min bei 41,8°C oder 43°C.

Tr reduzierte das klonogene Überleben bei U2Os Zellen dosisabhängig (1nM: 75 %, 2 nM: 62 %). Bei allen drei Behandlungsabläufen wurde in Kombination mit einem HS bei sowohl 41,8°C als auch 43°C eine verstärkte Abnahme des klonogenen Überlebens im Vergleich zu einer alleinigen Tr-Behandlung bei 37°C erzielt. Dies erfolgte vor allem nach einem HS bei 43°C. Der zytotoxische Effekt der alleinigen Hitzeapplikation fiel bei 41,8°C gering aus (98 – 82 % Restüberleben), bei 43°C wurde ein Restüberleben von 33 – 22 % beobachtet. Abb. 3.2 zeigt die graphische Darstellung des relativen klonogenen Überlebens beim Ansatz HS vor Tr (A), HS nach Tr (B) und HS während Tr (C). Es wurden sowohl die Rohdaten, als auch die hitzekorrigierten Werte des klonogenen Restüberlebens abgebildet. Den Rohdaten wird die alleinige Toxizität von Tr und dem HS und ein möglicher additiver Effekt durch die Kombinationsbehandlung entnommen. Aus den hitzekorrigierten Daten wurde die Zytotoxizität des HS durch die Korrektur mit dem Überleben der Kontrollversuche der entsprechenden Temperatur herausdividiert, was insbesondere verstärkende Effekte durch die Kombinationsbehandlung verdeutlichen soll. Das Divergieren der Graphen unterschiedlicher Temperaturen und somit die Steigerung der Zytotoxizität von Tr durch einen HS wurde im Rahmen dieser Arbeit als thermale Chemosensitivierung definiert.

Die simultane Behandlung resultierte vor allem bei 43°C in der stärksten Reduktion des klonogenen Überlebens. Während die aufeinanderfolgenden Behandlungsstrategien mit 2 nM Tr durchschnittliche hitzekorrigierte Werte von maximal 34 % (HS vor Tr) und 26 % (HS nach Tr) bei dieser Temperatur erzielten, wiesen die Zellen nach einer zeitgleichen Applikation ein Restüberleben von nur noch 10 % auf.

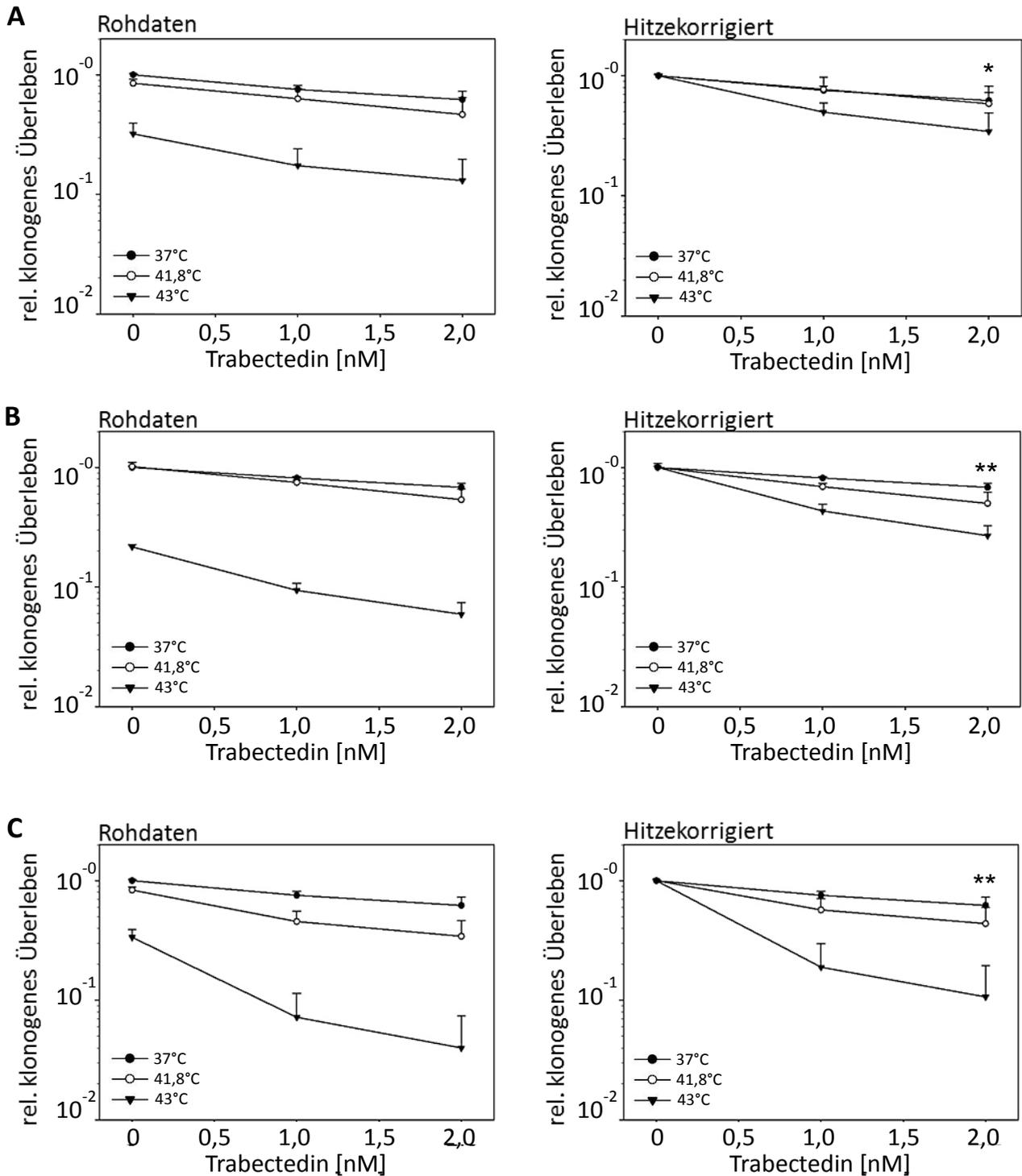


Abb. 3.2 Identifizierung des optimalen Behandlungsregimes U2Os Zellen wurden entweder vor (A), nach (B) oder während (C) einer dreistündigen Tr-Behandlung (1 und 2 nM) einem 90 minütigem HS bei 41,8°C oder 43°C unterzogen. Für die zeitgleiche Applikation wurde der Hitzeschock 90 min nach Beginn der Tr-Behandlung angesetzt. Die Graphen zeigen das relative klonogene Überleben anhand der Rohdaten (linke Seite) und der hitze korrigierten Werte (rechte Seite). Abgebildet ist die graphische Darstellung der Mittelwerte und SEM aus sechs unabhängigen Experimenten. Die ANOVA wurde jeweils für die Ansätze mit der höchsten Tr-Konzentration (2 nM) berechnet.

In Anbetracht der Resultate und einem bereits klinisch etablierten Behandlungsprotokoll, bei dem die Patienten zum Ende der Tr-Infusion eine Hyperthermiebehandlung erhalten (Kampmann et al. 2013), wurde das zeitgleiche Behandlungsschema (Abb. 3.1 C) für alle nachfolgenden Experimente dieser Arbeit angesetzt.

3.1.2 Bestätigung einer Wirkungsverstärkung an STS-Zelllinien

Tr weist *in vivo* eine starke antineoplastische Aktivität bei Weichgewebesarkomen (STS, engl. *soft tissue sarcoma*) auf (Schöffski et al. 2008; Ueda et al. 2014). Zur weiteren Validierung einer hitzevermittelten Verstärkung der Tr-Toxizität wurde das an U2Os Zellen erarbeitete simultane Behandlungsschema auf STS-Zelllinien übertragen. Analysiert wurde das klonogene Überleben von Liposarkom Zellen (SW872), Synovialsarkom Zellen (SW982), Ewing-Sarkom Zellen (RD-ES) und Zellen des uterinen Leiomyosarkoms (SKUT-1).

Abb 3.3 zeigt, dass eine alleinige Tr-Behandlung bei 4 nM das klonogene Überleben von SW872 (A) nur schwach (93 %) und von SW982 (B) stärker (44 %) reduzierte. Bei RD-ES (C) Zellen wurde ein Absinken auf 70% verzeichnet und bei SKUT-1 Zellen (D) auf 75%.

Die Exposition mit einem alleinigen HS bewirkte bei allen vier untersuchten Zelllinien ebenfalls eine Reduktion des klonogenen Überlebens. Nach einem HS bei 43°C belief sich dieses auf 68 % bei SW872, 32 % bei SW982, 34 % bei RD-ES und 64 % bei SKUT-1 Zellen (Abb. 3.3 linke Spalte).

Die Graphen der hitzekorrigierten Werte aus Abb. 3.3 (rechte Seite) veranschaulichen eine ausgeprägte verstärkende Wirkung der Kombinationsbehandlung bei SW872 und SW982 Zellen. Tr in einer Konzentration von 4 nM resultierte nach einem HS bei 41,8°C in einem klonogenen Restüberleben von 40 % bei SW872 und 31 % bei SW982 Zellen. Bei 43°C erfolgte ein weiteres Absinken auf 34 % (SW872) bzw. 25 % (SW982). Bei RD-ES und SKUT-1 Zellen erfolgte keine weitere hitzeinduzierte Reduktion des klonogenen Überlebens nach einer Tr-Behandlung im Rahmen einer thermalen Chemosensitivierung gemäß obiger Definition.

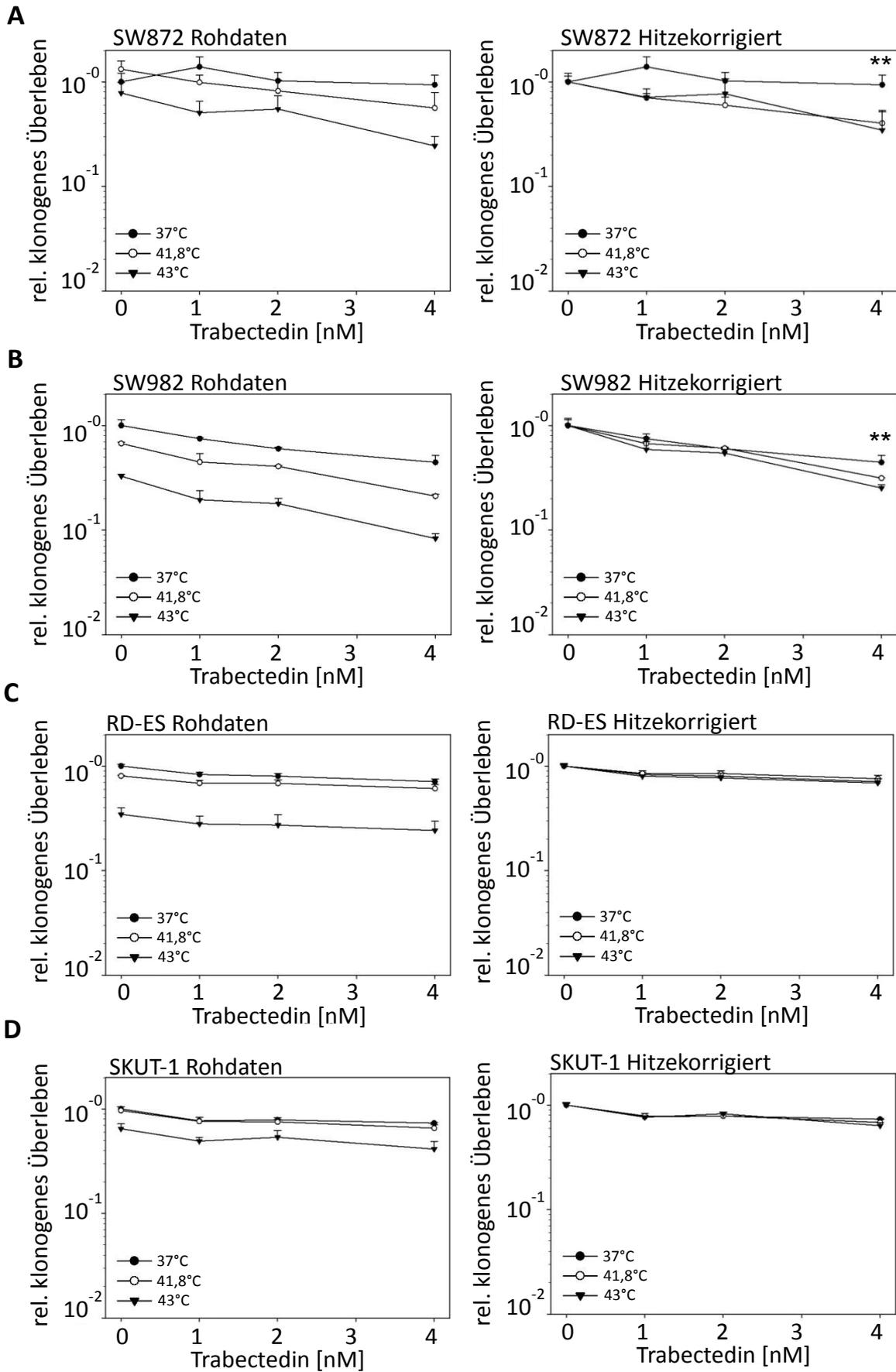


Abb. 3.3 Effektivität von Tr und HS bei STS-Zelllinien SW872 (A), SW982 (B), RD-ES (C) und SKUT-1 Zellen wurden einer simultanen Tr- und Hitzeapplikation ausgesetzt. Die Tr-Behandlung (1 – 4 nM) erfolgte für 3 h und die Zeit der Hitzeexposition bei 41,8°C und 43°C betrug jeweils 90 min. Die Graphen zeigen das relative klonogene Überleben anhand der Rohdaten (linke Seite) und der hitzekorrigierten Werte (rechte Seite). Graphisch abgebildet sind die Mittelwerte und SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Die ANOVA wurde jeweils für die Ansätze mit der höchsten Tr-Konzentration (4 nM) berechnet.

Zusammenfassend bewirkte bei allen untersuchten Sarkomzelllinien eine Inkubation mit Tr oder die Applikation eines HS eine meist dosisabhängige Reduktion des klonogenen Überlebens. Ausgenommen bei RD-ES und SKUT-1 Zellen wurde der Tr-Effekt durch einen zusätzlichen HS bei 41,8°C und insbesondere bei 43°C im Sinne einer thermalen Chemosensitivierung weiter verstärkt.

3.2 mRNA Expression von XPG, BRCA1 und ERCC1

Zur Überprüfung, ob bei den in Punkt 3.1 untersuchten Zelllinien spezifische Expressionsmuster der mRNA relevanter Proteine aus der NER und der HR einen Aufschluss über die Sensitivität gegenüber Tr geben, wurden die Expressionsstärken der XPG-, BRCA1- und ERCC1- mRNAs mittels qRT-PCR quantifiziert. Abb. 3.4 zeigt die globale Expressionsstärke der analysierten mRNAs anhand eines hierarchischen Clusterings. Um die Vergleichbarkeit der jeweiligen Expressionswerte innerhalb einer Zelllinie aus drei experimentellen Ansätzen darzustellen, wurde das Clustering in Triplikaten abgebildet.

Die beobachteten mRNA-Expressionsstärken zeigten innerhalb der analysierten Zelllinien nur marginale Unterschiede. Die Einzelwerte sind Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Die Expressionsmuster von RD-ES, SW982 und U2Os Zellen ließen keinerlei Rückschlüsse auf eine mögliche Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber Tr ziehen. Lediglich bei SKUT-1 und SW872 Zellen zeichnete sich ein Expressionsmuster für die untersuchten mRNAs ab, das einen Anhaltspunkt auf eine Sensitivität nach Schöffski et al. (2011) gegenüber Tr geben könnte (SKUT-1: XPG „hoch“, BRCA1 „niedrig“, ERCC1 „hoch“; SW872: XPG „hoch“, BRCA1 „relativ niedrig“, ERCC1 „niedrig“). Eindeutige Korrelationen mit den beobachteten Tr-Sensitivitäten im klonogenen Assay konnten jedoch nicht aufgestellt werden.

Ergebnisse

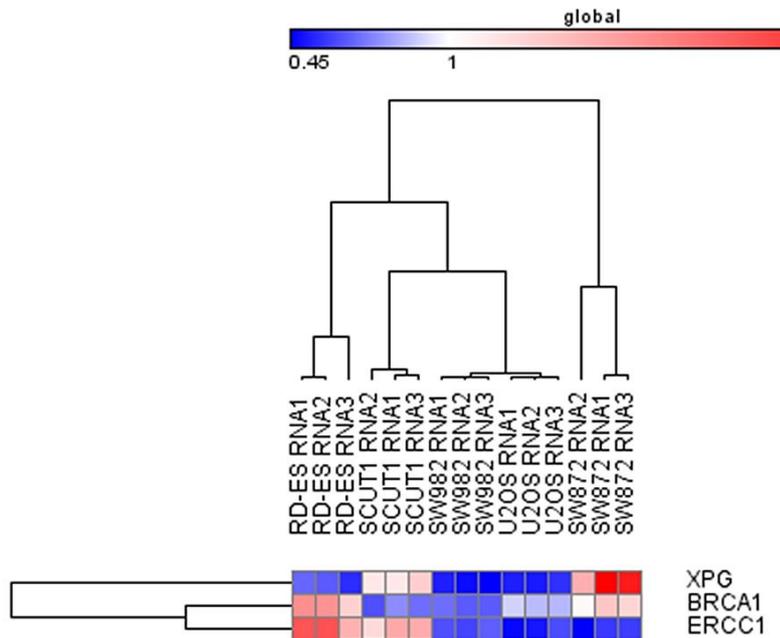


Abb. 3.4 mRNA- Gehalt von XPG, BRCA1 und ERCC1 bei den untersuchten Sarkomzelllinien
Hierarchisches Clustering der basalen mRNA Expressionen aus drei unabhängigen Experimenten.

Tab. 3.1 Einzelwerte der mRNA Expressionsstärke von XPG, BRCA1 und ERCC1 bei RD-ES, SKUT-1, SW982, SW872 und U2Os Zellen. Kalibriert wurde jeweils auf den Mittelwert aller untersuchten Zelllinien. Blau: niedrige Expression (ab 0,45); Rot: hohe Expression (bis 2,56).

	XPG	BRCA1	ERCC1
RD-ES RNA1	0,68	1,69	2,05
RD-ES RNA2	0,65	1,67	2,07
RD-ES RNA3	0,55	1,29	1,49
SKUT1 RNA1	1,15	0,76	1,54
SKUT1 RNA2	1,15	0,63	1,23
SKUT1 RNA3	1,31	0,69	1,52
SW982 RNA1	0,52	0,69	0,63
SW982 RNA2	0,48	0,65	0,60
SW982 RNA3	0,45	0,65	0,66
SW872 RNA1	2,56	1,36	0,58
SW872 RNA2	1,50	1,04	0,45
SW872 RNA3	2,41	1,26	0,59
U2OS RNA1	0,52	0,91	0,47
U2OS RNA2	0,51	0,86	0,50
U2OS RNA3	0,56	0,85	0,62

3.3 Molekulare Mechanismen zur Wirkungssteigerung von Trabectedin und einem Hitzeschock

Ein HS bewirkte eine deutliche Wirkungssteigerung von Tr bei U2Os und SW872 Zellen im klonogenen Assay. Zur Aufklärung des zugrunde liegenden molekularen Mechanismus wurden an beiden Zelllinien Untersuchungen zu Proliferation und Zelltod vorgenommen.

3.3.1 Charakterisierung des Zellzyklusarrest nach Trabectedin und einem Hitzeschock

Die Zellen wurden einer Tr-Behandlung (5-20 nM, 3h) und einem HS (41,8°C und 43°C, 90 min) unterzogen und die Verteilungen der DNA wurden 24, 48 oder 72 h nach den Behandlungen gemessen und im Zellzyklushistogramm dargestellt.

Abb. 3.5 zeigt exemplarisch Zellzyklushistogramme von SW872 (A) und U2Os (B) Zellen 24 h und 48 h nach einer Behandlung mit 10 nM Tr und einem HS. Bei niedrigeren Konzentrationen als 10 nM fiel der Effekt für qualitative Auswertungen zu schwach aus und bei höheren Konzentrationen war nur ein geringer Teil der untersuchten Zellen vital. Es wurden auch keine Auswertungen nach einer 72 stündigen Postinkubationsphase aufgeführt, da kaum mehr sichtbare modulierende Effekte auf die DNA-Verteilung zu detektieren gewesen waren (nicht gezeigt). Die Zellzyklushistogramme beider untersuchten Zelllinien wiesen 24 h Stunden nach einer alleinigen Tr-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen einen deutlichen Zellzyklusarrest in der späten S- oder G2/M-Phase auf. Ein zusätzlicher HS bei sowohl 41,8°C und 43°C verstärkte den Zellzyklusarrest weiter. Ein alleiniger HS bewirkte keine Veränderungen in der DNA-Verteilung (nicht gezeigt). 48 h nach einer Tr-Inkubation bei 37°C nahm der Anteil der DNA in der G1-Phase wieder zu, was für eine allmähliche Regeneration der Zellen von der Behandlung spricht. Jedoch wies die DNA-Verteilung der Zellen, die zusätzlich einem HS unterzogen wurden, weiterhin einen überwiegenden Arrest in der G2-Phase auf.

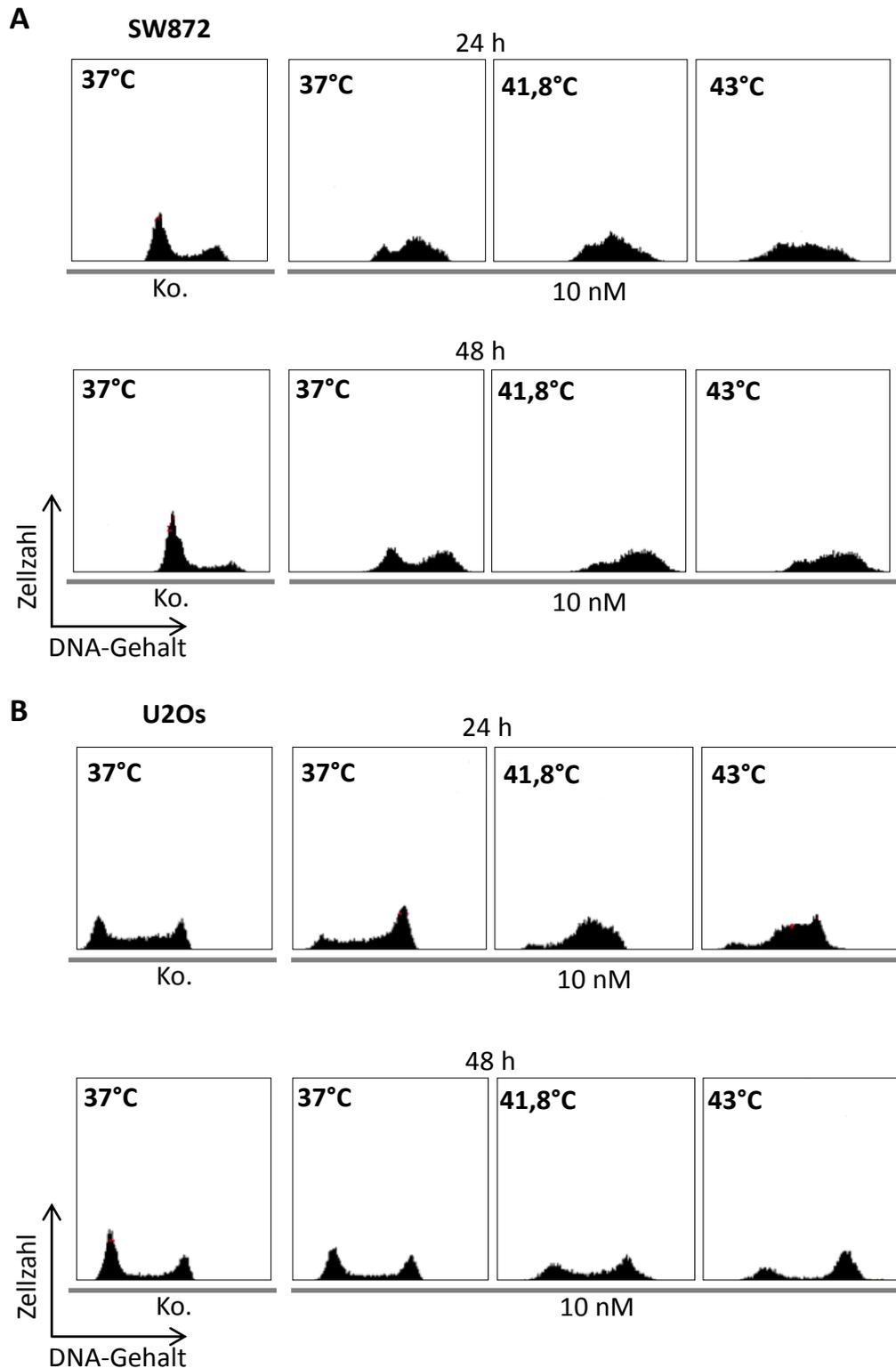


Abb. 3.5 DNA-Verteilung von SW872 (A) und U2Os (B) Zellen 24 h und 48 h nach Behandlung mit Tr und HS Die Zellen wurden einer dreistündigen Tr-Behandlung unterzogen (10 nM) und in den letzten 90 min einem HS (41,8°C und 43°C, 90 min) ausgesetzt. Abgebildet sind repräsentative Zellzyklushistogramme aus vier (SW872) und fünf (U2Os) unabhängigen Experimenten.

3.3.2 Quantifizierung der Apoptose

Der Anteil apoptotischer Zellen wurde durch die Analyse des subG1-Bereiches der Zellzyklushistogramme ermittelt.

Nach einer Postinkubationszeit von 72 h wurde bei den untersuchten SW872 (Abb. 3.6 A) und U2Os (Abb. 3.6 B) Zellen ein dosisabhängiger Anstieg der DNA im subG1-Bereich gemessen, was für eine einsetzende Apoptose spricht. Das Ausmaß der Tr-induzierten (5-20 nM) Apoptose stieg durch einen zusätzlichen HS bei sowohl 41,8°C und 43°C weiter an. Ein alleiniger HS führte in einem nur sehr geringen Maß zu Apoptose.

Nach einer Tr-Inkubation (10 nM) und einem HS (41,8°C und 43°C) belief sich bei SW872 Zellen der prozentuale DNA-Anteil im subG1 Bereich auf 22 % bzw. 25 %. Mit nur 7,4 % war die Apoptoseinduktion einer alleinigen Tr-Behandlung vergleichsweise gering. Trotz eines recht ähnlichen Verlaufes beider Zelllinien bei der Zellzyklusanalyse variierte der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen im Vergleich zwischen SW872 und U2Os Zellen. Während sich nahezu ein Viertel der DNA von SW872 Zellen nach der Kombinationsbehandlung im subG1-Bereich befand, waren es bei U2Os Zellen lediglich 12,9 %. Bei einer alleinigen Tr-Inkubation belief sich der Anteil hier auf 6,5 % (Abb. 3.6).

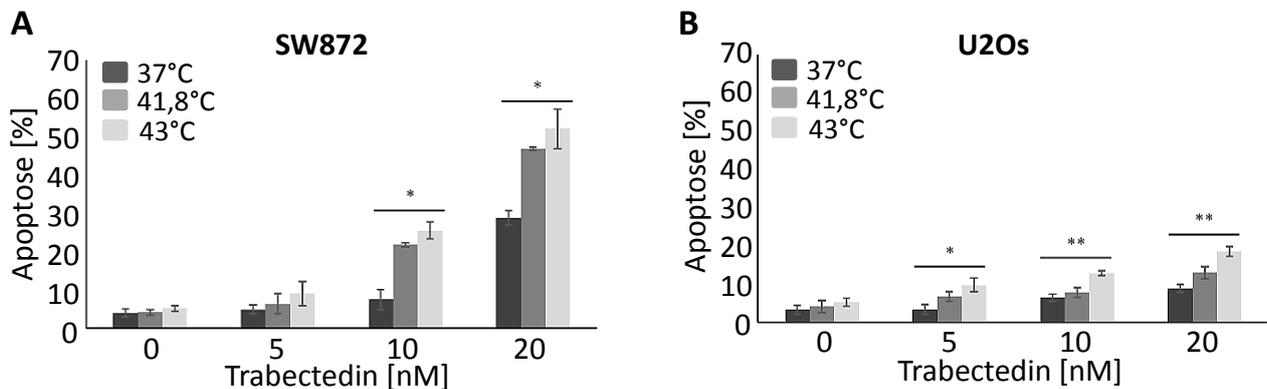


Abb. 3.6 Analyse des DNA-Anteils im subG1-Bereich nach 72 h SW872 (A) und U2Os (B) Zellen wurden mit Tr (5-20 nM, 3 h) und einem HS (41,8°C und 43°C, 90 min) behandelt. Abgebildet sind Balkendiagramme mit SEM der Mittelwerte aus vier (SW872) und fünf (U2Os) unabhängigen Experimenten. Die ANOVA wurde jeweils für die Ansätze gleicher Tr-Konzentration berechnet.

Aufgrund des unterschiedlichen Ausmaßes der hitzebedingten Verstärkung einer Tr-induzierten Apoptoseinduktion bei den beiden untersuchten Zelllinien war anzunehmen, dass sich die zellulären Auswirkungen des Zellzyklusarrests auf molekularer Ebene unterschieden.

Zur weiteren Untersuchung der behandlungsinduzierten Apoptose wurde die Aktivität der Caspasen 3 und 7 jeweils 24, 48 und 72 h nach der Behandlung untersucht. Für die Analysen wurden SW872 und U2Os Zellen simultan mit Tr (10 nM, 3 h) und einem HS (41,8°C und 43°C, 90 min) behandelt.

Die Messungen erbrachten bei SW872 Zellen bei allen Behandlungsansätzen ein deutliches Fluoreszenzsignal ([FU] von *fluorescent unit*), das im Verlauf der drei untersuchten Zeitpunkte kontinuierlich anstieg (Abb. 3.7 A). Dabei wurde deutlich, dass insbesondere 72 h nach den Kombinationsbehandlungen mit HS der Anstieg der Caspasenaktivität im Vergleich zu der alleinigen Tr-Inkubation um ein siebenfaches erhöht gewesen ist. Bei der Messung der DEVDase-Aktivität der Caspasen aus den Proteinlysaten von U2Os Zellen stellte sich heraus, dass durch Tr nur ein minimaler Anstieg des Fluoreszenzsignals stattgefunden hat, der auch durch einen HS nicht weiter verstärkt wurde (Abb. 3.7 B).

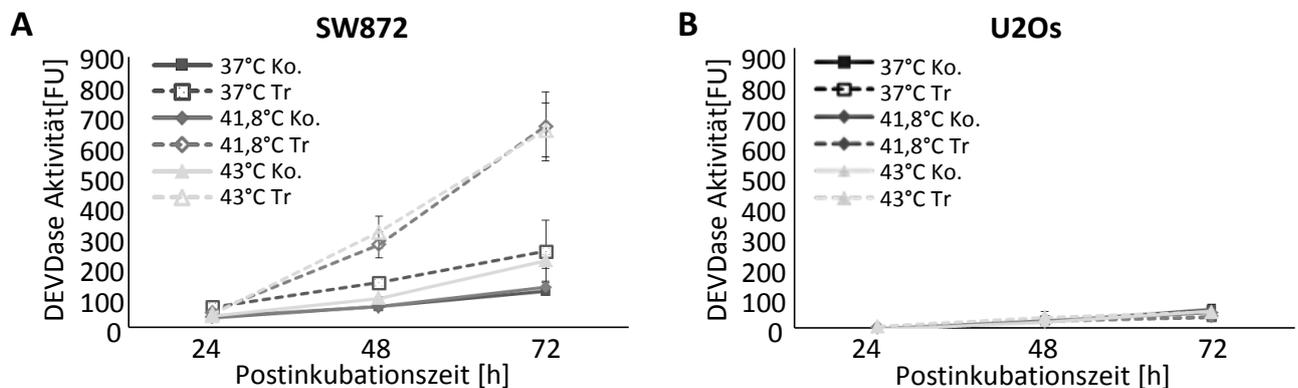


Abb. 3.7 DEVDase-Aktivität der Caspasen 3 und 7 bei SW872 (A) und U2Os (B) Die Zellen wurden 24, 48 und 72 h nach einer Behandlung mit Tr (10 nM, 3 h) und einem HS (41,8°C und 43°C, 90 min) für die Messung geerntet. Graphische Darstellung der Mittelwerte und SEM aus vier unabhängigen Experimenten.

3.3.3 Analyse der Seneszenz bei U2Os und SW872 Zellen

Zur Erörterung der unterschiedlichen Stärke der Apoptoseinduktion bei den untersuchten Zelllinien wurde das Ausmaß einer weiteren Extremreaktion auf zellulären Stress, der Seneszenz, untersucht.

Die Quantifizierung des Anteils seneszenten Zellen innerhalb der behandelten Zellkultur erfolgte nach einer Postinkubationsphase von 24, 48, 72 und 144 h nach Tr (5-20 nM, 3 h) und einem HS (41,8°C und 43°C, 90 min). Abb. 3.8 zeigt den Anteil seneszenten Zellen nach einer Postinkubationsphase von 72 h und 144 h. Nach einer Erholungsphase von 24 h und 48 h wurde keine Seneszenz beobachtet.

Es ist deutlich erkennbar, dass U2Os Zellen (A), die durch die Behandlung nur sehr gering in Apoptose gegangen sind, durch Tr im Laufe der 144 h einen kontinuierlich steigenden Anteil an seneszenten Zellen aufwiesen (8,7 % bei 37°C (10 nM)). Dies wurde durch einen HS, abhängig von der Höhe der Temperatur weiter verstärkt (12,5 % bei 41,8°C und 26,2 % bei 43°C (10 nM)).

SW872 Zellen (B) hingegen, die eine hohe Caspasenaktivität sowie einen großen Anteil an apoptotischen Zellen in der Nicoletti-Färbung zeigten, wiesen keinerlei Anzeichen für Seneszenz auf.

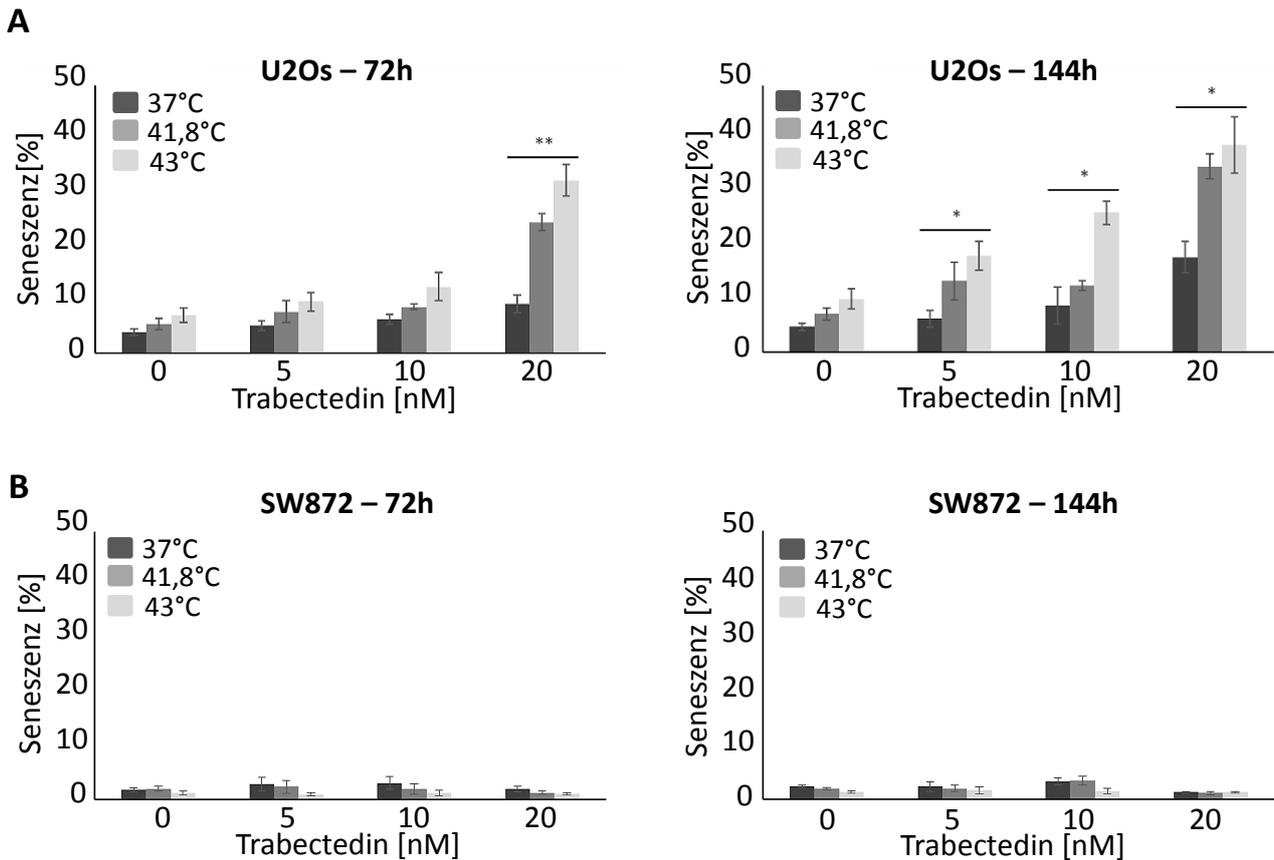


Abb. 3.8 Quantifizierung der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase-Aktivität bei U2Os (A) und SW872 (B) Zellen Die Zellen wurden 72 und 144 h nach einer Behandlung mit Tr (5-20 nM, 3 h) und einem HS (41,8°C und 43°C, 90 min) für die Messung geerntet. Balkendiagramme der Mittelwerte und SEM aus vier (U2Os) und drei (SW872) unabhängigen Experimenten. Die ANOVA wurde jeweils für die Ansätze gleicher Tr-Konzentration berechnet.

Zudem wurde auf Proteinebene die Expression des CDK (Cyclin-abhängige Kinase, engl. *cyclin dependent kinase*)- Inhibitors p21 (auch p21^{WAF/CIP1}) untersucht, das in seneszenten Zellen verstärkt exprimiert wird (Campisi & d'Adda di Fagagna 2007; Lauber et al. 2012).

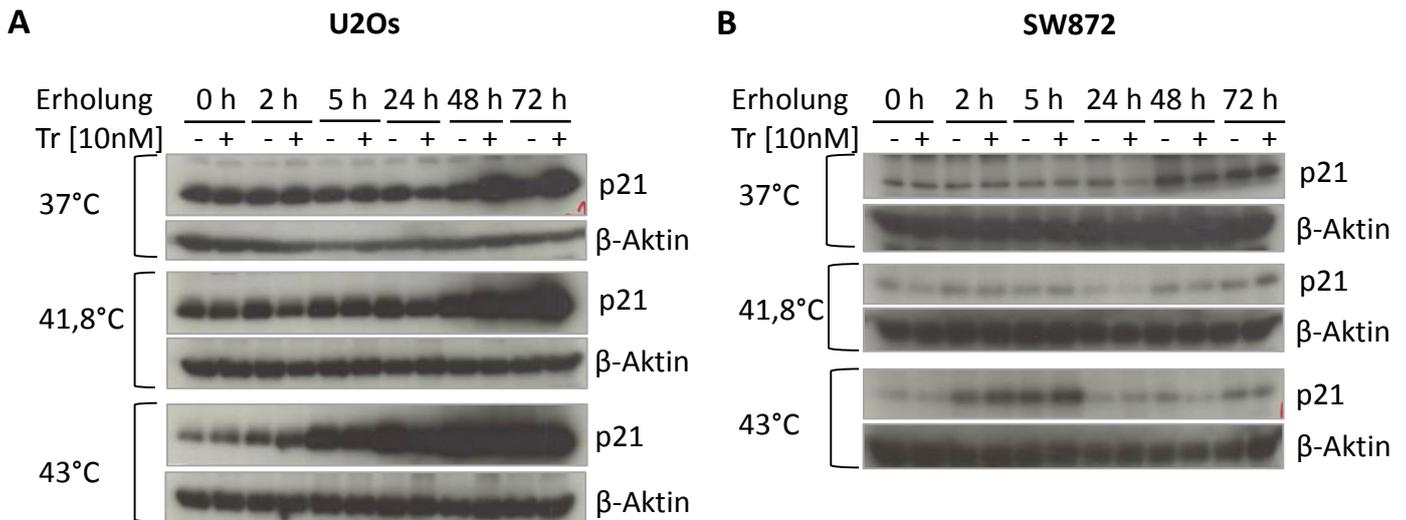


Abb. 3.9 Western Blot Analyse der p21 Expression bei U2Os (A) und SW872 (B) Die Zellen wurden mit Tr (10 nM) behandelt und einem HS (41,8°C oder 43°C) unterzogen. Die Proteine wurden jeweils 0, 2, 5, 24, 48 und 72 h nach der Behandlung isoliert, über SDS-PAGE (12 %-iges Gel) aufgetrennt und die p21-Expression im Western Blot analysiert. Aufgetragen wurden jeweils 50 µg des Proteinlysates. Als Haushaltsgen diente β-Aktin. Exemplarische Western Blots aus drei unabhängigen Experimenten.

Abb. 3.9 zeigt die Proteinexpression von p21 im Western Blot für U2Os (A) und SW872 (B) Zellen. Bei U2Os Zellen steigt die p21-Expression nach einer alleinigen Tr-Behandlung nach 48 h und 72 h an, was durch einen HS bei 41,8°C nicht verändert wurde. Betrachtet man die Expressionsstärke von p21 nach einem HS bei 43°C stellt man fest, dass die Expression des Proteins fünf Stunden nach der Hitzeexposition allein stark ansteigt. Dies wird durch eine zusätzliche Tr-Behandlung nicht weiter beeinflusst. Die anfängliche p21-Expression war nach einem HS bei 43°C deutlich reduziert und die nachfolgende starke Zunahme nach 48 h und 72 h unterschied sich nicht von den Expressionsstärken niedriger Temperaturen. Entgegen der Aussage von Simoens *et al.* (2003), dass Tr die Transkription von p21 inhibiert, schien die Expression dieses Proteins durch Tr nach 48 h und 72 h leicht verstärkt aufzutreten. Ein HS bei 43°C resultierte offenbar nach einer anfänglich schwächeren Expression von p21 in einer Tr-unabhängigen Zunahme.

Die p21-Western Blot Analyse bei SW872 Zellen ergab, dass sowohl eine Inkubation mit Tr, als auch ein HS keine wesentliche bzw. eine vergleichbar deutlich schwächere Auswirkung auf die p21 Expression hatte.

3.4 Proteinchemische Analyse der DNA-Reparatur

Zur weiteren Aufklärung der HS-vermittelten Beeinträchtigung der DNA-Reparatur wurde die hitzebedingte Degradierung von BRCA2 an verschiedenen Tumorzelllinien untersucht und die unmittelbaren Konsequenzen auf die HR analysiert.

3.4.1 Degradierung von BRCA2 nach einem Hitzeschock bei 41,8°C und 43°C

Neben den Sarkomzelllinien U2Os, SW872, SW982, RD-ES und SKUT-1 wurde zudem die BRCA2-Expression in der Kolonkarzinomzelllinie DLD1 analysiert, da auch diese Zelllinie für spätere Analysen verwendet wurde. Hierfür wurden die Zellen jeweils zeitgleich mit Tr (1 nM und/oder 2 nM, 3 h) und einem HS (41,8°C und 43°C, 90 min) behandelt. Die Expressionsstärke von BRCA2 wurde unmittelbar nach der Behandlung im Western Blot überprüft.

Die Balkendiagramme aus Abb. 3.10 demonstrieren, dass aufgrund des HS bei allen untersuchten Zelllinien eine Reduktion der BRCA2-Expression stattgefunden hat. Hierbei zeigte sich ebenfalls, dass die Degradierung von BRCA2 mit steigenden Temperaturen zunimmt. Eine zusätzliche Inkubation mit Tr hatte keinen Einfluss auf die Expression des BRCA2-Proteins.

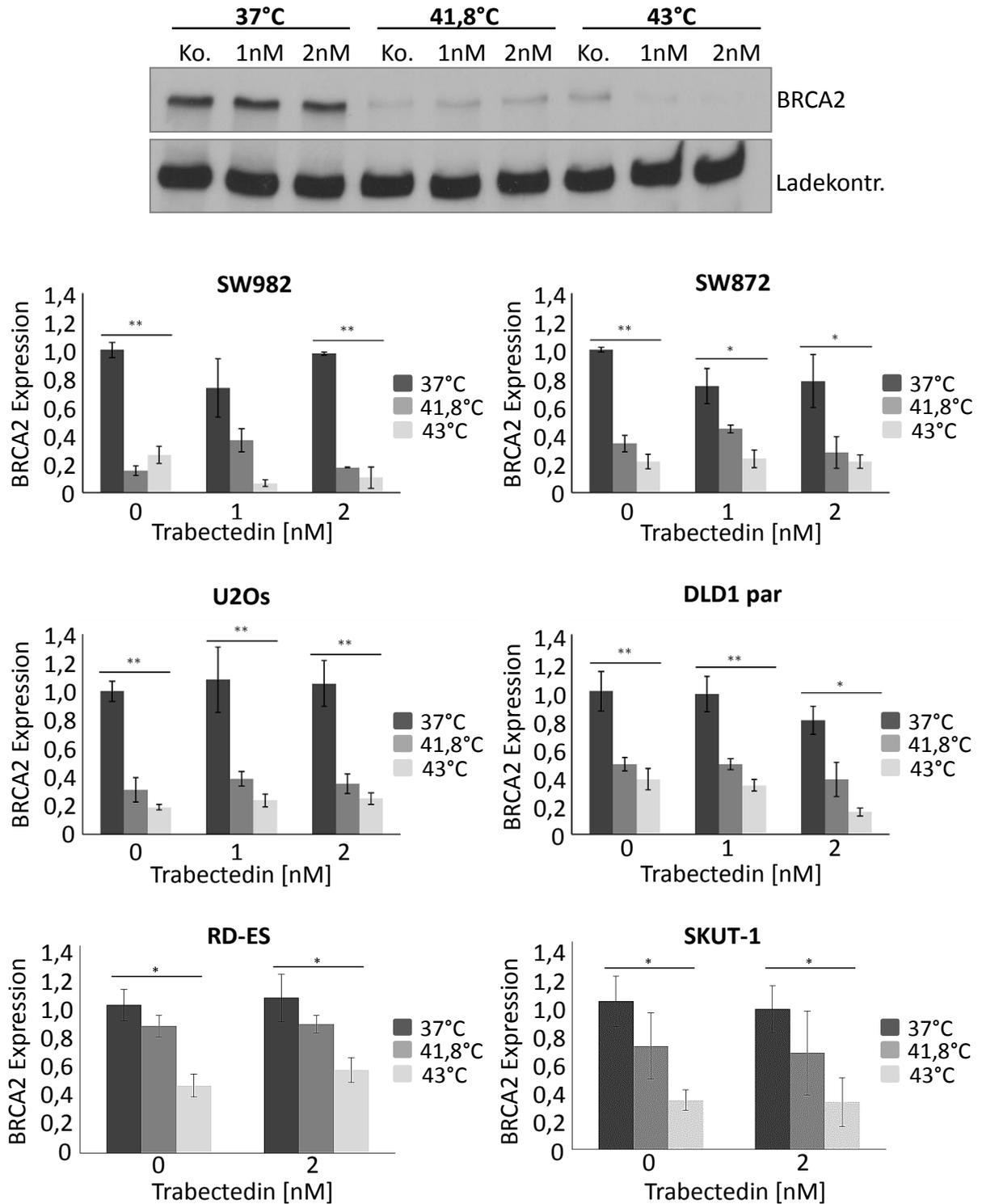


Abb. 3.10 Analyse der BRCA2-Expression nach Tr und HS mittels Western Blot Die Zellen wurden nach einer simultanen Tr- (1 nM und/oder 2 nM, 3 h) und HS- (41,8°C oder 43°C, 90 min) Behandlung geerntet, Proteine wurden aus Gesamtzelllysaten isoliert und im Western Blot analysiert. Aufgetragen wurden jeweils 20 µg des Proteinextraktes. Oben: Exemplarischer Western Blot von SW982 Zellen; Unten: Semiquantitative densitometrische Auswertung mittels ImageJ. Balkendiagramme der Mittelwerte und SEM aus drei unabhängigen Experimenten für SW982, SW872, U2Os, DLD1par, RD-ES und SKUT-1 Zellen. Die ANOVA wurde jeweils für die Ansätze gleicher Tr-Konzentration berechnet.

3.4.2 Quantifizierung des DNA-Schadens durch H2AX-Phosphorylierung

Zur Untersuchung der unmittelbaren Auswirkungen der BRCA2-Degradierung auf die DSB-Reparatur, wurden auftretende γ H2AX Foci immunzytochemisch detektiert und quantifiziert. Für die Quantifizierung der Tr-induzierten γ H2AX Foci nach einem HS wurden U2Os Zellen 3 h mit Tr behandelt (0,5 nM und 2 nM) und zusätzlich einem HS (41,8°C und 43°C, 90 min) unterzogen. Da die DSBs erst aufgrund der TC-NER vermittelten Prozessierung der Tr-induzierten DNA-Läsionen entstehen (Tavecchio et al. 2008), wurde eine vierstündige Postinkubationsphase nach der Behandlung angesetzt. Zellen, die mehr als fünf γ H2AX Foci pro Zellkern aufwiesen, wurden als DSB-positiv erachtet.

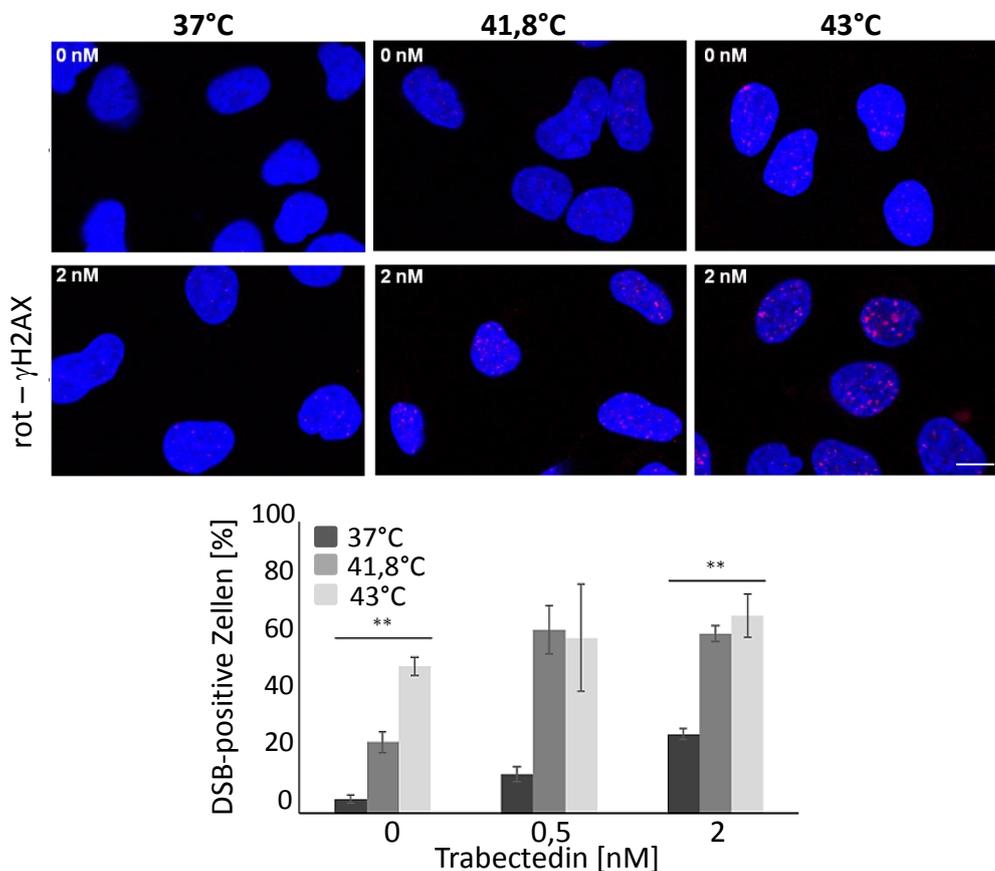


Abb. 3.11 Quantifizierung DSB-positiver Zellen durch γ H2AX Foci bei U2Os Die Zellen wurden simultan mit Tr (0,5 nM und 2 nM, 3 h) behandelt und einem HS (41,8°C und 43°C, 90 min) unterzogen und nach einer vierstündigen Postinkubationsphase fixiert. γ H2AX Foci wurden in rot und DNA in blau dargestellt. Als DSB-positiv wurden Zellen mit mehr als 5 γ H2AX Foci pro Zellkern gewertet. Oben: Repräsentative Abbildung der γ H2AX Foci bei 37°C oder nach einem HS, mit oder ohne Tr-Inkubation (2 nM). Maßstab: 10 μ m. Unten: Balkendiagramme der Mittelwerte und SEM der quantitativen Auswertung aus drei unabhängigen Experimenten. Die ANOVA wurde jeweils für die Ansätze gleicher Tr-Konzentration berechnet.

Abb. 3.11 (obere Abbildung) zeigt repräsentativ die mikroskopische Ansicht der Zellkerne mitsamt γ H2AX Foci. Im unteren Teil der Abbildung ist die statistische Auswertung des prozentualen Anteils DSB-positiver Zellen nach den entsprechenden Behandlungen zu sehen. Eine alleinige Tr-Behandlung induzierte erwartungsgemäß einen Anstieg der γ H2AX Foci (unbehandelt 4,8 % vs. 2 nM Tr 27,2 %). Die Hitzeexposition bei beiden Temperaturen resultierte ebenfalls in einer erhöhten Zahl an akkumuliertem γ H2AX. Die statistische Auswertung der DSB-positiven Zellen aus Abb. 3.11 verdeutlicht, dass durch einen zusätzlichen HS die Anzahl der Tr-induzierten DNA-geschädigten Zellen relevant angestiegen ist.

3.4.3 Kolokalisation von γ H2AX und RAD51

Zur Untersuchung der Reparatur der behandlungsinduzierten DSBs wurden U2Os Zellen mit Tr (0,5 nM und 2 nM, 3 h) und einem HS (41,8°C und 43°C, 90 min) behandelt und die Rekrutierung der RAD51-Rekombinase zu den γ H2AX Foci immunzytochemisch analysiert.

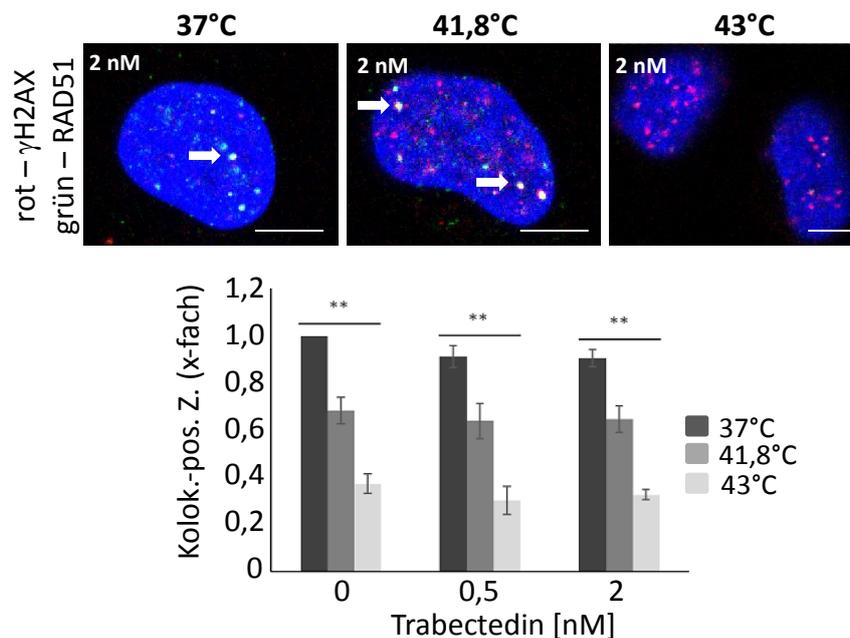


Abb. 3.12 Kolokalisationen von γ H2AX und RAD51 bei U2Os Zellen Die Zellen wurden simultan mit Tr (0,5 nM und 2 nM, 3 h) behandelt und einem HS (41,8°C und 43°C, 90 min) unterzogen und nach einer vierstündigen Postinkubationsphase fixiert. γ H2AX Foci wurden in rot, RAD51 in grün und DNA in blau dargestellt. Oben: Repräsentative Aufnahmen der analysierten Zellkerne. Kolokalisationen wurden mit Pfeilen markiert. Maßstab: 10 μ m. Unten: Balkendiagramme der Mittelwerte und SEM der statistischen Auswertung des Prozentsatzes kolokalisations-positiver Zellen aus den ermittelten DSB-positiven Zellen aus drei unabhängigen Experimenten. Die ANOVA wurde jeweils für die Ansätze gleicher Tr-Konzentration berechnet.

Die Begutachtung im konfokalen Fluoreszenzmikroskop ergab, dass nach einer alleinigen Tr-Inkubation (2 nM) bei annähernd allen DSB-positiven Zellen eine Kolokalisation zwischen γ H2AX und RAD51 aufgetreten ist, die nach 41,8°C reduziert war und nach 43°C deutlich weniger zu detektieren gewesen ist (Abb. 3.12, obere Ansicht; dargestellt als gelbe Foci und mit Pfeilen markiert). Die statistische Auswertung der Auszählung bestätigte einen prozentualen Anteil von 100 – 90 % kolokalisations-positiver Zellen bei 37°C und eine Reduktion auf 68 – 64 % bei 41,8°C und auf 37 – 34 % bei 43°C (Abb. 3.12, unten).

3.5 Die Involvierung von BRCA2 in die thermale Chemosensitivierung

Im Folgenden wurde die Abhängigkeit der BRCA2-Degradierung für die beobachtete thermale Chemosensitivierung der Zellen untersucht. Um dies zu überprüfen, wurden zwei unterschiedliche BRCA2-defiziente Zellmodelle verwendet. Zum einen wurde in U2Os Zellen ein siRNA-vermittelter *Knockdown* (KD) der BRCA2-Proteinexpression durchgeführt. Zum anderen wurde für die Untersuchungen eine Kolonkarzinomzelllinie mit einer stabilen BRCA2 Depletion (DLD1 *BRCA2*^{-/-}) herangezogen.

3.5.1 Das klonogene Überleben nach einem BRCA2-Knockdown bei U2Os Zellen

Um einen effektiven BRCA2-KD bei U2Os Zellen zu erreichen, der mit der Restexpression des Proteins nach einer hitzebedingten Degradierung zu vergleichen war, bedurfte es einer intensiven Transfektionsoptimierung.

U2Os Zellen wurden in sechs Ansätzen mit siRNAs gegen BRCA2 in unterschiedlichen Kombinationen behandelt. Die einzelnen siRNA-Sequenzen sind in Punkt 2.1.10.3 aufgeführt und werden im Folgenden als Sequenz 1, 3, 6 oder 7 bezeichnet. Als Transfektionsreagenz wurde HiPerFect eingesetzt. Tabelle 3.2 sind die Versuchsansätze I – VI, sowie die Negativkontrolle AllStars (AS) zu entnehmen.

Ergebnisse

Tab. 3.2 Transfektionsansätze für BRCA2-Transfektionsoptomierung

Ansatz	siRNA	HiPerFect	Gehalt siRNA im well
Negativkontrolle	AllStars (AS)	12 µl	1
I	Sequenz 6 und 7	12 µl	1+1
II	Sequenz 1 und 6	12 µl	1+1
III	Sequenz 1,3,6,7	12 µl	¼ +¼+¼+¼
IV	Sequenz 1,3,6,7	12 µl	1+1+1+1
V	Sequenz 1,3,6,7	24 µl	1+1+1+1
VI	Sequenz 1,3,6,7	je 12 µl	Separat angesetzt jeweils x 1

In je 2,5 ml Kulturmedium

Die Proteinexpression von BRCA2 wurde 48 h und 72 h nach der Transfektion im Western Blot überprüft.

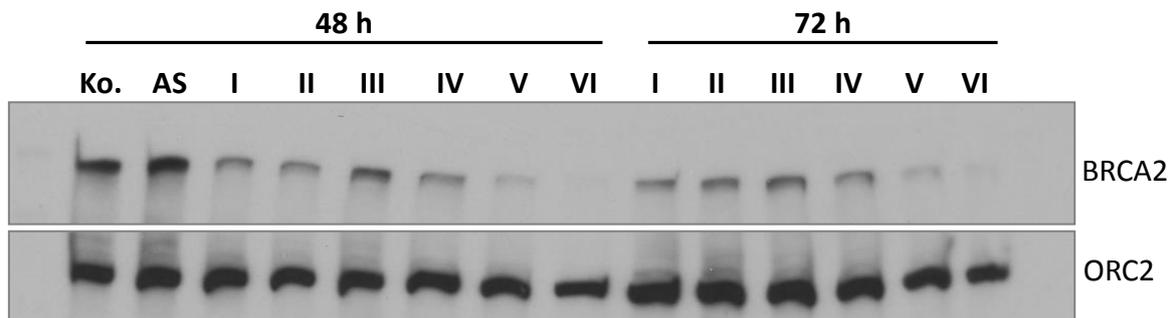


Abb. 3.13 Transfektionsoptimierung für einen siRNA-vermittelten BRCA2-KD bei U2Os Zellen Die Zellen wurden mit den in Tab. 3.2 aufgeführten Ansätzen transfiziert und nach 48 h und 72 h geerntet. Die Proteine wurden aus Gesamtzelllysaten isoliert und die Restproteinexpression von BRCA2 wurde mittels SDS-PAGE (5% SDS-Gele) und Western Blot überprüft. Als Haushaltsgen diente ORC2. Aufgetragen wurden je 20 µg Proteinextrakt.

Die Western Blot Analyse der Transfektionsoptimierung ergab, dass Ansatz VI, bei dem jede der vier siRNA-Sequenzen komplett separat angesetzt und zu den Zellen gegeben wurde, nach 48 h und 72 h den effektivsten KD erzielt hatte. Im Vergleich zu den Kontrollzellen wiesen die transfizierten Zellen in der mikroskopischen Begutachtung eine weitaus geringere Konfluenz und zahlreiche abgelöste Zellen auf,

waren aber dennoch für die Verwendung weiterer Analysen geeignet, da ein ausreichender Teil der Zellen vital geblieben war.

Abb. 3.14 zeigt die graphische Darstellung des hitzekorrigierten klonogenen Überlebens nach einer Transfektion mit der AS Negativkontrolle (linke Seite) und den BRCA2 siRNAs (rechte Seite) und nach einer kombinierten Tr (1 – 4 nM, 3 h)- und HS (41,8°C und 43°C, 90 min)-Behandlung. Die Zellen mit einem BRCA2-KD wiesen eine ausgeprägtere Sensitivität gegenüber einem HS (klonogenes Überleben 41,8°C: 73 %, 43°C: 21%) im Vergleich zu AS-transfizierten Zellen auf (41,8°C: 85 %, 43°C: 32 %). Für jedes Experiment wurde die Stärke des BRCA2-KDs im Western Blot überprüft.

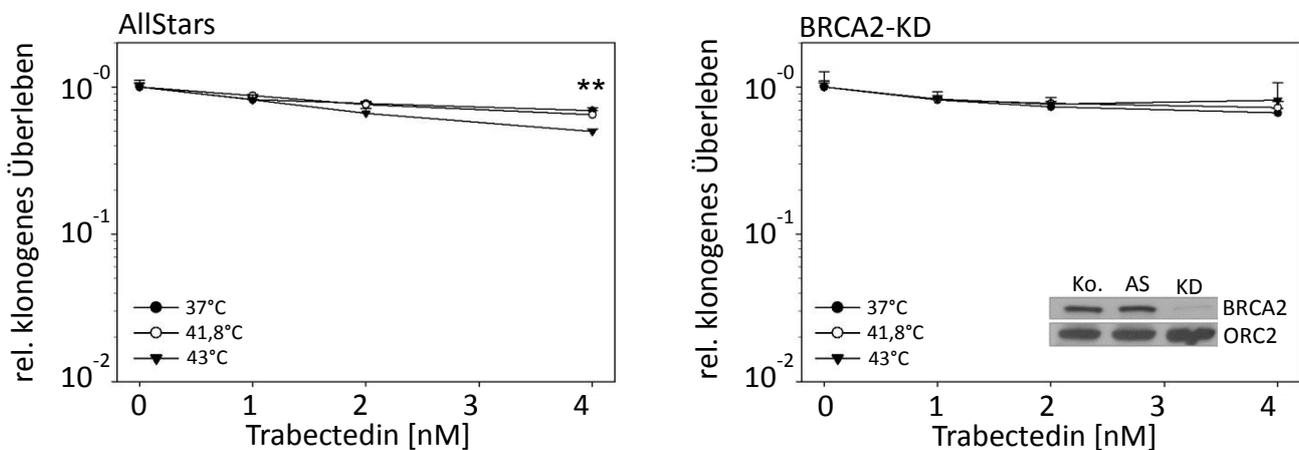


Abb. 3.14 Analyse des klonogenen Überlebens von U2Os Zellen mit einem BRCA2-KD im Vergleich zur AS Negativkontrolle Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit den entsprechenden siRNA Sequenzen für den klonogenen Assay ausgesät und am Folgetag mit Tr (1 – 4 nM, 3 h) und einem HS (41,8°C und 43°C, 90 min) behandelt. Linke Seite: AS Negativkontrolle; Rechte Seite: BRCA2-KD mit eingefügtem exemplarischem Western Blot Nachweis des KDs. Graphische Darstellung der Mittelwerte und SEM der hitzekorrigierten Daten aus sieben unabhängigen Experimenten. Die ANOVA wurde jeweils für die Ansätze mit der höchsten Tr-Konzentration (4 nM) berechnet.

Die Zellen, die mit der AS-Negativkontrolle transfiziert wurden, zeigten durch Tr ein dosisabhängig reduziertes klonogenes Überleben auf, das aber im Vergleich zu anfänglichen Experimenten mit U2Os einen deutlich schwächeren Effekt erzielte (77 % vs. 62 % bei 2 nM). Es zeichnete sich aber dennoch nach einem HS bei 43°C eine thermale Chemosensitivierung im Vergleich zu einer alleinigen Tr-Inkubation (von 70 % auf 50 % bei 4 nM, hitzekorrigierter Wert) ab. Ein KD von BRCA2 resultierte in einer

ähnlich starken Reduktion des klonogenen Überlebens durch Tr. Ein weiteres Absinken durch einen zusätzlichen HS im Sinne einer Chemosensitivierung trat hier allerdings nicht auf (Abb. 3.14).

Wider Erwarten wurde bei den Zellen mit einem BRCA2-KD keine erhöhte Sensitivität gegenüber Tr beobachtet (D'Incalci & Galmarini 2010). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass offenbar auch die Proteinexpression von XPG durch die Transfektionen beeinflusst wurde. Abb. 3.15 zeigt die Abnahme der XPG-Expressionsstärke nach einer Transfektion mit der AS siRNA und den gegen BRCA2 gerichteten siRNAs. Die XPG-Proteinexpression wurde sowohl zum Zeitpunkt des Aussähens für den klonogenen Assay überprüft, als auch zum Behandlungszeitpunkt.

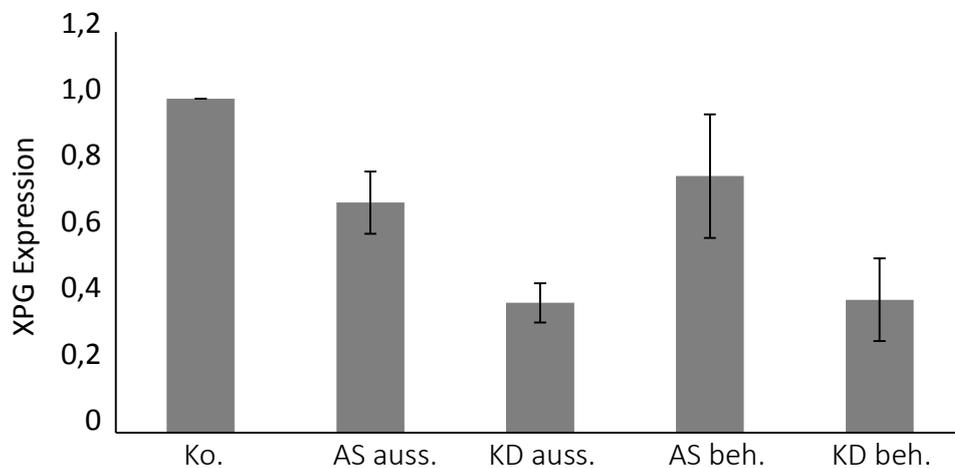


Abb. 3.15 Reduktion der XPG-Proteinexpression nach einer Transfektion mit der AS-siRNA und dem siRNA-Mix gegen BRCA2 U2Os Zellen wurden 48h Stunden nach der Transfektion geerntet. Ein Teil des Zellextraktes wurde für den klonogenen Assay verwendet und der andere diente zur Überprüfung der Proteinexpression im Western Blot (AS/KD auss.). Zum Zeitpunkt der Behandlung wurden ebenfalls Zellen aus einem zusätzlichen Ansatz für die weitere Überprüfung des KDs geerntet (AS/KD beh.). Die Proteinlysate für die SDS-PAGE (5 %-ige Gele) wurden aus Gesamtzellextrakten isoliert. Aufgetragen wurden jeweils 30 µg des Proteinlysates. Die semiquantitative densitometrische Auswertung erfolgte über ImageJ. Abgebildet sind Balkendiagramme der Mittelwerte und SEM aus zwei unabhängigen Experimenten

3.5.2 Das klonogene Überleben bei BRCA2-defizienten DLD1 Zellen

Nach einem BRCA2-KD fand bei U2Os Zellen keine thermale Chemosensitivierung gegenüber Tr durch einen HS statt. Da aber bei dem KD auch ein Interferieren mit der Expression von XPG beobachtet wurde, wurden die Effekte einer Kombinationsbehandlung bei DLD1 Kolonkarzinomzellen untersucht, die das BRCA2-Protein durch eine gezielte Unterbrechung am Exon 11 stabil nicht mehr exprimieren (DLD1 *BRCA2*^{-/-}; Ref. (Hucl et al. 2008)). Als Kontrollzellen dienten hier syngene parentale DLD1 Zellen mit *wt* (Wildtyp) BRCA2. Die Behandlungsbedingungen entsprachen denen der transfizierten U2Os Zellen. Die graphische Darstellung der hitzekorrigierten Werte des klonogenen Überlebens wird in Abb. 3.16 gezeigt.

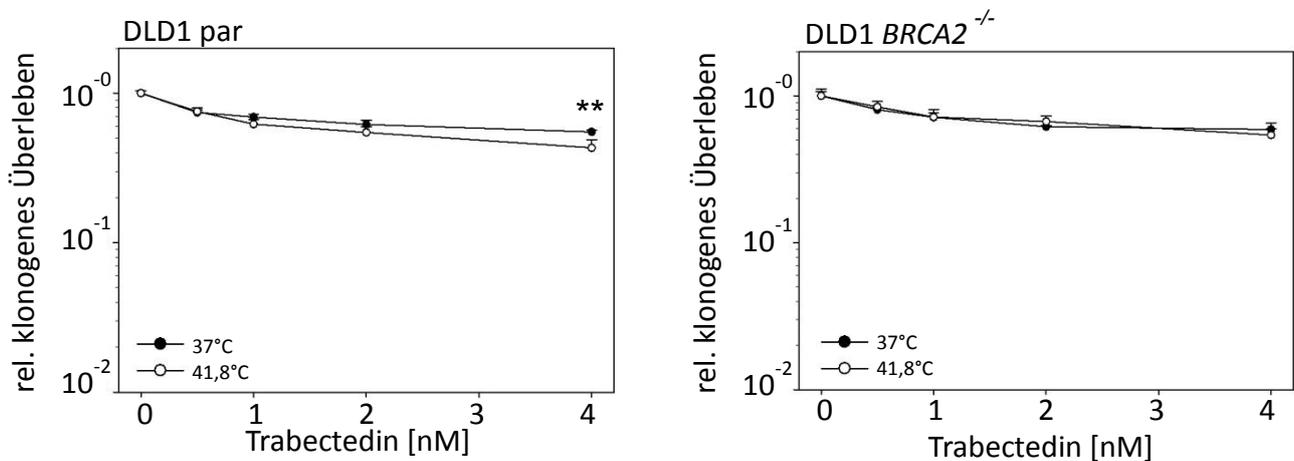


Abb. 3.16 Das klonogene Überleben von DLD1 *BRCA2*^{-/-} Zellen im Vergleich zur parentalen Zelllinie Die Zellen wurden einer simultanen Tr (0,5 – 4 nM, 3 h) - und HS- (41,8°C und 43°C, 90 min) Behandlung unterzogen und das Überleben wurde im klonogenen Assay ermittelt. Graphische Darstellung der Mittelwerte und SEM der hitzekorrigierten Daten aus sechs (DLD1 par, linke Seite) und neun (DLD1 *BRCA2*^{-/-}, rechte Seite) unabhängigen Experimenten. Die ANOVA wurde jeweils für die Ansätze mit der höchsten Tr-Konzentration (4 nM) berechnet.

Bei beiden DLD1-Zelllinien erfolgte eine dosisabhängige Reduktion des klonogenen Überlebens durch Tr (4 nM DLD1par: 55 %; DLD1 *BRCA2*^{-/-}: 57 %). Aufgrund einer extremen Hitzesensitivität bei DLD1 *BRCA2*^{-/-} Zellen nach einem HS bei 43°C sind in Abb. 3.16 lediglich die Graphen für die Tr-Behandlung bei 37°C und 41,8°C dargestellt. Die parentalen DLD1 Zellen (rechte Seite) wiesen bereits nach einem HS bei 41,8°C eine thermale Chemosensitivierung bei 4 nM Tr auf (43 %, hitzekorrigierter Wert). Die BRCA2-defizienten Zellen hingegen zeigten keine Anzeichen für eine thermale Chemosensitivierung.

Bei beiden BRCA2-defizienten Zellmodellen hat ein HS keine Wirkungssteigerung von Tr erzielt. Die Sensitivität auf eine alleinige Tr-Behandlung unterschied sich hierbei zwischen den BRCA2-defizienten Zellen und den syngenen Kontrollzellen nicht. Zudem wurde die Zytotoxizität von Tr *in vitro* bei DLD1 Kolonkarzinomzellen nachgewiesen, einer weiteren, hierfür bisher nicht untersuchten Tumorentität.

3.5.3 Zellzyklus- und subG1-Analysen bei DLD1 Zellen

Zur weiteren Entschlüsselung der Bedeutung einer hitzebedingten BRCA2-Degradierung wurde bei DLD1 *BRCA2*^{-/-} Zellen die Verteilung der DNA im Zellzyklushistogramm nach einer Tr - (5 – 20 nM, 3 h) und HS - (41,8°C und 43°C, 90 min) Behandlung analysiert und mit der von parentalen DLD1 Zellen verglichen.

Abb. 3.17 zeigt die Balkendiagramme des prozentualen Anteils der Zellen im G2-Arrest 24 h nach der Behandlung. Durch eine Tr-Behandlung (10 nM) bei 37°C erhöhte sich dieser bei beiden Zelllinien von 30 % (29 – 31 %) in der Kontrolle auf 40 % (36 – 42 %). Bei den parentalen Zellen steigerte sich der Anteil an G2-arretierten Zellen nach einem HS bei 43°C zusätzlich auf 55 % (Abb. 3.17 A). BRCA2-defiziente Zellen wiesen hingegen nach einem HS keinen verstärkten G2-Arrest auf (Abb. 3.17 B).

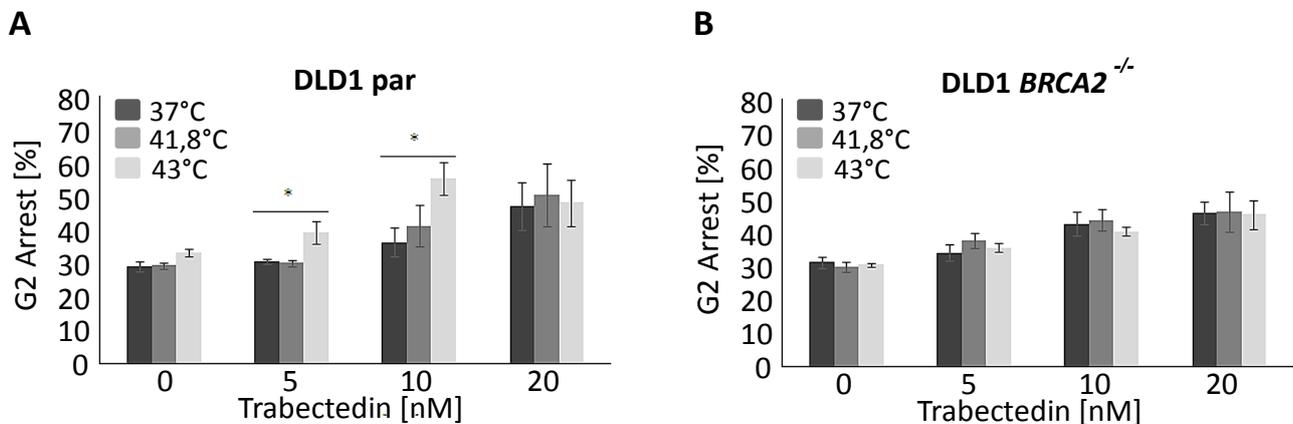


Abb. 3.17 Analyse des Tr-induzierten G2-Arrests bei DLD1 Zellen Parentale DLD 1 Zellen (A) und DLD1 *BRCA2*^{-/-}Zellen (B) wurden einer Tr-Behandlung (5 – 20 nM, 3 h) und einem HS (41,8°C und 43°C, 90 min) unterzogen. Balkendiagramme der Mittelwerte und SEM aus fünf (DLD1par) und vier (DLD1 *BRCA2*^{-/-}) unabhängigen Experimenten. Die ANOVA wurde jeweils für die Ansätze gleicher Tr-Konzentration berechnet.

Zusätzlich wurde bei den Messungen der DNA-Anteil apoptotischer Zellen im subG1-Bereich ermittelt. 72 h nach der Tr-Behandlung (10 nM) zeichnete sich bei parentalen DLD1 Zellen ein leichter Anstieg der Apoptose im Vergleich zu unbehandelten Zellen

(von 3,2 % auf 6,6 %) ab. Ein zusätzlicher HS bei 41,8°C und 43°C resultierte in einer weiteren Erhöhung mit 21 % bzw. 25 % der DNA im subG1-Bereich (Abb. 3.18 A).

Bei den BRCA2-defizienten Zellen war nach 10 nM Tr ein stark ausgeprägter Anstieg in der Apoptose (von 7,5 auf 23,1 %) nachzuweisen. Eine Effektverstärkung durch einen HS wurde allerdings bis auf die Behandlung mit 5 nM Tr nicht beobachtet (Abb. 3.18 B). Dieser ist aufgrund der ähnlichen Entwicklung zu unbehandelten Zellen (0 nM Tr) allerdings eher auf hitzezytotoxische Effekte als auf eine thermale Chemosensitivierung zurückzuführen (0 nM: 7 %, 10 %, 16 % vs. 5 nM: 7 %, 12 %, 18 %).

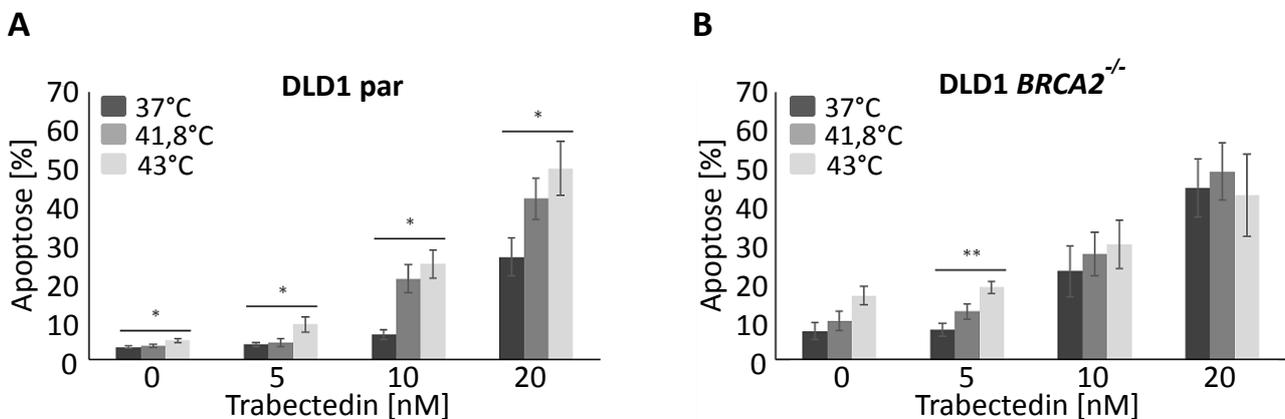


Abb. 3.18 Ermittlung des DNA-Gehaltes im subG1-Bereich bei DLD1 Zellen Parentale DLD1 Zellen (A) und DLD1 *BRCA2*^{-/-} Zellen (B) wurden einer Tr-Behandlung (5 – 20 nM, 3 h) und einem HS (41,8°C und 43°C, 90 min) unterzogen. Balkendiagramme der Mittelwerte und SEM aus fünf (DLD1par) und vier (DLD1 *BRCA2*^{-/-}) unabhängigen Experimenten. Die ANOVA wurde jeweils für die Ansätze gleicher Tr-Konzentration berechnet.

Es wird festgehalten, dass bei BRCA2-defizienten Zellen im Vergleich zur syngen BRCA2-profizienten Kontrolle keine thermale Chemosensitivierung gegenüber Tr stattgefunden hat.

3.6 Einfluss der Kombinationstherapie auf Hitzeschockproteine

Um die inhibierende Funktion von Tr auf die Hsp70 Expression zu überprüfen, sowie eventuell auftretende Auswirkungen auf die Hsp90 Expression zu untersuchen, wurden U2Os Zellen mit Tr (4 nM, 3 h) und einem HS (41,8°C oder 43°C, 90 min) behandelt und die Expression beider Proteine wurde jeweils 0, 0,5, 2, 5, 8, und 24 h nach der Behandlung im Western Blot überprüft.

Abb. 3.19 zeigt exemplarische Western Blots von Hsp70 mitsamt semiquantitativer densitometrischer Auswertung (A) und exemplarische Western Blots der Hsp90 Proteinexpression nach den entsprechenden Behandlungen. Erwartungsgemäß wurde eine verstärkte Expression von Hsp70 nach einem HS (43°C) beobachtet, die durch eine Tr Behandlung unter den gewählten Bedingungen nicht beeinflusst wurde. Auf die Expression von Hsp90 nahmen weder eine Tr- noch eine HS-Behandlung einen modulierenden Einfluss.

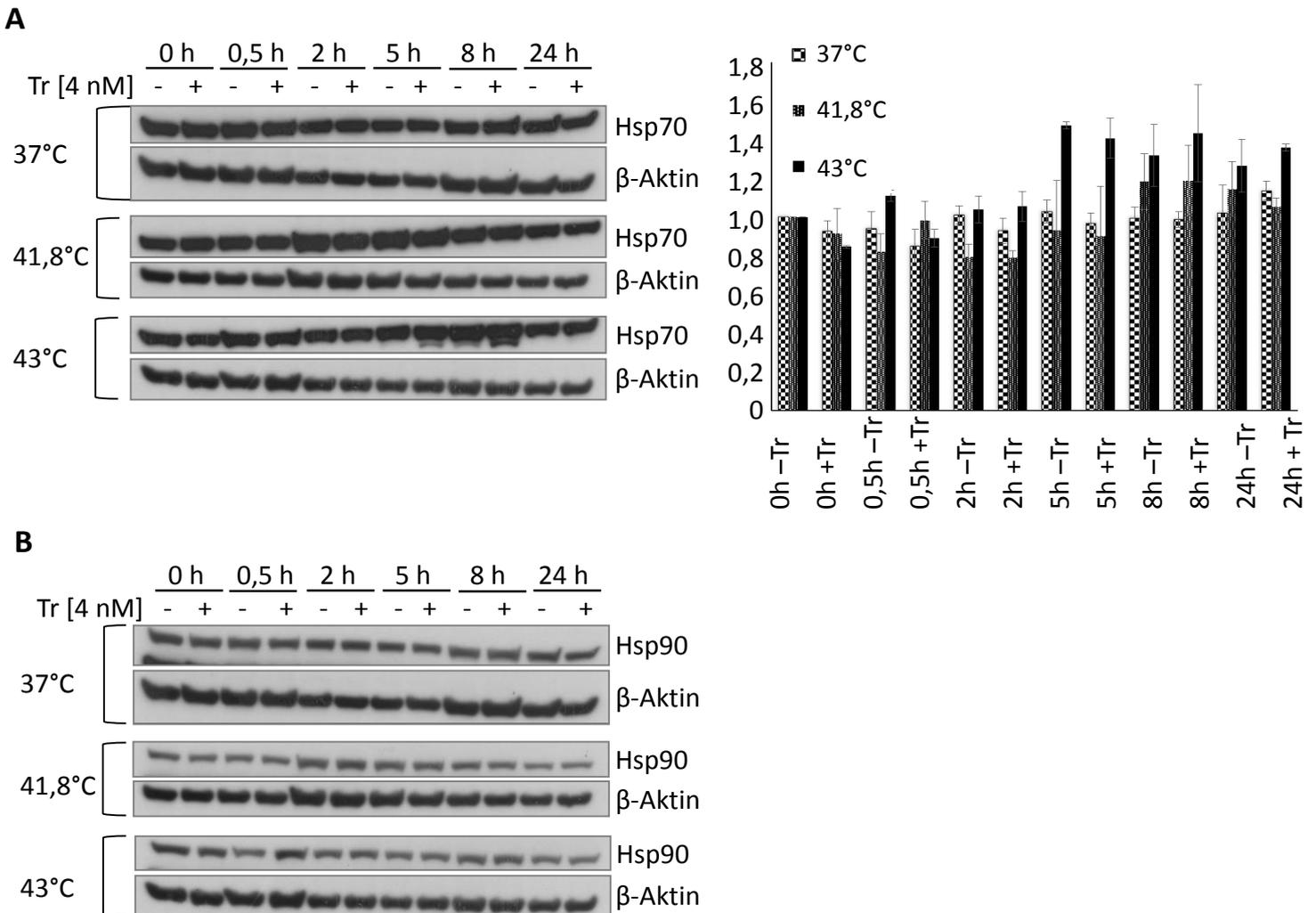


Abb. 3.19 Western Blot Analyse der Hsp70 und Hsp90 Expression bei U2Os Zellen Die Zellen wurden mit Tr (4 nM) behandelt und einem HS (41,8°C oder 43°C) unterzogen. Die Proteine wurden nach einer Erholungszeit von 0, 0,5, 2, 5, 8, und 24 h isoliert, über SDS-PAGE (10 %-iges Gel) aufgetrennt und die Expression von Hsp70 und Hsp90 im Western Bot analysiert. Aufgetragen wurden jeweils 20 µg des Proteinlysates. Als Haushaltsgen diente β-Aktin. (A) Exemplarische Western Blots der Hsp70 Expression und Balkendiagramme der Mittelwerte und SEM aus der semiquantitativen densitometrischen Auswertung mittels ImageJ aus drei unabhängigen Experimenten. (B) Exemplarische Western Blots der Hsp90 Expression aus drei unabhängigen Experimenten

3.7 Identifizierung prädiktiver Marker und Kombinationspartner mittels Hochdurchsatzanalysen

In den nachfolgenden Analysen wurde der Frage nachgegangen, ob weitere Proteine identifiziert werden können, deren Inhibition die Zytotoxizität von Tr und einem HS zusätzlich verstärken könnte. Zudem wurde untersucht, ob die Expression bestimmter Proteine als prädiktiver Marker für ein Ansprechen auf die Kombinationstherapie von Tr und HS fungieren könnte. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden Hochdurchsatzanalysen mittels Transfektion mit einer siRNA-*Library* etabliert.

An SW872 Zellen wurde die Relevanz von 139 Genprodukten untersucht, die in unterschiedliche DNA-Reparaturwege und in die Regulation der Proliferation involviert sind.

3.7.1 Ermittlung der optimalen Behandlungskonzentration

Zu Beginn der Versuchsreihe wurden Optimierungsexperimente durchgeführt, um optimale Behandlungsbedingungen für die Analyse der Proliferationsfähigkeit behandelter Zellen mittels SYBR-Green Assay zu ermitteln. SW872 Zellen wurden hierfür mit Tr (2 – 40 nM, 3 h) behandelt und einem einstündigen HS bei 41,8°C und 43°C im Wasserbad unterzogen. Abb. 3.20 zeigt die graphische Darstellung der Proliferation der Zellen nach den entsprechenden Behandlungen anhand der Rohdaten (linke Seite) und der hitzekorrigierten Werte (rechte Seite). Die Proliferation der Zellen wurde nach einem alleinigen HS bei 41,8°C auf 79 % reduziert und bei 43°C sogar halbiert. Bei physiologischen Temperaturen (37°C) konnte erst ab einer Konzentration von 20 nM eine Zytotoxizität von Tr, im Sinne einer detektierbaren Proliferationshemmung, beobachtet werden. Durch einen zusätzlichen HS setzte bereits ab 2 nM Tr eine leichte Chemosensitivierung ein. Für die siRNA-*Library* Hochdurchsatzanalysen wurde eine Behandlungskonzentration von 10 nM gewählt, da

die nur leichte behandlungsinduzierte Reduktion der Proliferation bei dieser Konzentration (96 % bei 37°C und 76 – 74 % nach zusätzlichem HS; hitzekorrigierte Werte) die Identifizierung möglicher KD-induzierter Effekte bei späteren Experimenten ermöglichen sollte.

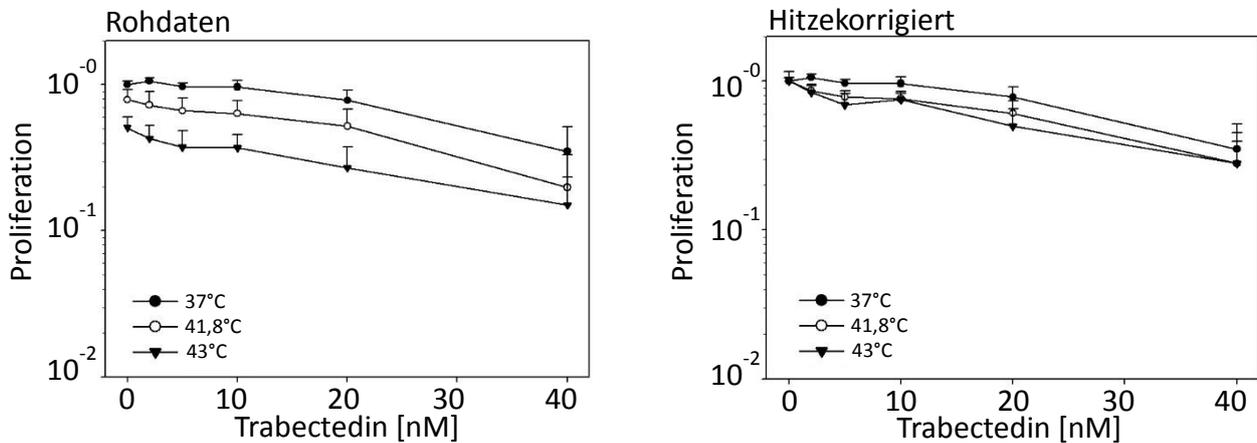


Abb. 3.20 Ermittlung der optimalen Behandlungskonzentration im Proliferationsassay bei SW872 Zellen Die Zellen wurden in Triplikaten in 96-well-Platten ausgesät und am Folgetag mit Tr (2 – 40 nM, 3 h) und einem HS im Wasserbad (41,8°C und 43°C, 1 h) behandelt. Die Proliferation wurde mittels SYBR-Green Bindung an die DNA analysiert. Graphische Darstellung der Mittelwerte und SEM aus sieben unabhängigen Experimenten.

Nach den anschließenden Transfektionsexperimenten wurde die Proliferation der AS-transfizierten Kontrollzellen überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass die Sensitivität transfizierter Zellen gegenüber der Behandlung von der Sensitivität, die in den Optimierungsexperimenten ermittelt wurde (Abb. 3.20), abwich. Die Balkendiagramme sowie die Datentabellen aus Abb. 3.21 zeigen die Proliferationshemmung nach den entsprechenden Behandlungen. Die geringeren Toxizitäten scheinen erneut in der Behandlung mit Transfektionsreagenz und siRNA begründet zu liegen.

Ergebnisse

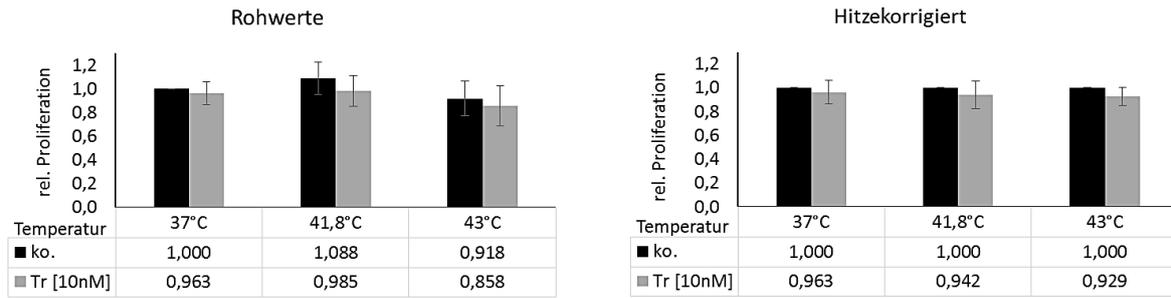


Abb. 3.21 Proliferationshemmung von SW872 Zellen nach einer Transfektion mit der AS Negativkontrolle und einer kombinierten Tr- und HS- Behandlung Die Zellen wurden in Quadruplikaten in 96-well Platten ausgesät und am Folgetag mit der AS Negativkontrolle transfiziert. Nach 48 h folgte eine Tr-Behandlung (10 nM) und einem HS im Wasserbad (41,8°C und 43°C, 1 h). Die Proliferation der Zellen wurde mittels SYBR-Green Bindung an die DNA analysiert. Graphische Darstellung der Mittelwerte und SEM aus sechs unabhängigen Experimenten.

3.7.2 Hochdurchsatzanalysen mittels Transfektion einer siRNA-Library

Die Genprodukte, gegen deren Expression sich die verwendete siRNA-Library richtete, sind in Tab. 3.3 aufgelistet.

Tab. 3.3 Auflistung der 139 Genprodukte bei denen ein siRNA-vermittelter KD durchgeführt wurde

ABCF2	DNMT3B	HDAC1	PARP3	RAD51AP1	TP53
APEX1	E2F5	HDAC10	PARP4	RAD51C	TP53BP1
ATM	ENDOG	HDAC11	PCNA	RAD51L1	TREX1
ATR	ERCC1	HDAC2	POLA	RAD51L3	TREX2
BLM	ERCC2	HDAC4	POLB	RAD52	UBE2A
BRCA1	ERCC3	HDAC6	POLD1	RAD54L	UBE2B
BRCA2	ERCC4	Hsp90 (TRA1 9)	POLE	RAD9A	UBE2N
BRIP1	ERCC5	HSPD1	POLG	RECQL	UBE2S
CCNH	ERCC6	HUS1	POLH	RPA1	UBE2V1
CDC2	ERCC8	LIG1	POLI	RPA2	UBE2V2
CDK2	EXO1	LIG4	POLK	RPA3	WRN
CDK7	FANCA	MBD1	POLL	RPA4	XPA
CDKN3	FANCB	MGMT	POLM	SET7	XPC
CHEK1	FANCC	MMP9	POLN	SET8	XRCC1
CHEK2	FANCD2	MMS19L	POLQ	SHFM1	XRCC2
CXCL6	FANCE	MRE11A	PRKDC	SMC1L1	XRCC3
DCLRE1A	FANCF	MSH2	RAD1	SSBP1	XRCC4
DCLRE1B	FANCG	MUTYH	RAD17	TERT	XRCC5
DCLRE1C	FANCL	NBN	RAD18	TK1	XRCC6
DDB1	FANCM	NHEJ 1	RAD21	TOP1	
DDB2	FEN1	OGG1	RAD23A	TOP1MT	
DNASE2	GMNN	OGT	RAD23B	TOP2A	
DNMT1	H2AFX	PARP1	RAD50	TOP2B	
DNMT3A	H2AFZ	PARP2	RAD51	TOP3A	

Für die Experimente wurden die Zellen ausgesät und am Folgetag mit den entsprechenden siRNAs transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen behandelt (10 nM Tr, 3 h und HS bei 41,8°C oder 43°C, 1 h im Wasserbad) und nach einer weiteren Wachstumsphase von 4 Tagen wurde die Proliferationshemmung bzw. Wachstumsinhibition ermittelt. Anschließend wurde die Wachstumsinhibitionsratio als das reduzierte Wachstum nach einem KD unter Versuchsbedingungen im Vergleich zum Wachstum der unbehandelten transfizierten Kontrolle berechnet.

Die Wachstumsinhibitionsratios, die aus den KDs und der jeweiligen Behandlungen mit Tr und/oder einem HS resultierten, wurden in drei unterschiedliche Stärkegrade kategorisiert (leichte, mittelstarke und starke Wachstumsinhibitionsratio; Abb. 3.22). Abgebildet sind in Abb. 3.22 A die Farbkodierungen dieser Kategorien in Form einer Heatmap, die aus den jeweiligen Wachstumsinhibitionsratios hervorgegangen ist. Die Heatmap zeigt demnach an, nach welchem KD eines Genproduktes die Behandlung mit Tr bzw. Tr und einem HS einen zusätzlichen proliferationshemmenden Effekt bei den SW872 Zellen erzielt hatte.

Es wurden zahlreiche Genprodukte identifiziert, nach deren KD eine starke Proliferationshemmung durch die Behandlungen detektierbar war (Farbkodierung gelb, orange oder rot je nach Stärkegradkategorie). Meist resultierte eine kombinierte Behandlung mit Tr und einem HS im Vergleich zu einer alleinigen Tr Behandlung bzw. einem alleinigen HS in einer stärkeren Proliferationshemmung. Aus der Heatmap ist zudem ersichtlich, dass eine Behandlung mit Tr und einem HS nach einem KD diverser Genprodukte keine Proliferationshemmung bei den Zellen zur Folge hatte (Farbkodierung weiß).

Abb. 3.22 B fasst die Anzahl der relevanten Genprodukte, nach deren KD relevante Proliferationshemmungen zu detektieren waren, gemäß der jeweiligen Behandlungsbedingungen (Tr und/oder HS) in Balkendiagrammen zusammen. Nach einer alleinigen Tr-Behandlung zeigte sich nach einem KD von 15 Genprodukten eine leichte und von weiteren 10 Genprodukten sogar eine mittelstarke Wachstumsinhibitionsratio.

Der KD von jeweils 19 Genprodukten resultierte nach einem HS bei 41,8°C in einer leichten und mittelstarken Wachstumsinhibitionsratio, was nach einem HS bei 43°C weiter zugenommen hat (19 leicht, 35 mittelstark). Bei jeweils einem KD von 2 Genprodukten zeigte sich sogar eine starke Wachstumsinhibitionsratio. Die Anzahl der

involvierten Genprodukte erhöhte sich weiterhin nach einer Kombinationsbehandlung. Nach einem zusätzlichen HS bei 41,8°C belief sie sich auf 20 (leicht) bzw. 21 (mittelstark). Besonders auffällig ist hier die Anzahl der Genprodukte, deren Fehlen in einer Proliferationshemmung nach Tr und einem HS bei 43°C resultierte (23 leicht, 45 mittelstark, 12 stark).

Zu jeder Behandlungsbedingung wurde ebenfalls eine Auflistung von jeweils sechs Genprodukten hinzugefügt, deren KD zusätzlich zu den Behandlungen mit auffälligen Effekten einherging (Abb. 3.22 B).

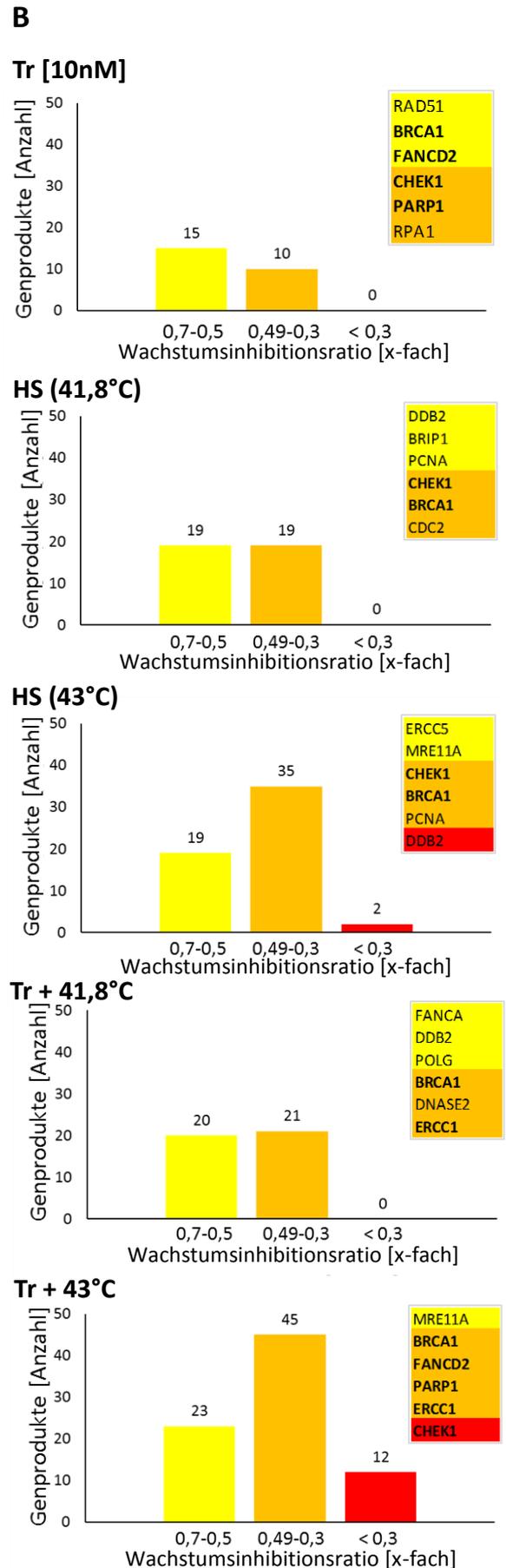
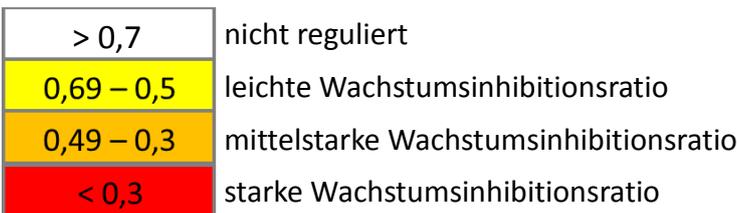


Abb. 3.22 Analyse der Wachstumsinhibitionratios nach Transfektion mit einer siRNA-Library und einer Tr- und HS-Behandlung bei SW872 Zellen (A) Darstellung der Wachstumsinhibitionratios nach dem KD und den jeweiligen Behandlungen als Heatmap in unterschiedlichen Farbkodierungen. Legende unterhalb. (B) Darstellung der Anzahl von Genprodukten in Balkendiagrammen, die für die Proliferationshemmung relevant waren. Zusätzliche Auflistung von Genprodukten, deren KD mit auffälligen Effekten nach den Behandlungen einherging. Durchgeführt wurden zwei unabhängige Experimente.

3.7.3 Validierung der Ergebnisse der Hochdurchsatzanalysen

Im Anschluss an die siRNA-Library-Hochdurchsatzanalysen galt es, sowohl die Aussagekraft, als auch die Zuverlässigkeit dieser Methode zu überprüfen. Hierfür wurde die beobachtete Proliferationshemmung nach einem KD als ein Surrogatmarker für die behandlungsbedingte (Tr und/oder HS) Zytotoxizität durch den wiederholten KD von fünf aus der siRNA-Library ausgewählten Genprodukte im klonogenen Assay validiert. Dazu zählten BRCA1, FANCD2, PARP1, ERCC1 und CHEK1. Der KD dieser Genprodukte führte in den Hochdurchsatzanalysen bei jeder Behandlungsbedingung zu auffälligen Effekten bezüglich der Wachstumsinhibitionsratios und sie wurden bereits teilweise oder komplett neben den Balkendiagrammen in Abbildung 3.22 B mit aufgelistet. Es wurde angenommen, dass die Expression dieser Proteine mit einer Vorhersagbarkeit des Effektes einer Kombinationsbehandlung von Tr und einem HS korrelieren und somit die Expressionsstärke gewisse Aufschlüsse über die Effektivität der Kombinationsbehandlung geben könnte, oder wie bei ERCC1 als Resistenzmarker für die Behandlung dienen könnte. Eine gezielte Inhibition eines dieser Proteine könnte sogar in einer Wirkungssteigerung der Kombinationsbehandlung resultieren.

Um dies zu untersuchen, wurde die Proteinexpression von BRCA1, FANCD2, PARP1, ERCC1 und CHEK1 bei U2Os Zellen mittels siRNA-Transfektion unterdrückt und das klonogene Überleben nach einer kombinierten Tr (2 – 4 nM, 3 h)- und HS-Behandlung (41,8°C oder 43°C, 90 min) analysiert.

Die Balkendiagramme aus Abb. 3.23 zeigen die Reduktion des klonogenen Überlebens transfizierter Zellen mit der AS-Negativkontrolle, oder mit siRNAs gegen BRCA1, FANCD2, PARP1, ERCC1 oder CHEK1 nach den jeweiligen Behandlungen. Für jedes Experiment wurde die Effektivität des KDs im Western Blot überprüft und densitometrisch ausgewertet.

Mit der AS-Negativkontrolle transfizierte Zellen, erfuhren durch eine alleinige Tr-Behandlung eine dosisabhängige Reduktion des klonogenen Überlebens auf 88 % (2 nM) bzw. 74 % (4 nM). Ein HS resultierte in einem Restüberleben von 84 % (41,8°C) bzw. 14 % (43°C). Die Zytotoxizität von Tr wurde durch einen zusätzlichen HS deutlich verstärkt (Abb 3.23 A).

Im Vergleich zeigte sich bei einem KD von BRCA1 (Restexpression des Proteins nach 48 h: 53 % und nach 72 h: 66 %) eine verstärkte Empfindlichkeit gegenüber Tr (2 nM: 77 %; 4 nM: 62 % Restüberleben), sowie eine erhöhte Sensitivität gegenüber einem HS bei 43°C (8 %) und auch eine stärkere Empfindlichkeit gegenüber der Kombinationsbehandlung mit knapp 4 % Restüberleben (4 nM, 43°C) (Abb 3.23 B).

Ein KD von FANCD2 resultierte zwar in einer erhöhten Sensitivität gegenüber Tr im Vergleich zur AS-Kontrolle (2 nM: 71 %; 4 nM: 60 % Restüberleben), ein verstärkter Effekt durch die Kombinationsbehandlung blieb allerdings aus (Abb 3.23 C). Die WBs, die die Restexpression von FANCD2 visualisieren sollten, legten jedoch eine eher geringere Effektivität des KD nahe.

Der KD von PARP1 (Restexpression 48 h: 70 %; 72 h: 66 %) resultierte in einer Verstärkung der Sensitivität gegenüber Tr (2 nM: 80 %; 4 nM: 60 % Restüberleben) und wies nach der Kombinationsbehandlung eine deutliche Wirkungssteigerung (49 % bei 41,8°C, 9 % bei 43°C (4 nM)) bei sonst gleich bleibender Hitzeempfindlichkeit auf (Abb 3.23 D).

Erwartungsgemäß trat bei den Zellen mit einem KD von ERCC1 (Restexpression nach 48 h: 36 % und nach 72 h: 39 %) eine Resistenz gegenüber Tr auf (2 nM: 100 %; 4 nM: 97 % Restüberleben), welche auch durch einen zusätzlichen HS nicht behoben wurde (Abb 3.23 E).

Der KD von CHEK1 (Restexpression nach 48 h: 21 % und nach 72 h: 14 %) resultierte neben einer leichten Wirkungssteigerung von Tr (2 nM: 85 %; 4 nM: 63 % Restüberleben) in einer starken Sensitivität gegenüber einem HS. Nach einem HS bei 41,8°C wurde ein Restüberleben der Zellen von 71 % ermittelt und nach 43°C von nur noch 4 % (Abb 3.23 F). Die Kombinationsbehandlung resultierte bei beiden Temperaturen in einer überaus starken Reduktion des klonogenen Überlebens (4 nM bei 41,8°C: 39 %, bei 43°C: 2 %).

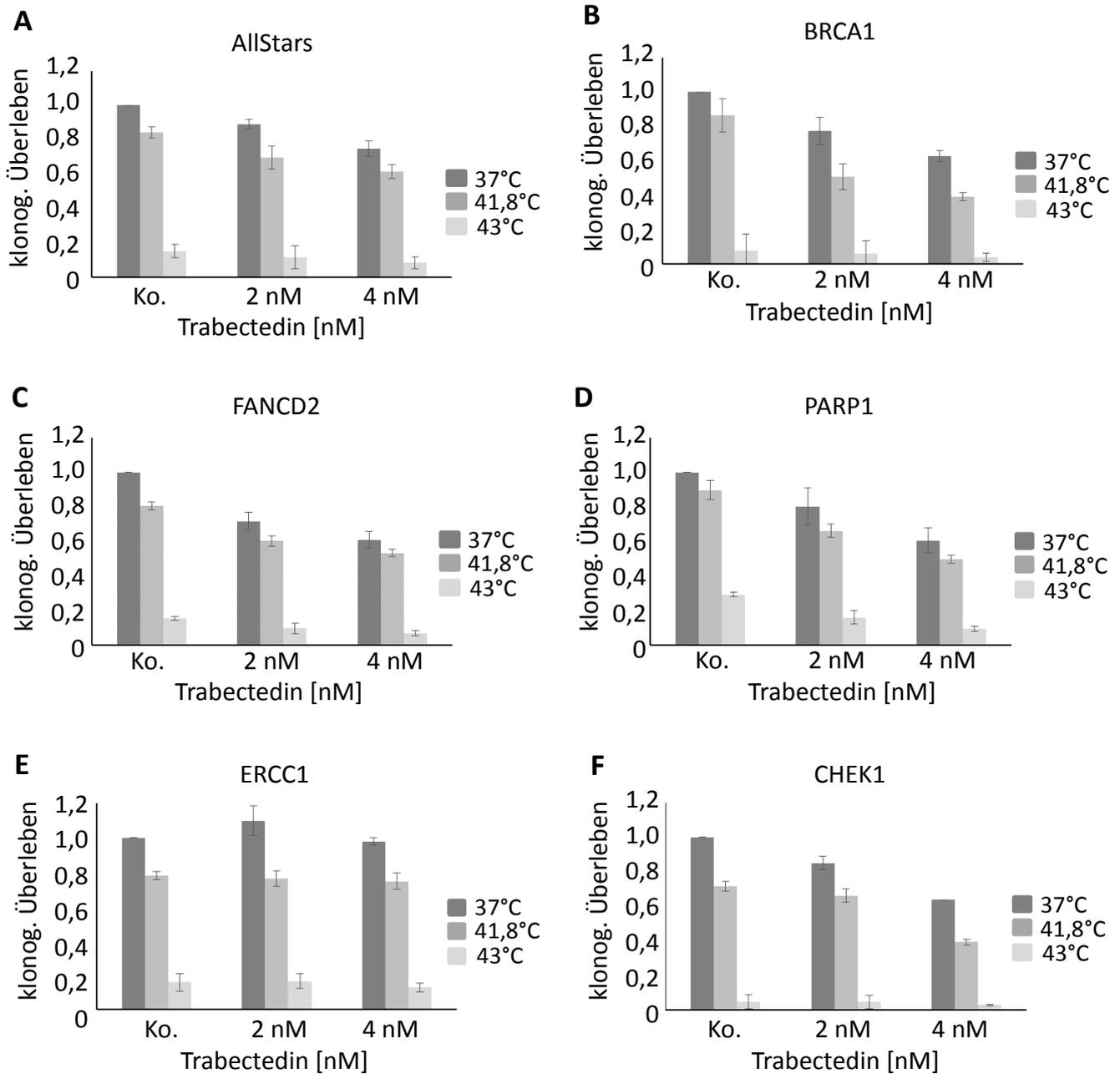


Abb. 3.23 Das klonogene Überleben von U2Os Zellen nach einem BRCA1-, FANCD2-, PARP1-, ERCC1- oder CHEK1-KD im klonogenen Assay Die Zellen wurden mit den entsprechenden siRNAs transfiziert und nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C für den klonogenen Assay ausgesät. Als Negativkontrolle diente die Transfektion mit der AS siRNA. Am Folgetag wurden die Zellen mit Tr (2 – 4 nM, 3 h) und einem HS (41,8°C oder 43°C, 90 min) behandelt und das klonogene Überleben ermittelt. Dargestellt sind die Balkendiagramme der Mittelwerte und SEM aus den Rohwerten des klonogenen Überlebens aus drei unabhängigen Experimenten. Normiert wurde auf die unbehandelte Kontrolle des jeweiligen KDs.

Die Ergebnisse der klonogenen Assays wurden mit den Vorhersagen aus den Hochdurchsatzanalysen mittels der etablierten siRNA-Library verglichen. Die Übereinstimmungen wurden in Tabelle 3.4 zusammengefasst. Die ermittelte Proliferationshemmung aus den Hochdurchsatzanalysen wurde durch „+“-Zeichen dargestellt, deren Anzahl der Regulationsstärke entspricht (+ leicht, ++ mittelstark, +++ stark). Ob die Vorhersagen bezüglich einer Erhöhung der Sensitivität gegenüber Tr, einem HS oder einer Kombination im klonogenen Assay bestätigt werden konnten, wurde mit einem „✓“ für positiv oder einem „✗“ für negativ gekennzeichnet.

Tab 3.4 Übereinstimmung der Vorhersagen aus siRNA-Library mit klonogenen Assays

Vorhersage Library	Sensitivität gegenüber Tr	Validierung Klonogener Assay	Sensitivität gegenüber HS	Validierung Klonogener Assay	Sensitivität gegenüber Tr + HS	Validierung Klonogener Assay
BRCA1 – KD	++	✓	++	✓	++	✓
FANCD2 – KD	++	✓		✓	++	✗
PARP1 – KD	+	✓		✓	++	✓
ERCC1 – KD		✓		✓	++	✗
CHEK1 – KD	+	✓	++	✓	+++	✓

Aus Tab. 3.4 ist ersichtlich, dass alle Vorhersagen aus den Hochdurchsatzanalysen bezüglich der Einzelbehandlungen mit Tr oder einem HS durch die klonogenen Assays bestätigt wurden. Bis auf die vorhergesagte Verstärkung der Zytotoxizität einer Kombinationsbehandlung nach einem FANCD2- und ERCC1-KD konnten ebenfalls die Effekte der Kombinationsbehandlung bestätigt werden.

3.7.4 Bewertung der Relevanz weiterer Proteine durch Streudiagramme

Eine ausgedehntere Auswertung der aus den Hochdurchsatzanalysen gewonnen Daten ermöglichte es ebenfalls, weitere Proteine zu identifizieren, die in die thermale Verstärkung der Tr-Toxizität involviert sein könnten. Hierfür wurden Streudiagramme erstellt, bei denen die Wachstumsinhibitionratio für jeden einzelnen KD in Bezug auf zwei unterschiedliche Behandlungsbedingungen aufgetragen wurde. Abbildung 3.24 zeigt die Streudiagramme der Wachstumsinhibitionsratio nach einer alleinigen Tr-

Behandlung (10 nM) aufgetragen gegen eine Kombination aus Tr und einem HS bei 41,8°C (A) oder 43°C (B). Durch diese Auswertungsmethode haben sich drei unterschiedliche Gruppen von Genprodukten herauskristallisieren lassen, bei denen die Behandlung mit einer relevanten Proliferationshemmung einherging.

In der ersten Gruppe waren Genprodukte vorzufinden, deren KD in keiner Verstärkung der Tr-induzierten Proliferationshemmung (Wachstumsinhibitionsratio $> 0,7$) resultierte. Nach einem zusätzlichen HS aber wiesen die Zellen eine deutlich reduzierte Fähigkeit zur Proliferation auf (orange Punkte; Wachstumsinhibitionsratio $< 0,7$). Die Genprodukte dieser Gruppe, sind in sämtliche DNA Reparaturwege und Proliferationsprozesse involviert. Es fiel aber auf, dass in etwa ein Drittel dieser Genprodukte NER-spezifisch sind.

In der zweiten Gruppe die sich abgehoben hatte, befinden sich Genprodukte, bei denen der KD zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Tr geführt hat, die durch einen HS weiter verstärkt wurde (rote Punkte). Die hier beteiligten Genprodukte waren Bestandteil aller vorkommender DNA Reparaturmechanismen, ohne eine mehrheitliche Beteiligung an einer bestimmten Kaskade.

In der letzten identifizierten Gruppe waren Genprodukte vorzufinden, deren KD zu einer Verstärkung der Proliferationshemmung durch Tr (Wachstumsinhibitionsratio $< 0,7$) führte. Die Kombination von Tr und einem HS führte hingegen zu keiner weiteren Wirkungssteigerung (gleichbleibender Stärkegrad der Wachstumsinhibitionsratio; grüne Punkte).

Daneben zeigte sich ein Anteil an Genprodukten mit nicht relevanten – also überhaupt nicht oder gegensinnig (Tr-vermittelter Effekt wurde durch einen HS aufgehoben) regulierenden – Genprodukten (graue bzw. gelbe Punkte).

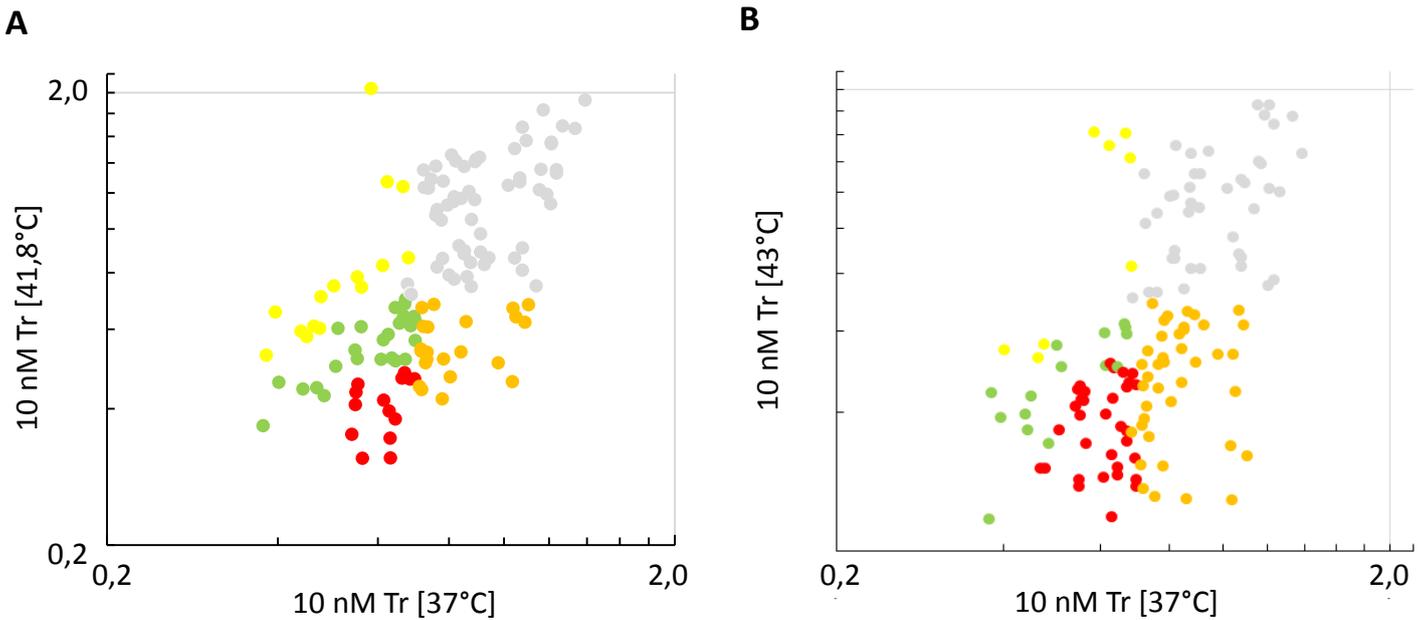


Abb. 3.24 Streudiagramme der Wachstumsinhibitionsratios nach Tr und einem HS bei 41,8°C und 43°C bei SW872 Zellen Die aus Hochdurchsatzanalysen ermittelten Wachstumsinhibitionsratios nach einem KD und einer Tr-Behandlung (10 nM; x-Achse) wurde gegen die Wachstumsinhibitionratios nach einem KD und einer Kombination aus Tr (10 nM) und einem HS (y-Achse) bei 41,8°C (A) oder 43°C (B) aufgetragen. ● keine Proliferationshemmung nach Tr allein, nach einem zusätzlichen HS schon; ● Proliferationshemmung nach Tr mit einer zusätzlichen Wirkungssteigerung durch HS; ● Proliferationshemmung nach Tr ohne Wirkungssteigerung durch HS. ●/● keine oder gegensinnige Effekte (keine Relevanz). Streudiagramme der Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die detaillierte Analyse der dritten Gruppe an Genprodukten (grüne Punkte) ergab, dass bei 41,8°C 45,0 % und bei 43°C 33,3 % der involvierten Proteine spezifisch der HR zuzuordnen sind (Abb. 3.25).

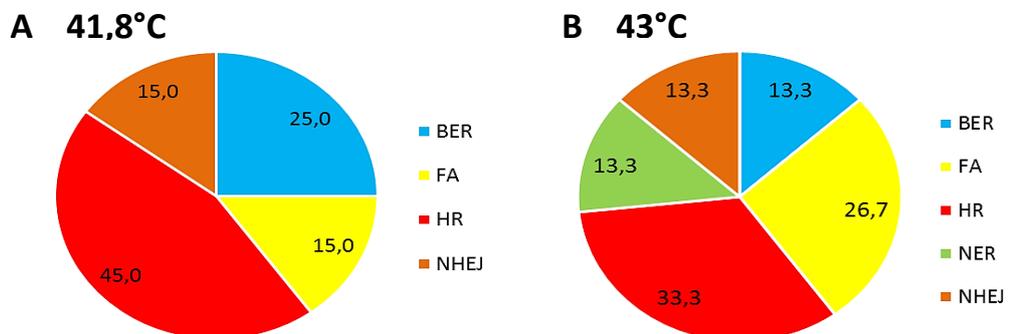


Abb. 3.25 Verteilung der Genprodukte, deren KD in einer von einem HS unbeeinflussten Tr-Toxizität resultiert Die Genprodukte der dritten Gruppe (grüne Punkte) aus Abb. 3.24 wurden ihren spezifischen DNA-Reparaturmechanismen zugeordnet. Kreisdiagramme zeigen die prozentuale Verteilung. Die Legenden mit Farbkodierung befinden sich neben den zugehörigen Kreisdiagrammen.

4 Diskussion

Weichgewebesarkome (STS, engl. *soft tissue sarcoma*) sind neoplastische Tumorerkrankungen mesenchymalen Ursprungs mit einer zum Teil hohen Metastasierungsrate und einem überaus aggressiven Potenzial (Cormier & Pollock 2004; Grosso et al. 2009). Das Medikament Trabectedin (Tr) stellt eine zugelassene zytostatische Behandlungsoption derzeit für die Zweitlinientherapie dar oder zur Therapie von Patienten, bei denen eine Erstlinientherapie aus Doxorubicin und Ifosfamid nicht angewendet werden kann (Samuels et al. 2013). Eine der zytostatischen Hauptaktivitäten von Tr liegt in der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) während der S-Phase des Zellzyklus begründet (Simoens et al. 2003; Allavena et al. 2005; D'Incalci & Galmarini 2010).

Der ergänzende Behandlungsansatz der Hyperthermie führt auf zellulärer Ebene zu einer mehrstündigen Beeinträchtigung der Homologen Rekombinationsreparatur (HR), dem wichtigsten Reparaturmechanismus für DSBs während und nach der S-Phase des Zellzyklus. Dies erfolgt aufgrund einer hitzebedingten Degradierung des in die HR involvierten Proteins BRCA2 (Krawczyk et al. 2011).

Aufgrund dieser sich theoretisch ergänzenden Eigenschaften von Tr und Hyperthermie wurden in der vorliegenden Arbeit *in vitro* die Effekte einer Kombinationsbehandlung untersucht.

4.1 Bestätigung des Wirkprinzips einer kombinierten Trabectedin- und Hitzeschockbehandlung

Zur Bestätigung der Hypothese, dass ein Hitzeschock (HS) die zytotoxischen Effekte von Tr verstärkt, wurde das klonogene Überleben unterschiedlicher Sarkomzelllinien (U2Os Osteosarkom, SW872 Liposarkom, SW982 Synovialsarkom, RD-ES Ewing-Sarkom und SKUT-1 uterines Leiomyosarkom) nach einer Kombinationsbehandlung mit Tr (1 – 4 nM, 180 min) und einem HS (41,8°C und 43°C, 90 min) analysiert. Das wirkungsvollste zeitliche Behandlungsregime wurde im Vorfeld an U2Os Zellen ermittelt (Abb. 3.2). Die Resultate früherer Experimente zeigen (Kampmann et al. 2012), dass sich die Sensitivität gegenüber Tr bei den Zelllinien SKUT-1, SW872 und SW982 in einem Rahmen von Behandlungskonzentrationen bewegt, die bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurden. Die ermittelten IC₅₀-Werte unterschiedlicher Zelllinien nach einer 72-stündigen Tr-Inkubation betragen hierbei 0,2 – 300 pM (Li et al. 2001).

Zur Behandlung von Patienten wird Tr als eine 24-stündige intravenöse Infusion in einer Konzentration von 1,5 mg pro m² Körperoberfläche verabreicht (Taamma et al. 2001). Bei dieser Dosierung, die beim Auftreten von Nebenwirkungen wie beispielsweise dem Anstieg von Leberenzymen oder einer relevanten Neutropenie (Kasper 2013) auf 1,2 – 1,0 mg/m² reduziert wird (Gounaris et al. 2014), wird eine durchschnittliche maximale Plasmakonzentration von 2,3 nM Tr erreicht (Simoens et al. 2003). Die in Titrationsexperimenten ermittelten Behandlungskonzentrationen für den klonogenen Assay (nicht gezeigt) befanden sich demnach in einem Konzentrationsrahmen von klinischer Relevanz, bei jedoch kürzerer *in vitro* Exposition von 3 h.

Der experimentell nachgewiesene optimale zeitliche Behandlungsablauf umfasste eine simultane Applikation beider Behandlungsoptionen (Abb. 3.1 C). Hierbei wurden die Zellen in der zweiten Hälfte der Tr-Inkubation einem HS unterzogen. Dieses Behandlungsschema wurde ebenfalls an SW872 und SW982 Zellen validiert (Abb. 3.3 A und B). Die zeitliche Abfolge der Behandlung ähnelt zudem therapeutischen Ansätzen in der klinischen Routine, da ein bereits etabliertes klinisches Behandlungsprotokoll eine Hyperthermiebehandlung in den letzten Stunden der 24-stündigen Tr-Infusion vorsieht (Kampmann et al. 2013).

Die Analysen des klonogenen Überlebens demonstrierten bei drei von fünf untersuchten Zelllinien (U2Os, SW872 und SW982) ein Divergieren der hitzekorrigierten Kurven, was hier als thermale Chemosensitivierung gegenüber Tr durch einen HS definiert wurde. Dieser Effekt erwies sich insbesondere bei 43°C als stark ausgeprägt (Abb. 3.2 und 3.3 A und B). Die Anfangshypothese, dass ein HS die zytotoxische Aktivität von Tr verstärkt, zeigt sich bei diesen drei Zelllinien bestätigt. Obwohl die Effektivität von Tr bei uterinen Leiomyosarkomen *in vivo* mehrfach beschrieben wurde (Tewari et al. 2006; Amant et al. 2009), konnte bei SKUT-1 Zellen trotz einer dosisabhängigen Reduktion des klonogenen Überlebens durch Tr kein verstärkender Effekt durch einen HS festgestellt werden (Abb. 3.3 C und D). Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür ist in den Ergebnissen der Western Blot Analysen einer hitzevermittelten BRCA2-Degradierung bei den in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien zu finden (Abb. 3.10). Während bei U2Os, SW872 und SW982 Zellen eine ausgeprägte temperaturabhängige Reduktion der BRCA2-Expression nach einem HS stattgefunden hat, fiel diese bei SKUT-1 und auch bei RD-ES Zellen weitaus geringer

aus. Sollte die hitzebedingte Degradierung von BRCA2 maßgeblich in die Verstärkung der Tr-induzierten Zytotoxizität involviert sein, würden unterschiedliche Stärkegrade dieser Degradierung bei verschiedenen Zelllinien einen indirekten Marker für das Auftreten und das Ausmaß einer thermalen Chemosensitivierung gegenüber Tr darstellen. Dementsprechend könnte die thermale Degradierung von BRCA2 ebenso ein wichtiger prädiktiver Marker für das Ansprechen auf eine Tr-Therapie bei Patienten sein.

Hier ist festzuhalten, dass ein alleiniger HS vor allem bei 43°C ebenfalls in einer deutlichen Reduktion der Koloniebildungsfähigkeit resultierte. Dies erfolgte sowohl bei besonders Tr-sensitiven Zellen, als auch bei den Zellen, deren klonogenes Überleben durch Tr weniger stark reduziert wurde. Die nicht hitzekorrigierten Daten aus den klonogenen Assays zeigen klar, dass eine zeitgleiche Applikation beider Behandlungsstrategien bei allen untersuchten Zellen eine stärkere Reduktion des klonogenen Überlebens hervorruft, als eine alleinige Behandlung mit Tr oder einem HS, was eine Kombination als überaus sinnvoll erscheinen lässt, auch wenn sich keine eindeutige thermale Chemosensitivierung nachweisen lässt.

In früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass ein HS die Wirkung einiger chemotherapeutischer Agenzien steigert. Dies erfolgt sowohl durch die thermale Wirkungssteigerung des Medikamentes selbst (auch bei nicht-toxischen Konzentrationen), als auch durch direkte hitzetoxische Effekte (Issels 2008). Die ebenso *in vivo* zu einer Steigerung der Therapie führenden Effekte der Hyperthermie auf den Blutfluss und die zelluläre Aufnahme des Medikamentes wurden in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

4.2 Die mRNA Expression von XPG, BRCA1 und ERCC1 ermöglicht keine Korrelation mit der Toxizität von Trabectedin *in vitro*

Die Relevanz spezifischer DNA-Reparaturproteine für den Wirkmechanismus von Tr wurde *in vitro* (Herrero et al. 2006; Guirouilh-Barbat et al. 2008) und *in vivo* (Schöffski et al. 2011; Italiano et al. 2011) demonstriert. In der retrospektiven Auswertung von Schöffski *et al.* (2011) wurden die mRNA-Expressionsstärken von XPG, ERCC1 und BRCA1 in Tumorproben von Tr-behandelten STS-Patienten untersucht und mit dem Therapieansprechen korreliert. Dabei zeigte sich ein tendenziell besserer klinischer Verlauf in Bezug auf das progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben bei einer

hohen Expression NER-spezifischer Gene (*XPG* und *ERCC1*) sowie bei einer niedrigen Expression des HR-spezifischen Gens *BRCA1*.

Zur Validierung dieses Ansatzes in der *in vitro* Situation sowie zur Aufklärung der teilweise unterschiedlichen Sensitivitäten der in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien (klonogenes Überleben nach Tr bei stärker sensitiven Zellen: 62 % bei U2Os (2 nM), 44% bei SW982 (4 nM); bei weniger sensitiven Zellen: 93 % bei SW872, 75 % bei SKUT-1, 70 % bei RD-ES (alle 4 nM)) wurde die mRNA-Expressionsstärke von *XPG*, *BRCA1* und *ERCC1* bei den verwendeten Zelllinien mittels qRT-PCR analysiert.

Die gewonnenen Daten zeigten nur marginale Unterschiede in der Expressionsstärke der jeweiligen mRNAs zwischen den Zelllinien. Hinzu kommt, dass sich beinahe alle Werte in einem Bereich befanden (Tab. 3.1), der innerhalb des methodischen Hintergrundrauschens der qRT-PCR gewertet werden kann (0,5 – 2). Dennoch ließen sich bei SKUT-1 und SW872 Zellen Expressionsmuster erkennen, die mit der beobachteten Tr-Sensitivität einen Trend der Korrelation aufweisen. Die Expressionsmuster von RD-ES, SW982 und U2Os Zellen ließen keine Korrelation mit einem Ansprechen auf die Tr-Behandlung erkennen (Abb 3.4).

4.3 Zellzyklusarrest und Zellüberleben nach Trabectedin und einem Hitzeschock

Der Nachweis einer Verstärkung der Tr-induzierten Zytotoxizität durch einen HS im klonogenen Assay (bei U2Os, SW872 und SW982 Zellen) zog die Frage nach den zugrunde liegenden molekularen Mechanismen nach sich. Um dem weiter nachzugehen, wurde 24 h nach der Behandlung die DNA-Verteilung im Zellzyklushistogramm von U2Os und SW872 Zellen analysiert. Der bereits beschriebene Tr-induzierte G2/M-Block (Erba et al. 2001; Herrero et al. 2006) wurde durch einen HS bei beiden Temperaturen (41,8°C und 43°C) verstärkt. Die Verteilung der DNA bei den Zellen, die einer alleinigen Tr-Behandlung (10 nM) unterzogen wurden, verlagerte sich nach einer 48-stündigen Postinkubationsphase wieder vom G2-Bereich in den G1-Bereich, was einem allmählichen Übergang zur Normalsituation entspricht. Nach der Kombinationsbehandlung von Tr und einem HS waren die Zellen nachweislich weiter in der G2-Phase arretiert, was eine Verlängerung des Tr-induzierten G2-Arrests durch einen HS demonstriert (Abb. 3.5). Nachfolgende Untersuchungen ergaben sehr unterschiedliche Reaktionen von U2Os und SW872 Zellen auf den G2/M-Block. Die Inkubation mit Tr induzierte bei SW872 Zellen Apoptose mit einer deutlichen Verstärkung nach einem zusätzlichen HS (Abb. 3.6 A).

Die Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7, insbesondere nach den Kombinationsbehandlungen, bekräftigte diese Beobachtung zusätzlich (Abb. 3.7 A). Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen war bei U2Os Zellen weitaus geringer (Abb. 3.6 B) und im Vergleich zu SW872 Zellen fand keinerlei Aktivierung der Caspasen 3 und 7 statt (3.7 B). Stattdessen wiesen U2Os Zellen einen behandlungsinduzierten Eintritt in die zelluläre Seneszenz auf, der temperaturabhängig weiter verstärkt wurde (Abb. 3.8 A).

Die Seneszenz ist ein permanenter Zellzyklusarrest und ist ein häufig vorkommender Zustand nach zellulärem Stress durch Zytostatika (Lauber et al. 2012). Die betroffenen Zellen bleiben dabei metabolisch aktiv und vital. Bei gesunden Zellen wird die Seneszenz oftmals als einer der Gründe für Zellalterung diskutiert, sie gilt aber allgemein auch als ein wichtiger Tumorsuppressormechanismus (Campisi & d'Adda di Fagagna 2007; Collado & Serrano 2010).

Der Übergang der Zellen in Apoptose oder Seneszenz erklärt die auftretende Normalisierung der DNA-Verteilung in den Zellzyklushistogrammen 72 h nach den Kombinationsbehandlungen (nicht gezeigt). Nur die Zellen, die keinen DNA-Schaden erfahren haben oder den aufgetretenen DNA-Schaden beheben konnten, überlebt haben und weiter proliferieren, überwiegen dann wieder in den Zellzyklusanalysen.

Der Eintritt in Apoptose oder Seneszenz bei SW872 und U2Os Zellen könnte in Unterschieden in der Expression oder der Aktivitätsmuster von p53 begründet sein. Die Aktivität dieses Tumorsuppressorproteins ist maßgeblich daran beteiligt, ob Zellen als Antwort auf einen starken zellulären Stresstimulus oder DNA-Schaden seneszent werden oder in Apoptose gehen (Ryan et al. 2000). Tumorzellen mit *wt* (Wildtyp) p53 werden nach dem Auftreten erheblicher DNA-Schäden oftmals seneszent und verfügen dadurch gewissermaßen über eine Art Apoptoseresistenz (Campisi & d'Adda di Fagagna 2007). In diesem Zustand sind die Zellen weiterhin metabolisch aktiv, verlassen aber den Zellzyklus und proliferieren somit nicht mehr (Lauber et al. 2012). Zur Überprüfung der Aktivität von p53 wurde bei beiden Zelllinien die Expression des CDK-Inhibitors p21 untersucht, dessen Transkription von p53 reguliert wird (Bunz 1998) und der verstärkt in seneszenten Zellen exprimiert wird (Campisi & d'Adda di Fagagna 2007; Lauber et al. 2012). Entgegen der Aussage von Simoens *et al.* (2003), dass Tr die Transkription von p21 inhibiert, war die Expression dieses Proteins bei U2Os Zellen durch Tr nach 48h und 72h leicht erhöht. U2Os Zellen exprimieren

bekanntermaßen *wtp53* (Lee et al. 2006). Ein HS bei 43°C bewirkte eine Herunterregulation der p21-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, die nach 5 h allerdings Tr-unabhängig zunahm (Abb. 3.9 A). Durch einen HS wird die Phosphorylierung von p53 durch ATM und Hsp90 am Serin 15 sowie eine transkriptionsabhängige Akkumulation dieses Proteins bewirkt (Wang & Chen 2003), was folglich die p21-Expression verstärkt. Eine Exposition mit sehr hohen Temperaturen (43°C) führt allerdings zunächst zu einer temporären Reduktion der zellulären Proteinsynthese, die erst nach etwa 5 h wieder anläuft (Wang & Chen 2003). Dies erklärt die hier beobachtete anfänglich reduzierte p21-Expression nach dem HS bei 43°C und die anschließend starke Expression, die allerdings den maximalen Expressionswert von p21 nach der alleinigen Tr-Behandlung nicht übersteigt. Tr induziert bei U2Os Zellen demnach eine verstärkte Expression von p21 aufgrund des auftretenden DNA-Schadens. Ein HS (43°C) resultierte ebenfalls in einer verstärkten Proteinexpression von p21. Der Anstieg der Proteinexpression ist in beiden Fällen am ehesten in einer verstärkten Aktivierung von p53 begründet, die entweder durch Tr oder durch den HS eintritt. Bei SW872 führte weder die Tr-Behandlung, noch der HS zu einer verstärkten Expression von p21 (Abb. 3.9 B). Bei dieser Zelllinie wurde auch keine Seneszenz, sondern eine starke Apoptoseinduktion beobachtet (Abb. 3.8 B).

Der Übergang in eine ausgeprägte Seneszenz bei U2Os Zellen korrespondiert mit der klinischen Beobachtung, dass Tr bei Sarkompatienten in mehr als der Hälfte der beschriebenen Fälle eine Krankheitskontrolle mit Progressionsarrest (= Wachstumsstillstand) bei einer nur geringen Remissionsrate erreicht (komplette Remission und partielle Remission bei zusammen $\leq 8\%$) (Samuels et al. 2013).

Zellen mit fehlendem oder nicht funktionsfähigem p53 weisen im Vergleich zu Zellen mit *wtp53* eine verstärkte Sensitivität gegenüber Tr auf (Moneo et al. 2007). Ein Charakteristikum von SW872 Zellen - wie auch generell von Liposarkomen - ist die Überexpression der E3-Ubiquitin-Ligase MDM2 (Müller et al. 2007; Ohnstad et al. 2013), die p53 als negativer Regulator ubiquitiniert und es somit für die Degradierung durch das 26S Proteasom markiert (Lauber et al. 2012). In klinischen Studien wurde die Wirksamkeit von Tr vor allem für Liposarkome bestätigt (Samuels et al. 2013). Zudem wurde an humanen Karzinomzelllinien gezeigt, dass die Sensitivität sowie auch die Toleranz gegenüber einem HS mit der Expression von p53 in Verbindung stehen (Ohnishi et al. 2004). Generell zeigen die hier erzielten Resultate im Vergleich zu den

anderen Zelllinien, entgegen der Erwartungen keine erhöhte Sensitivität von SW872 Zellen gegenüber Tr alleine. Ein HS und vor allem die Kombinationsbehandlung erzielten dennoch verstärkte zytotoxische Effekte mit einer starken Induktion von Apoptose, die durch eine reduzierte Aktivität von p53 erklärt werden könnte.

4.4 Die Hitzeschock-bedingte Reduktion der Assemblierung von DNA-Reparaturfoci und Erhöhung des DNA-Schadens

Die Vorgehensweise zur Identifizierung der Ursachen für die hitzebedingte Intensivierung des Tr-induzierten G2/M-Blocks umfasste die Analyse der vorbeschriebenen BRCA2-Degradierung durch einen HS (Krawczyk et al. 2011), sowie die der unmittelbaren Auswirkungen auf die Reparatur Tr-induzierter DSBs. Zusätzlich wurde bei diesen Untersuchungen die Kolonkarzinom Zelllinie DLD1 mit aufgenommen. Bei allen Zelllinien (U2Os, SW872, SW982, SKUT-1, RD-ES und DLD1par) bewirkte ein HS eine temperaturabhängige Reduktion der BRCA2-Expression im Western Blot, was eine Beeinträchtigung der Funktionalität der HR durch einen HS nahe legt. Eine Inkubation mit Tr nahm keinen Einfluss auf die Proteinexpression von BRCA2 (Abb. 3.10).

Die immunzytochemische Analyse der γ H2AX Foci ergab (Soares et al. 2007; Tavecchio et al. 2008) einen konzentrationsabhängigen Tr-induzierten Anstieg DSB-positiver Zellen (Abb. 3.11). Durch einen zusätzlichen HS wurde die Anzahl Tr-induzierter DSB-positiver Zellen abhängig von der Höhe der Temperatur deutlich erhöht. Durch einen alleinigen HS wurde ebenfalls ein Anstieg der γ H2AX Foci detektiert.

In diesem Zusammenhang wurde bereits früher diskutiert, ob die durch die Hitze verursachten γ H2AX Foci als Indikatoren für DSBs gewertet werden können (Takahashi et al. 2004) oder als generelle Stressantwort auf hitzebedingte Chromatinveränderungen aufgrund von Proteindenaturierung und -aggregation anzusehen sind (Kampinga & Laszlo 2005). Takahashi und Kollegen haben in Einzelzell-Gelelektrophoresen von hitzeexponierten Zellen eine ausgeprägte DNA-Fragmentierung beobachtet, die sie als DSBs interpretierten und daraufhin die Formation von DSBs durch Hitze postulierten, die letztendlich zum Zelltod führt (Takahashi et al. 2004). Allerdings wählten die Autoren bei ihrem experimentellen Aufbau letale Behandlungsbedingungen von 45,5°C für 180 Minuten. Eine derart starke und langandauernde Hitzeexposition führt nach neueren Erkenntnissen zur

Apoptose oder gar Nekrose (Issels 2008), was zu der beobachteten Fragmentierung des Chromatins geführt haben könnte. Zusätzlich wurde beschrieben, dass die hitzeinduzierten DSBs durch eine fehlende Kolokalisation der γ H2AX Foci mit dem HR-spezifischen Protein MRE11 nicht repariert werden und dies weiterhin zum Zellsterben beiträgt. Die anteilige hitzeinduzierte Dislokation von MRE11 aus dem Nukleus in das Zytoplasma wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bei weitaus niedrigeren Temperaturen von 41°C beobachtet (Xu et al. 2007; Gerashchenko et al. 2010). In der Publikation von Krawczyk *et al.* (2011) wurde demonstriert, dass MRE11 nach einem einstündigen HS bei 41°C - zumindest zu einem großen Anteil - weiterhin mit bestrahlungsinduzierten γ H2AX Foci kolokalisiert. Auf das Ausmaß einer möglichen Dislokation von MRE11 in das Zytoplasma wurde in dieser Arbeit nicht eingegangen (Krawczyk et al. 2011). Desweiteren haben Pandita *et al.* beschrieben, dass ein HS in einer erhöhten H2AX-Phosphorylierung durch ATM resultiert, dies allerdings unabhängig von MRE11 stattfindet (Pandita et al. 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht geklärt, ob eine Hyperthermie-vermittelte Phosphorylierung von H2AX auch ohne ein Auftreten von DSBs stattfindet. Allerdings ergab die Analyse der Kolokalisation zwischen den γ H2AX Foci und der HR-spezifischen Rekombinase RAD51 eine deutliche temperaturabhängige Reduktion kolokalisations-positiver Zellen unter den γ H2AX positiven Zellen (Abb. 3.12). BRCA2 rekrutiert die Rekombinase RAD51 zu den DSBs und kontrolliert zudem seine Fähigkeit, an die DNA zu binden (Park et al. 2014). Da ein HS zu der Degradierung von BRCA2 führt, bleibt folglich die Rekrutierung von RAD51 und somit die Assemblierung der Reparaturfoci zur Behebung Tr-induzierter DSBs durch die HR aus. Aufgrund der unzureichenden Reparatur akkumulieren die DSBs im Zellkern. Dieser erhebliche DNA-Schaden führt zu einem ausgeprägten und langanhaltenden G2/M-Block.

4.5 Die BRCA2-Degradierung ist in die thermale Chemosensitivierung involviert

Die bisher gewonnenen Erkenntnisse implizieren, dass die hitzevermittelte Degradierung von BRCA2 in die thermale Chemosensitivierung gegenüber Tr involviert ist. Bei U2Os Zellen mit einem siRNA vermittelten BRCA2-*Knockdown* (KD) hat sich im klonogenen Assay im Vergleich zu Kontrollzellen gezeigt, dass die Gesamtzytotoxizität nach der Kombination von Tr und einem HS zugenommen hat, eine thermale Chemosensitivierung allerdings ausblieb. Dies ist ein deutlicher Hinweis

für die Involvierung von BRCA2 in diesen Prozess. Die Tr-Sensitivität der Zellen nach dem BRCA2-KD fiel allerdings entgegen der Erwartungen (Soares et al. 2007; D'Incalci & Galmarini 2010) vergleichsweise gering aus (Abb. 3.14), was möglicherweise an einer durch die Transfektion verursachten Reduktion der Expression des Proteins XPG liegt (Abb. 3.15). In mehreren präklinischen und klinischen Studien wurde der wirkungssteigernde Effekt von XPG für Tr gezeigt (Herrero et al. 2006; Schöffski et al. 2011).

Zur Vermeidung transfektionsbedingter Effekte auf die Expression von Nicht-Zielgenprodukten wurde zusätzlich mit einer BRCA2-defizienten Kolonkarzinom Zelllinie (DLD1 *BRCA2*^{-/-}) gearbeitet. Bei diesen Zellen wird das BRCA2-Protein durch eine gezielte Unterbrechung am Exon 11 nicht mehr exprimiert. Aufgrund einer generellen p53-Defizienz der DLD1 Zelllinie sind die Zellen dennoch vital und proliferationsfähig (Hucl et al. 2008). Das klonogene Überleben nach einer Kombinationsbehandlung wurde mit dem der syngenem Kontrollzellen (DLD1par) verglichen (Abb. 3.16). Zudem wurde die HS-bedingte Verstärkung des Tr-induzierten G2-Arrests und der Apoptoseinduktion analysiert (Abb. 3.17 und Abb. 3.18). Bei diesem BRCA2-defizienten Zellmodell führte Tr im Vergleich zu den Kontrollzellen zu verstärkter Apoptose, im Vergleich zu den BRCA2-profizienten Kontrollzellen trat allerdings in keinem experimentellen Ansatz eine thermale Chemosensitivierung gegenüber Tr auf.

Es wurde an zwei Zelllinien verschiedener Tumorentitäten mit unterschiedlich induzierten BRCA2-Defizienzen gezeigt, dass das Fehlen von BRCA2 im Ausbleiben einer hitzebedingten Wirkungsverstärkung von Tr resultiert. Die hitzevermittelte Degradierung von BRCA2 wurde somit als einer der Hauptfaktoren für die thermale Chemosensitivierung identifiziert.

4.6 Die Expression von Hitzeschockproteinen wird durch eine Trabectedin/Hitzeschock Kombination nicht beeinflusst

Minuzzo *et al.* (2000) haben eine Tr-bedingte Reduktion der Hsp70 Expression beschrieben, was einen weiteren bedeutenden zytotoxischen Effekt von Tr darstellen würde. Aufgrund der induzierenden Wirkung eines HS auf die Hsp70 Expression werden proliferationsstimulierende und antiapoptotische Funktionen (Blagosklonny 2002; Li & Srivastava 2004), sowie die Auflösung von hitzeinduzierten Proteinaggregaten verstärkt ausgeführt. Dies würde durch eine Tr-vermittelte Hsp70-

Inhibition wieder ausgeglichen werden. Allerdings gäbe es bei diesem Ansatz möglicherweise ebenfalls eine Reduktion der von Jolesch *et al.* (2012) beschriebenen immunstimulatorischen Wirkung von Hsp70 nach einem HS (Jolesch *et al.* 2012), was die direkte Lyse von Tumorzellen durch NK-Zellen vermindern könnte.

Eine Reduktion der Hsp70 Expression als Folge einer Tr-Behandlung konnte in der vorliegenden Arbeit auf Proteinebene nicht beobachtet werden (Abb. 3.19 A). Neben einem leichten Anstieg der Proteinexpression 5 h und 8 h nach einem HS bei 43°C wurde Hsp70 nicht weiter induziert. Die voneinander abweichenden Resultate sind womöglich durch die unterschiedlichen Behandlungsbedingungen begründet. Bonfanti *et al.* und Minuzzo *et al.* haben zwar beide gleichermaßen eine konzentrationsabhängige Inhibierung des Hsp70-Transkriptionsaktivators NF- κ B durch Tr beobachtet (Bonfanti *et al.* 1999; Minuzzo *et al.* 2000), eine Tr-induzierte Reduktion der Hsp70-Expression wurde allerdings erst nach einer zweistündigen Behandlung bei einer Konzentration von 30 nM Tr gezeigt (Minuzzo *et al.* 2000). Diese Behandlungskonzentration liegt um ein vielfaches höher, als die hier verwendete Konzentration von 4 nM Tr und entspricht nicht den einsetzbaren Konzentrationen in klinischen Ansätzen (Simoens *et al.* 2003), was die Relevanz der Tr-induzierten Reduktion der Hsp70-Expression in Frage stellt.

Bei der Expression von Hsp90 wurde keinerlei behandlungsinduzierte Veränderung auf Proteinebene festgestellt (Abb. 3.19 B).

4.7 Auswertung der Daten aus den Hochdurchsatzanalysen

4.7.1 Kombination von Trabectedin mit DNA-schädigenden Behandlungen

Dem DSB-induzierenden Agenz Tr wird als Monotherapie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine starke antineoplastische Aktivität zugesprochen. Dennoch scheint nach den klinischen Daten eine Heilung einer Tumorkrankheit unter Tr eher unwahrscheinlich. Vielmehr scheint das Medikament die Tumorprogression für eine längere Zeit zu hemmen (Samuels et al. 2013). Aus diesem Grund ist es von großem Interesse, die Tumorwirksamkeit von Tr durch eine gezielte Kombination mit anderen antineoplastischen Behandlungsoptionen weiter zu steigern und dies nach Möglichkeit ohne die systemischen Nebenwirkungen zu erhöhen. Neben der hier demonstrierten Kombination mit Hyperthermie wird beispielsweise auch der Einsatz einer Chemoradiotherapie unter Verwendung von Tr diskutiert. *In vitro* Analysen haben gezeigt, dass die Tr-induzierte Arretierung in der G2-Phase Krebszellen für eine Radiotherapie sensibilisiert (Simoens et al. 2003; Romero et al. 2008). Die Sensitivität von Zellen auf eine Bestrahlungsbehandlung variiert innerhalb unterschiedlicher Zellzyklusphasen. Während sich Zellen in der S-Phase als am stärksten radioresistent erwiesen haben, werden Zellen in der G2/M-Phase am empfindlichsten gegenüber einer Bestrahlung angesehen (Terasima & Tolmach 1963).

Die Erhöhung der thermalen Stabilität der DNA-Doppelhelix nach einer Tr-Behandlung (Casado et al. 2008) gibt weiteren Anlass zur Untersuchung zusätzlicher Kombinationsmöglichkeiten. Aufgrund der Struktur der entstehenden Addukte wurde eine mögliche Vergleichbarkeit zwischen Tr und ICL (*Interstrand Crosslink*)-induzierenden Agenzien wie Mitomycin C (MMC) in Hinsicht auf DNA-schädigende Effekte untersucht, die allerdings nicht nachgewiesen werden konnte. Hierfür wurden die Zellzyklusphasen bestimmt, in denen zum einen behandlungsinduzierte γ H2AX Foci auftraten und zum anderen die behandelten Zellen im Zellzyklus arretiert wurden. In beiden Ansätzen wurde keine Übereinstimmung durch beide Zytostatika detektiert (γ H2AX MMC: mittlere/späte S-Phase vs. Tr: frühe S-Phase, Zellzyklusarrest MMC: G1 vs. Tr: überwiegend G2/M). Dennoch wurde eine erhöhte Sensitivität gegenüber Tr bei FA (Fanconi Anämie)-defizienten Zellen festgestellt, die mit der Empfindlichkeit gegenüber einer MMC-Behandlung vergleichbar war. Hierbei unterschieden sich die Phasen, in denen ein behandlungsbedingter Zellzyklusarrest stattgefunden hat jedoch erneut voneinander (Casado et al. 2008). Der FA-DNA Reparaturweg dient der

Beseitigung von ICLs durch die Koordinierung der TLS (Transläsions DNA Synthese), der NER und der HR (Räschle et al. 2008; Shen & Houghton 2014). Ein gezieltes Screening für Mutationen in den FA-Genen bei Tumorzellen könnte daher Vorhersagen über dem Behandlungserfolg mit Tr ermöglichen.

Diese Erkenntnisse haben Martínez *et al.* (2013) zu einer neuen Kombinationsstrategie weiterentwickelt. Ihre Forschungsergebnisse zeigen, dass Tr FA-profiziente Zellen „fanconisiert“, das heißt eine simulierte FA induziert. Dies geschieht, indem Tr durch die transkriptionelle Herunterregulation von FANCD2, einer essentiellen Komponente dieses Signalweges (Garcia-Higuera et al. 2001; Ohashi et al. 2005; Martínez et al. 2013) mit der Aktivität des FA-DNA Reparaturweges interferiert. Mit Tr vorbehandelte Zellen werden somit nicht nur gegenüber Tr selbst sensitiviert, sondern die Empfindlichkeit gegenüber den klassischen ICL-induzierenden Agenzien wie MMC wird ebenfalls maßgeblich erhöht (Martínez et al. 2013).

4.7.2 Identifizierung prädiktiver Marker und weiterer Kombinationspartner

In diesem Zusammenhang wurden in der vorliegenden Arbeit weitergehend Analysen zur Identifizierung von DNA-Reparatur Proteinen vorgenommen, deren Inhibition eine zusätzliche Sensitivierung gegenüber Tr und insbesondere gegenüber einer Kombinationsbehandlung mit Hyperthermie hervorrufen könnte bzw. deren An- oder Abwesenheit als prädiktiver Marker für ein Therapieansprechen auf die Behandlung dienen könnte.

Hierfür wurden Hochdurchsatzanalysen mittels Transfektion einer eigens etablierten siRNA-*Library* durchgeführt. Die siRNA-*Library* richtete sich zu je drei unterschiedlichen Sequenzen gegen jeweils eines von 139 Genprodukten, die in die DNA-Reparatur unterschiedlicher Reparatursysteme und in die Regulation der Proliferation involviert sind (Tab. 3.3). Nach einer Behandlung mit Tr und/oder einem HS wurde die resultierende Proliferationshemmung ermittelt. Die Auswertung der Daten ergab, dass der KD zahlreicher Genprodukte in eine behandlungsinduzierte Wirkungssteigerung involviert ist (Abb. 3.22). Hierbei fiel auf, dass der KD von BRCA1, PARP1, FANCD2, ERCC1 und CHEK1 bei jeder Behandlungsbedingung zu einer ausgeprägten Proliferationshemmung in unterschiedlichen Stärkegraden geführt hat.

Die getroffenen Vorhersagen über involvierte Proteine und die Relevanz von BRCA1, PARP1, FANCD2, ERCC1 und CHEK1 für die Effektivität der kombinierten Tr- und

HS-Behandlung wurden anschließend durch einen nochmaligen KD und der Analyse des behandlungsinduzierten klonogenen Überlebens als sensitiveres *Readout*-System überprüft.

Es fiel auf, dass die Zellen bis auf den KD von FANCD2 bei allen durchgeführten KDs ein deutlich reduziertes klonogenes Überleben aufwiesen (nicht gezeigt).

Ein KD von BRCA1 resultierte im Vergleich zur AS-Negativkontrolle (Abb 3.23 A) nach einer alleinigen Tr-Behandlung in einer deutlichen Reduktion des klonogenen Überlebens. Die Empfindlichkeit gegenüber einer Kombinationsbehandlung wurde zusätzlich verstärkt (Abb 3.23 B). BRCA1 ist ein weiteres Tumorsuppressorprotein, das maßgeblich in die HR involviert ist (Farmer et al. 2005; O'Donovan & Livingston 2010). Es besitzt eine E3 Ligaseaktivität und vermittelt zusammen mit dem MRN-Komplex und CtIP die Prozessierung zu einzelsträngiger DNA an DSBs (Venkitaraman 2002; O'Donovan & Livingston 2010; Krawczyk et al. 2011). Zudem wird eine unterstützende Funktion bei der Rekrutierung von RAD51 zu DSB-Reparaturfoci vermutet. Darüber hinaus nimmt BRCA1 Funktionen bei der Zellzykluskontrolle und bei der Regulation mitotischer Teilungsschritte ein (O'Donovan & Livingston 2010). Die erhaltenen Resultate weisen darauf hin, dass die Expression und der Mutationsstatus von BRCA1 einen vielversprechenden prädiktiven molekularen Marker für das Tumorsprechen auf eine Kombination von Tr und Hyperthermie darstellen, zumal der prädiktive Effekt bezüglich einer alleinigen Tr-Behandlung bereits beschrieben wurde (Schöffski et al. 2011; Italiano et al. 2011). Eine Mutation von BRCA1 ist zudem in 80% der Brustkrebsfälle und in 30 - 40% der Ovarialkarzinomfälle vorzufinden (O'Donovan & Livingston 2010). Weitere präklinische Forschungsansätze bezüglich einer Kombination von Tr und Hyperthermie sind bei diesen Tumorentitäten unter Berücksichtigung der Mutation erstrebenswert.

Die Vorhersagen aus den Hochdurchsatzanalysen wurden für BRCA1 im klonogenen Assay bestätigt. Auftretende Diskrepanzen zwischen der Intensität der Proliferationshemmung und der Reduktion des klonogenen Überlebens könnten an unterschiedlichen Effektivitäten der durchgeführten KDs liegen.

Die Wirkungssteigerung von Tr, die aus einem KD von FANCD2 resultierte, wurde mit beiden Versuchsansätzen nachgewiesen. Die starke Wachstumsinhibition nach der Kombinationsbehandlung wurde durch den klonogenen Assay allerdings nicht bestätigt (Abb. 3.23 C). Dieser Unterschied könnte durch einen nur schwachen KD bei

den Validierungsexperimenten begründet werden, für den keine Daten aus den Hochdurchsatzanalysen vorliegen. Im FA-DNA Reparaturweg wird FANCD2 zusammen mit FANCI vom FA Kernkomplex (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL und FANCM) zum FA-ID Komplex monoubiquitiniert, was als zentraler Regulationsprozess in diesem Signalweg angesehen wird. Nach einer Rekrutierung an das Chromatin kolokalisiert der FA-ID Komplex mit weiteren Proteinen wie BRCA2, PALB2 und RAD51C und trägt dort zur Formation von DNA-Reparaturfoci bei (Räschle et al. 2008; Casado et al. 2008; Martínez et al. 2013). Zudem wird FANCD2 für die Aktivierung des ATM-CHEK2 Kontrollpunktes in der frühen Phase des FA-DNA Reparaturweges benötigt (Shen & Houghton 2014). Die von Casado *et al.* beschriebene Funktion von FANCD2 als prädiktiver Marker für eine Tr-Sensitivität (Casado et al. 2008) wurde in der vorliegenden Arbeit erneut bestätigt.

Der KD von PARP1 resultierte bei beiden Analyseformen in einer Wirkungsverstärkung von Tr allein und von Tr und einem HS (Abb. 3.23 D). PARP1 ist ein zentraler Bestandteil der Basenexzisionreparatur (BER) von DNA-Einzelstrangbrüchen und eine Fehlfunktion führt zur Entstehung von DSBs an nachfolgenden Replikationsgabeln (Farmer et al. 2005; Fong et al. 2009; O'Donovan & Livingston 2010). Die Inhibition von PARP1 zeigt eine bis zu 1000-fach erhöhte Wirksamkeit bei HR-defizienten Zellen, insbesondere bei Defizienzen von BRCA1 und BRCA2, da entstandene DSBs nicht mehr repariert werden (Martin et al. 2008; Fong et al. 2009). Diese synthetische Letalität machte man sich in klinischen Ansätzen zunutze, bei denen der PARP-Inhibitor Olaparip zur Behandlung von BRCA1- oder BRCA2-defizienten Tumoren eingesetzt wurde (Fong et al. 2009). Krawczyk *et al.* induzierten anschließend die synthetische Letalität durch Olaparib und Hyperthermie (Krawczyk et al. 2011).

Der zusätzliche Einsatz von PARP-Inhibitoren zu einer kombinierten Tr- und Hyperthermie-Behandlung lässt eine weitere Effektivität dieses Trippelansatzes vermuten, da die hitzeinduzierte HR-Defizienz die Toxizität beider Zytostatika erwiesenermaßen steigert. Darüber hinaus haben Sehouli et al. berichtet, dass eine sensitivierende Eigenschaft von PARP-Inhibitoren gegenüber Tr bereits nachgewiesen wurde (Sehouli et al. 2012).

Die Behandlung mit Tr zeigte bei einem KD von ERCC1 erwartungsgemäß keine Wachstumsinhibition und Reduktion des klonogenen Überlebens (Herrero et al. 2006;

Italiano et al. 2011). Die ausbleibende Wachstumsinhibition durch einen HS wurde ebenfalls im klonogenen Assay bestätigt (Abb. 3.23 E). Bei den Hochdurchsatzanalysen wurde allerdings auch eine nicht reproduzierbare Wirkungssteigerung nach der Kombinationsbehandlung beobachtet. Bei den Validierungsexperimenten war der KD sehr effektiv. Unter diesen Bedingungen konnte eine stärkere Wachstumsinhibition nach der Kombinationsbehandlung nicht mehr reproduziert werden. Die Resultate der Validierungsexperimente bestätigen die Funktion der ERCC1-Expression als potentiell prädiktiven Marker für eine mögliche Resistenz auf eine Tr-Therapie.

Die letzte Validierung wurde mit einem CHEK1-KD durchgeführt. Die Vorhersagen bezüglich der Sensitivität gegenüber Tr, einem HS und einer Kombination wurden im klonogenen Assay bestätigt. Ein KD von CHEK1 steigerte die Wirksamkeit von Tr leicht und zeichnete sich durch eine starke Reduktion des Überlebens nach einem HS aus. Die Kombination aus Tr und einem HS bewirkte sogar eine Wachstumsinhibition des höchsten Stärkegrades (Abb. 3.23 F). Die Serin/Threonin Kinase CHEK1 ist ein essentieller Kontrollpunkt für die Zellzyklusprogression, die DNA-Reparatur und die Apoptose. Als Folge von zellulärem Stress, einer angehaltenen Replikationsgabel oder DNA-Schäden wird CHEK1 von ATR phosphoryliert und aktiviert (Arlander et al. 2003; Bartek & Lukas 2003; Reinhardt & Yaffe 2009). Daraufhin verlangsamt CHEK1 die Progression durch die S-Phase, initiiert mitunter einen G2-Arrest oder stabilisiert blockierte Replikationsgabeln. Es wurde beschrieben, dass CHEK1-defiziente Zellen sehr sensitiv auf DNA-schädigende Agenzien oder ionisierende Strahlung reagieren (Arlander et al. 2003). Aufgrund dieser Eigenschaft und der erarbeiteten Resultate stellt CHEK1 einen potentiellen prädiktiven Marker für ein Tumorsprechen auf eine Kombinationsbehandlung von Tr und Hyperthermie dar. Des Weiteren wurde CHEK1 als ein Substratprotein von Hsp90 beschrieben. Arlander *et al.* (2003) demonstrierten, dass eine Behandlung mit dem Hsp90-Inhibitor 17-AAG (17-Demethoxygeldanamycin) neben einer Reduktion der Hsp90-Expression auch in einem reduzierten CHEK1-Proteingehalt resultierte. 17-AAG ist in der klinischen Erprobung (Modi et al. 2011) und die Effekte einer Kombination mit Tr sollten in zukünftigen Forschungsansätzen erwogen werden.

Neben der Relevanz der validierten Proteine als molekulare Marker für ein Therapieansprechen oder gar als potentielle Kombinationspartner zu Tr und

Hyperthermie belegen die Validierungsexperimente die Aussagekraft und Zuverlässigkeit der hier etablierten siRNA-*Library* für Hochdurchsatzanalysen. Alle Vorhersagen bezüglich der Einzelbehandlungen mit Tr oder einem HS konnten bestätigt werden, sowie drei von fünf Vorhersagen bezüglich der Kombinationsbehandlungen (Tab. 3.4)

4.7.3 Proteine der Homologen Rekombinationsreparatur sind an der thermalen Chemosensitivierung maßgeblich beteiligt

Für die weitere Auswertung der aus den Hochdurchsatzanalysen gewonnenen Daten wurde in einem Streudiagramm die Wachstumsinhibitionsratio einer alleinigen Tr-Behandlung bei 37°C gegen die Wachstumsinhibitionsratio aus den Kombinationsbehandlungen bei 41,8°C (Abb. 3.24 A) oder 43°C (Abb. 3.24 B) des jeweiligen KDs aufgetragen. Es haben sich hierbei drei unterschiedliche Gruppierungen innerhalb der KDs herausgebildet, die für eine Wirkungssteigerung (Proliferationshemmung) der einzelnen Behandlungen von Relevanz waren.

Es kristallisierte sich eine Gruppe heraus, bei der Tr erst mit einem zusätzlichen HS in einer Proliferationshemmung resultierte. Zwar waren diese Genprodukte innerhalb unterschiedlichster DNA-Reparaturwege verteilt, jedoch wies ein Drittel eine Zugehörigkeit zur NER auf. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass auch Zellen die unempfindlich auf Tr reagieren, durch einen zusätzlichen HS gegenüber diesem Zytostatikum sensitiviert werden können.

In einer weiteren Gruppe waren Genprodukte lokalisiert, deren KD in einer ausgeprägten Tr-Sensitivität resultierte, die durch einen HS relevant verstärkt wurde. Bei dieser Gruppe ließ sich keine verstärkte Zugehörigkeit zu einem bestimmten DNA-Reparaturweg erkennen.

Die dritte identifizierte Gruppierung beinhaltete Genprodukte, deren KD zwar in einer verstärkten Sensitivität gegenüber Tr resultierte, ein zusätzlicher HS hatte allerdings keinen weiteren potenzierenden Effekt auf die Proliferationshemmung. Dies ähnelt den Beobachtungen bezüglich des klonogenen Überlebens nach einem BRCA2-KD und einer kombinierten Tr- und HS-Behandlung (Abb. 3.14). Aus dieser Gruppe erwiesen sich die Genprodukte bei beiden angesetzten HS-Temperaturen zu mehr als einem Drittel als spezifisch für die HR (Abb. 3.25), was das beschriebene Ausbleiben einer thermalen Chemosensitivierung gegenüber Tr bei HR-defizienten Zellen nochmals untermauert.

4.8 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde *in vitro* eine thermale Chemosensitivierung gegenüber Tr bei Sarkomzellen in Hinsicht auf das klonogene Überleben nachgewiesen.

Die Analyse der zugrunde liegenden molekularen Vorgänge lässt folgenden Wirkmechanismus vermuten: Die hitzebedingte Degradierung des HR-spezifischen Proteins BRCA2 führt zu einer ausbleibenden Rekrutierung der Rekombinase RAD51 zu den Tr-induzierten DSBs. Aufgrund dessen werden die für die Behebung des DNA-Schadens notwendigen Reparaturfoci nur unzureichend assembliert und die DSBs akkumulieren in den Zellen. Der resultierende Tr-induzierte G2/M-Block wird durch einen HS folglich verstärkt und verlängert. Final führt dieser zelluläre Stress Zelllinien-spezifisch vermehrt zum Übergang in die zelluläre Seneszenz oder zum Eintritt in die Apoptose.

An zwei unterschiedlichen BRCA2-defizienten Zellmodellen und durch Hochdurchsatzanalysen wurde hierbei belegt, dass die hitzeinduzierte HR-Defizienz -insbesondere die von BRCA2- maßgeblich in die thermale Chemosensitivierung gegenüber Tr involviert ist.

Da sowohl Tr, als auch die RHT etablierte klinische Behandlungsoptionen sind, sollte die Relevanz dieser Kombinationsbehandlung in der Klinik überprüft werden. Ein erster Schritt hierzu wurde von der Abteilung für Hyperthermie des Klinikums der Universität München unternommen. In einer retrospektiven Analyse wurde das progressionsfreie Überleben von vier Anthracyclin-refraktären Hochrisiko Liposarkompatienten untersucht, die mit Tr und RHT behandelt wurden. Die Patienten erhielten eine standardisierte Tr-Infusion (24 h, 1,5 mg/m²) mit einer gleichzeitigen RHT-Behandlung zum Ende der Infusionszeit. Die dabei verzeichnete Progressionsarrestrate von 75 % ohne eine Erhöhung der Tr-induzierten Nebenwirkungen stellt dabei im Vergleich zu anderen klinischen Studien, die sich mit Tr befassen (Samuels et al. 2013) einen vielversprechenden Behandlungsansatz dar (Kampmann et al. 2013).

Zudem wurden aus dem Blut der Patienten PBMCs (engl. *peripheral blood mononuclear cells*) isoliert und die Anzahl der behandlungsinduzierten γ H2AX Foci als DSB-Indikator ermittelt, um einen möglichen Surrogatmarker für das Therapieansprechen zu identifizieren. Hierbei hat sich zusätzlich zu der

angenommenen Kinetik von Tr ein signifikanter Effekt durch RHT herausgestellt, der sich in einem Anstieg der γ H2AX Foci äußerte (Kampmann et al. 2013).

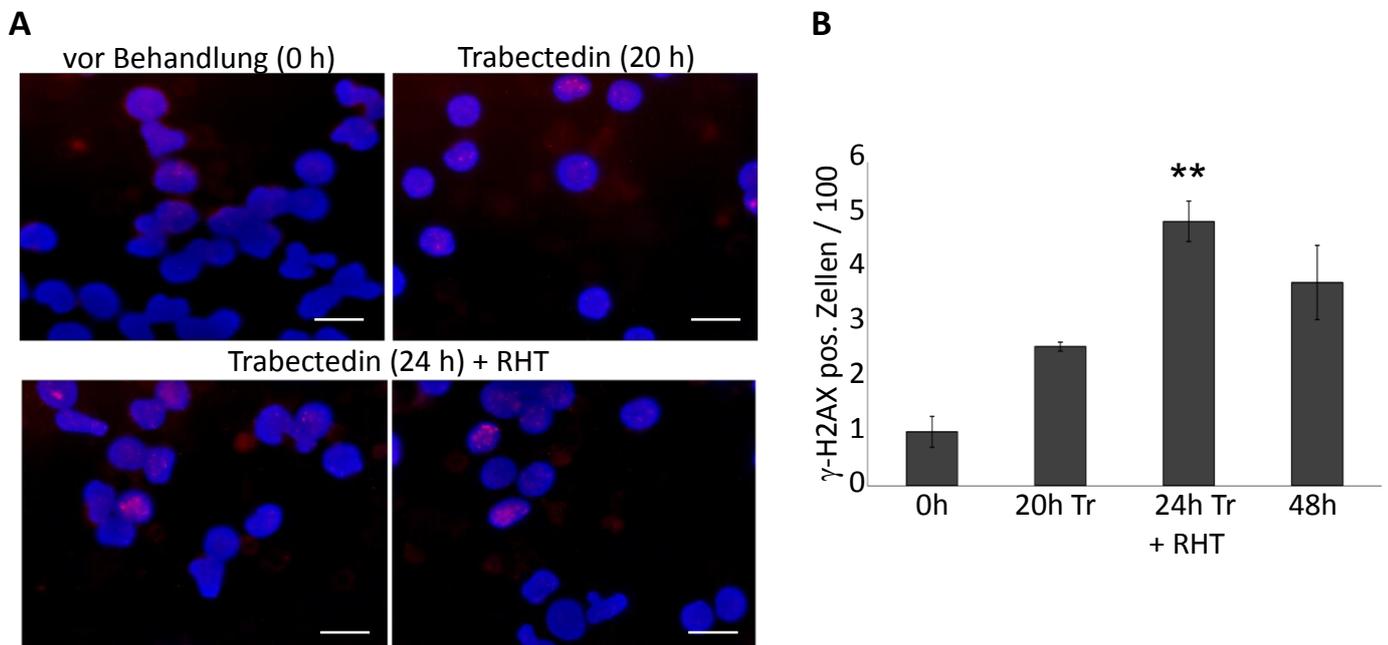


Abb. 4.1 Anzahl behandlungsinduzierter γ H2AX-Foci bei vier Studienpatienten Vor einer Behandlung (0h), während der Tr-Infusion (20h) und unmittelbar vor Ende der simultanen Tr- und RHT-Behandlung (24h Tr + RHT) wurde den Patienten 10 ml heparinisertes Blut abgenommen. Bei den daraus isolierten PBMCs wurden die γ H2AX Foci durch die Inkubation mit spezifischen fluoreszenzgekoppelten Antikörpern im Fluoreszenzmikroskop visualisiert. A) Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Maßstab: 10 μ m. B) Balkendiagramme der statistischen Auswertung ($p=0,009$) der γ H2AX positiven Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten.

Zur weiteren Validierung des Konzeptes einer thermalen Chemosensitivierung gegenüber Tr durch RHT wurde von derselben Arbeitsgruppe eine prospektive randomisierte klinische Studie mit dem Namen Hyper-TET (engl. **Hyperthermia enhanced Trabectedin**) initiiert. Das Ziel der Studie ist, den klinischen Nutzen dieser neuen Behandlungsstrategie zu ermitteln.

Der Mechanismus der hitzebedingten BRCA2-Degradierung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht entschlüsselt und stellt daher einen Fokus zukünftiger Forschung dar. Ein erster Ansatz wäre hierbei die Analyse der Ubiquitinierung von BRCA2 nach einem HS, da die Degradierung proteosomal erfolgt.

Darüber hinaus wurden Proteine identifiziert, die neben einer Funktion als prädiktiver molekularer Marker auf das Therapieansprechen auch weitere Kombinationsansätze zur bereits bestehenden Tr- und Hyperthermiebehandlung darstellen könnten.

- Die erhöhte klinische Wirksamkeit von Tr bei BRCA1-mutierten Tumoren (Italiano et al. 2011; Laroche-Clary et al. 2015) und darüber hinaus bei BRCA1- und 2 mutierten Tumorzellen wurde bereits nachweislich belegt (Delaloge et al. 2014). Die Effekte einer Kombination aus Tr und Hyperthermie bei BRCA1-defizienten Tumorentitäten sollte zukünftig detailliert untersucht werden und könnte eine vielversprechende Behandlungsstrategie für Trippel-negative Mamma-Karzinome darstellen.
- In unabhängigen Arbeiten wurde gezeigt, dass PARP-Inhibitoren die zelluläre Sensitivität gegenüber Tr steigern und sie zudem eine ausgeprägte Wirksamkeit bei BRCA-mutierten Zellen aufweisen (Fong 2009, Sehouli 2012). Das Erarbeiten einer möglichen Kombinationsbehandlung aus Tr, Hyperthermie und PARP-Inhibitoren (wie Olaparib) könnte die Behandlungserfolge weiter erhöhen.
- Die beobachtete Reduktion der CHEK1-Expression durch Hsp90-Inhibitoren sollte im Zusammenhang mit einer kombinierten Tr- und Hyperthermiebehandlung analysiert werden.

Diese Behandlungsstrategien könnten einen weiteren Fortschritt in der Ausarbeitung der chemotherapeutischen Möglichkeiten in der hyperthermen Krebstherapie bedeuten.

5 Referenzen

5.1 Literaturreferenzen

- Adams, J.M., 2003. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.*, 17(20), pp.2481–95.
- Allavena, P. et al., 2005. Anti-inflammatory Properties of the Novel Antitumor Agent Yondelis (Trabectedin): Inhibition of Macrophage Differentiation and Cytokine Production. *Cancer Res*, 65(7), pp.2964–2972.
- Amant, F. et al., 2009. Clinical outcome of ET-743 (Trabectedin; Yondelis) in high-grade uterine sarcomas: report on five patients and a review of the literature. *Int J Gynecol Cancer*, 19(2), pp.245–8.
- Angelo, D.D. et al., 2013. The impairment of the High Mobility Group A (HMGA) protein function contributes to the anticancer activity of trabectedin. *Eur J Cancer*, 49(5), pp.1142–1151.
- Arlander, S.J.H. et al., 2003. Hsp90 inhibition depletes Chk1 and sensitizes tumor cells to replication stress. *J biol chem*, 278(52), pp.52572–7.
- Bartek, J. & Lukas, J., 2003. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*, 3(Figure 2), pp.421–429.
- Bartlett, D.W. & Davis, M.E., 2006. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acid Res.*, 34(1), pp.322–333.
- Bergs, J.W.J. et al., 2013. Inhibition of homologous recombination by hyperthermia shunts early double strand break repair to non-homologous end-joining. *DNA Repair*, 12(1), pp.38–45.
- Bettaieb, A., Wrzal, P.K. & Averill-bates, D.A., 2013. Hyperthermia: Cancer Treatment and Beyond. *INTECH*. <http://dx.doi.org/10.5772/55795>
- Blagosklonny, M. V, 2002. Hsp-90-associated oncoproteins: multiple targets of geldanamycin and its analogs. *Leukemia*, 16, pp.455–462.
- Blay, J.-Y. et al., 2014. Randomised phase III trial of trabectedin versus doxorubicin-based chemotherapy as first-line therapy in translocation-related sarcomas. *Eur J Cancer*, 50(6), pp.1137–47.
- Blay, J.-Y., 2011. Updating progress in sarcoma therapy with mTOR inhibitors. *Ann Oncol* 22(2), pp.280–7.
- Boer, J. De & Hoeijmakers, J.H.J., 2000. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, 21(3), pp.453–460.
- Bonfanti, M. et al., 1999. Effect of ecteinascidin-743 on the interaction between DNA binding proteins and DNA. *Anticancer Drug Des*, 14(3), pp.179–86.

- Bonner, W.M. et al., 2008. GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer*, 8(12), pp.957–67.
- Bunz, F., 1998. Requirement for p53 and p21 to Sustain G2 Arrest After DNA Damage. *Science*, 282(5393), pp.1497–1501.
- Campisi, J. & d’Adda di Fagagna, F., 2007. Cellular senescence : when bad things happen to good cells. *Nature*, 8, pp.729–740.
- Casado, J. a et al., 2008. Relevance of the Fanconi anemia pathway in the response of human cells to trabectedin. *Mol Cancer Ther*, 7(5), pp.1309–18.
- Cassier, P.A. et al., 2008. Trabectedin and its potential in the treatment of soft tissue sarcoma. *Ther Clin Risk Manag*, 4(1), pp.109–116.
- Coindre, J., 2006. Grading of Soft Tissue Sarcomas. *Arch Pathol Lab Med*, 130(October), pp.1448–1453.
- Collado, M. & Serrano, M., 2010. Senescence in tumours : evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer*, 10(1), pp.51–57.
- Cormier, J.N. & Pollock, R.E., 2004. Soft Tissue Sarcomas. *CA Cancer J Clin*, 54, pp.94–109.
- Cuevas, C. & Francesch, A., 2009. Development of Yondelis (trabectedin , ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem. *Nat. Prod. Rep.*, 26, pp.322–337.
- D’Incalci, M. & Galmarini, C.M., 2010. A Review of Trabectedin (ET-743): A Unique Mechanism of Action. *Mol Cancer Ther*, pp.2157–2163.
- D’Incalci, M. et al., 2014. Trabectedin, a drug acting on both cancer cells and the tumour microenvironment. *Br J Cancer*, 111(4), pp.646–50.
- Dahm-Daphi, J., Brammer, I. & Dikomey, E., 1997. Heat effects on the repair of DNA double-strand breaks in CHO cells. *Int J Radiat Biol*, 72(2), pp.171–9.
- Damia, G. et al., 2001. Unique pattern of ET-743 activity in different cellular systems with defined deficiencies in DNA-repair pathways. *Int. J. Cancer*, 92, pp.583–588.
- Davies, A. a et al., 2001. Role of BRCA2 in Control of the RAD51 Recombination and DNA Repair Protein. *Mol Cell*, 7(2), pp.273–282.
- Delaloge, S. et al., 2014. Activity of trabectedin in germline BRCA1/2-mutated metastatic breast cancer: results of an international first-in-class phase II study. *Ann Oncol*, 25, pp.1152–1158.
- Demetri, G.D. et al., 2010. Soft Tissue Sarcoma. *J Natl Compr Canc Netw.*, 8, pp.630–674.

- Dimri, G.P. et al., 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, pp.9363–9367.
- Dudás, A. & Chovanec, M., 2004. DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Mutat Res*, 566(2), pp.131–67.
- Eppink, B., Essers, J. & Kanaar, R., 2012. Interplay and Quality Control of DNA repair Mechanisms. In K. Rippe, ed. *Genome Organization and Function in the Cell Nucleus*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Erba, E. et al., 2001. Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound , with a unique mechanism of action. *Eur J Cancer*, 37, pp.97–105.
- Eriksson, M., 2010. Histology-driven chemotherapy of soft-tissue sarcoma. *Ann Oncol*, 21, pp.270–276.
- Farmer, H., McCabe, N. & Lord, C.J., 2005. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, 434, pp.917–921.
- Fayette, J. et al., 2009. Phase III trial of standard versus dose-intensified doxorubicin, ifosfamide and dacarbazine (MAID) in the first-line treatment of metastatic and locally advanced soft tissue sarcoma. *Invest New Drugs.*, 27(5), pp.482–9.
- Fong, P.C. et al., 2009. Inhibition of Poly (ADP-Ribose) Polymerase in Tumors from BRCA Mtutation Carriers. *N Engl J Med*, 361(2), pp.123–134.
- Foster, E.R. & Downs, J.A., 2005. Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *FEBS J.*, 272(13), pp.3231–40.
- Franken, N.A.P. et al., 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*, 1(5), pp.2315–2319.
- Friedberg, E.C., 2001. How Nucleotide Excision Repair protects against Cancer. *Nature*, 1, pp.22–33.
- Fujita, N. et al., 2002. Involvement of Hsp90 in signaling and stability of 3-phosphoinositide-dependent kinase-1. *J biol chem*, 277(12), pp.10346–53.
- Gallmeier, E. et al., 2007. High-Throughput Screening Identifies Novel Agents Eliciting Hypersensitivity in Fanconi Pathway – Deficient Cancer Cells. *Cancer Res*, 67(5), pp.2169–2177.
- Garcia-Higuera, I. et al., 2001. Interaction of the Fanconi Anemia Proteins and BRCA1 in a Common Pathway. *Mol Cell*, 7(2), pp.249–262.
- Gary, R.K. & Kindell, S.M., 2005. Quantitative assay of senescence-associated - galactosidase activity in mammalian cell extracts. *Anal. Biochem.*, 343, pp.329–334.
- Gent, D.C. Van, Hoeijmakers, J.H.J. & Kanaar, R., 2001. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature*, 2(March), pp.196–206.

- Gerashchenko, B.I., Gooding, G. & Dynlacht, J.R., 2010. Hyperthermia alters the interaction of proteins of the Mre11 complex in irradiated cells. *Cytometry Part A*, 77(10), pp.940–52.
- Germano, G. et al., 2013. Article Role of Macrophage Targeting in the Antitumor Activity of Trabectedin. *Cancer Cell*, 23(2), pp.249–262.
- Ghielmini, M. et al., 1998. In vitro schedule-dependency of myelotoxicity and cytotoxicity of Ecteinascidin 743 (ET-743). *Ann Oncol*, 9, pp.989–993.
- Gounaris, I. et al., 2014. Trabectedin for advanced soft tissue sarcomas : a single institution experience. *Future Oncol.*, 10(11), pp.1843–51.
- Van der Graaf, W.T. et al., 2011. PALETTE: A randomized, double-blind, phase III trial of pazopanib versus placebo in patients (pts) with soft-tissue sarcoma (STS) whose disease has progressed during or following prior chemotherapy—An EORTC STBSG Global Network Study (EORTC 62072). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(18).
- Grosso, F. et al., 2009. Trabectedin in myxoid liposarcomas (MLS): a long-term analysis of a single-institution series. *Ann Oncol*, pp.1–6.
- Guirouilh-Barbat, J., Redon, C. & Pommier, Y., 2008. Transcription-coupled DNA Double-Strand Breaks Are Mediated via the Nucleotide Excision Repair and the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex. *Mol Biol Cell*, 19, pp.3969–3981.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell*, 144(5), pp.646–674.
- Harmon, B.V. et al., 1990. Cell death induced in a murine mastocytoma by 42-47 degrees C heating in vitro: evidence that the form of death changes from apoptosis to necrosis above a critical heat load. *Int J Radiat Biol*, 58(8), pp.845–58.
- Herrero, A.B. et al., 2006. Cross-Talk between Nucleotide Excision and Homologous Recombination DNA Repair Pathways in the Mechanism of Action of Antitumor Trabectedin. *Cancer Res*, 66(16), pp.8155–8162.
- Hoeijmakers, J.H.J., 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411, pp.366–374.
- Houtsmuller, a. B., 1999. Action of DNA Repair Endonuclease ERCC1/XPF in Living Cells. *Science*, 284(5416), pp.958–961.
- Hucl, T. et al., 2008. A syngeneic variance library for functional annotation of human variation: application to BRCA2. *Cancer Res*, 68(13), pp.5023–30.
- Issels, R.D., 2008. Hyperthermia adds to chemotherapy. *Eur J Cancer*, 44(17), pp.2546–54.

- Issels, R.D. et al., 2010. Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study. *Lancet Oncol*, 11(6), pp.561–70.
- Issels, R.D. et al., 2001. Neoadjuvant chemotherapy combined with regional hyperthermia (RHT) for locally advanced primary or recurrent high-risk adult soft-tissue sarcomas (STS) of adults: long-term results of a phase II study. *Eur J Cancer*, 37(13), pp.1599–608.
- Italiano, A. et al., 2011. ERCC5/XPG, ERCC1, and BRCA1 Gene Status and Clinical Benefit of Trabectedin in Patients With Soft Tissue Sarcoma. *Cancer*, pp.3445–3456.
- Jain, R.K., 2005. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*, 307(5706), pp.58–62.
- Jensen, R.B., Carreira, A. & Kowalczykowski, S.C., 2010. Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature*, 467(7316), pp.678–83.
- Jimeno, J. et al., 2004. New Marine Derived Anticancer Therapeutics - A Journey from the Sea to Clinical Trials. *Mar. Drugs*, 2(January), pp.14–29.
- Jolesch, A. et al., 2012. Hsp70, a messenger from hyperthermia for the immune system. *Eur J Cell Biol*, 91(1), pp.48–52.
- Joseph, C.G. et al., 2014. Exomic Analysis of Myxoid Liposarcomas , Synovial Sarcomas , and Osteosarcomas. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 53, pp.15–24.
- Kabe, Y. et al., 2005. NF-Y is essential for the recruitment of RNA polymerase II and inducible transcription of several CCAAT box-containing genes. *Mol Cell Biol*, 25(1), pp.512–22.
- Kamileri, I., Karakasilioti, I. & Garinis, G. a, 2012. Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks. *Trends Genet*, 28(11), pp.566–73.
- Kampinga, H.H. & Dikomey, E., 2001. Hyperthermic radiosensitization: mode of action and clinical relevance. *Int J Radiat Biol*, 77(4), pp.399–408.
- Kampinga, H.H. & Laszlo, A., 2005. DNA double strand breaks do not play a role in heat-induced cell killing. *Cancer research*, 65(22), pp.10632–3.
- Kampmann, E. et al., 2012. Trabectedin and heat-shock in human sarcoma cells in vitro. *Int J Cancer Res Clin Oncol [Suppl. 1]*, 138: 117
- Kampmann, E. et al., 2013. Trabectedin with Regional Hyperthermia. Experiences in patients with high-risk liposarcoma. In *18th CTOS meeting*. Abstract No. 355
- Karran, P., 2000. DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev*, 10(2), pp.144–150.

- Kasper, B., 2013. Therapie des fortgeschrittenen Weichgewebesarkoms : Neue Perspektiven mit Trabectedin (Yondelis ®). *J Med Drug Rev*, 3, pp.35–43.
- Krawczyk, P.M. et al., 2011. Mild hyperthermia inhibits homologous recombination, induces BRCA2 degradation, and sensitizes cancer cells to poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibition. *PNAS*, 108(24), pp.9851–6.
- Laat, W.L. De, Jaspers, N.G.J. & Hoeijmakers, J.H.J., 1999. Molecular mechanism of nucleotide excision repair Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev*, (13), pp.9851–6.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680–5.
- Laroche-Clary, a et al., 2015. BRCA1 haplotype and clinical benefit of trabectedin in soft-tissue sarcoma patients. *Br J Cancer*, (November 2014), pp.1–5.
- Lauber, K. et al., 2012. Dying cell clearance and its impact on the outcome of tumor radiotherapy. *Front Oncol*, 2, pp.1–14.
- Lee, H.B., Ho, A.S.H. & Teo, S.H., 2006. p53 Status does not affect photodynamic cell killing induced by hypericin. *Cancer Chemother Pharmacol*, 58, pp.91–98.
- Li, W.W. et al., 2001. Sensitivity of Soft Tissue Sarcoma Cell Lines to Chemotherapeutic Agents : Identification of Ecteinascidin-743 as a Potent Cytotoxic Agent. *Clin Cancer Res*, 7, pp.2908–2911.
- Li, Z. & Srivastava, P., 2004. Heat-shock proteins. *Curr Protoc Immunol*, 58(1T), p.A.1T.1–A.1T.6.
- Lindner, L.H. & Issels, R.D., 2011. Hyperthermia in soft tissue sarcoma. *Curr Treat Options Oncol*, 12(1), pp.12–20.
- Lopez, J.P., Gajdos, C. & Elias, A., 2014. Trabectedin : Novel Insights in the Treatment of Advanced Sarcoma. *Curr Oncol Rep*, 16(387), pp.1–8.
- Louneva, N. et al., 2003. Transcriptional inhibition of type I collagen gene expression in scleroderma fibroblasts by the antineoplastic drug ecteinascidin 743. *J Biol Chem*, 278(41), pp.40400–7.
- Lowndes, N.F. & Toh, G.W., 2005. DNA repair: the importance of phosphorylating histone H2AX. *Curr Biol*, 15(3), pp.R99–R102.
- Luetke, A. et al., 2014. Osteosarcoma treatment – Where do we stand ? A state of the art review. *Cancer Treat Rev*, 40(4), pp.523–532.
- Majno, G. & Joris, I., 1995. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. *Am J Pathol*, 146(1), pp.3–15.

- Maki, R.G. et al., 2007. Randomized phase II study of gemcitabine and docetaxel compared with gemcitabine alone in patients with metastatic soft tissue sarcomas: results of sarcoma alliance for research through collaboration study 002 [corrected]. *J Clin Oncol*, 25(19), pp.2755–63.
- Martin, S.A., Lord, C.J. & Ashworth, A., 2008. DNA repair deficiency as a therapeutic target in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 18(1), pp.80–6.
- Martínez, S. et al., 2013. Inhibitory effects of marine-derived DNA-binding anti-tumour tetrahydroisoquinolines on the Fanconi anaemia pathway. *Br J Pharmacol*, 170(4), pp.871–82.
- Mastrangelo, G. et al., 2012. Incidence of Soft Tissue Sarcoma and Beyond. *Cancer*, pp.5339–5348.
- Mayer, M.P. & Bukau, B., 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 62(6), pp.670–84.
- Milani, V. & Noessner, E., 2006. Effects of thermal stress on tumor antigenicity and recognition by immune effector cells. *Cancer Immunol Immunother*, 55(3), pp.312–9.
- Miller, R.C. et al., 1994. Interaction of hyperthermia and chemotherapy agents; cell lethality and oncogenic potential. *Int J Hyperthermia*, 10(1), pp.89–99.
- Minuzzo, M. et al., 2000. Interference of transcriptional activation by the antineoplastic drug ecteinascidin-743. *PNAS*, 97(12), pp.6780–6784.
- Miyakoda, M. et al., 2002. Activation of ATM and phosphorylation of p53 by heat shock. *Oncogene*, 21(7), pp.1090–1096.
- Modi, S. et al., 2011. HSP90 inhibition is effective in breast cancer: a phase II trial of tanespimycin (17-AAG) plus trastuzumab in patients with HER2-positive metastatic breast cancer progressing on trastuzumab. *Clin Cancer Res*, 17(15), pp.5132–9.
- Moneo, V. et al., 2007. Extreme Sensitivity to Yondelis 1 (Trabectedin , ET-743) in Low Passaged Sarcoma Cell Lines Correlates With Mutated p53. *J Cell Biochem*, 100, pp.339–348.
- Müller, C.R. et al., 2007. Potential for treatment of liposarcomas with the MDM2 antagonist Nutlin-3A. *Int. J. Cancer*, 121, pp.199–205.
- Nicoletti, I., Migliorati, G. & Pagliacci, M., 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, 139, pp.271–279.
- Niforou, K.N. et al., 2008. The Proteome Profile of the Human Osteosarcoma U2OS Cell Line. *Cancer Genomics Proteomics*, 5, pp.63–78.

- Noessner, E. et al., 2002. Tumor-Derived Heat Shock Protein 70 Peptide Complexes Are Cross-Presented by Human Dendritic Cells. *J Immunol*, 169(10), pp.5424–5432.
- O'Donovan, P.J. & Livingston, D.M., 2010. BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. *Carcinogenesis*, 31(6), pp.961–7.
- Ohashi, A. et al., 2005. Fanconi anemia complementation group D2 (FANCD2) functions independently of BRCA2- and RAD51-associated homologous recombination in response to DNA damage. *J Biol Chem*, 280(15), pp.14877–83.
- Ohnishi, K. et al., 2004. Effects of a heat shock protein inhibitor KNK437 on heat sensitivity and heat tolerance in human squamous cell carcinoma cell lines differing in p53 status. *Int J Radiat Biol*, 80(8), pp.607–14.
- Ohnishi, K. & Ohnishi, T., 2007. Hyperthermic sensitizers targeting heat-induced signal transductions. *Ann Cancer Res*, 15(2), pp.35–40.
- Ohnstad, H.O. et al., 2013. Correlation of TP53 and MDM2 Genotypes With Response to Therapy in Sarcoma. *Cancer*, (March), pp.1013–1022.
- Pandita, T.K., Pandita, S. & Bhaumik, S.R., 2011. Molecular Parameters of Hyperthermia for Radiosensitization. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.*, 19(3), pp.235–251.
- Park, J.-Y. et al., 2014. Breast cancer-associated missense mutants of the PALB2 WD40 domain, which directly binds RAD51C, RAD51 and BRCA2, disrupt DNA repair. *Oncogene*, 33(40), pp.4803–12.
- Patel, K.J. et al., 1998. Involvement of Brca2 in DNA Repair. *Mol Cell*, 1, pp.347–357.
- Prodromou, C. et al., 1997. Identification and Structural Characterization of the ATP/ADP-Binding Site in the Hsp90 Molecular Chaperone. *Cell*, 90(1), pp.65–75.
- Räschle, M. et al., 2008. Mechanism of replication-coupled DNA interstrand crosslink repair. *Cell*, 134(6), pp.969–80.
- Redaelli, C. a et al., 2001. Hyperthermia-induced HSP expression correlates with improved rat renal isograft viability and survival in kidneys harvested from non-heart-beating donors. *Transpl Int*, 14(6), pp.351–60.
- Reinhardt, H.C. & Yaffe, M.B., 2009. Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Curr Opin Cell Biol*, 21(2), pp.245–55.
- Romero, J. et al., 2008. In vitro radiosensitisation by trabectedin in human cancer cell lines. *Eur J Cancer*, 44(12), pp.1726–33.
- Ryan, K.M. et al., 2000. Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature*, 404(6780), pp.892–7.

- Salvesen, G.S. & Dixit, V.M., 1997. Caspases : Intracellular Signaling by Proteolysis. *Cell*, 91, pp.443–446.
- Samuels, B.L. et al., 2013. Clinical outcomes and safety with trabectedin therapy in patients with advanced soft tissue sarcomas following failure of prior chemotherapy: results of a worldwide expanded access program study. *Ann Oncol*, 24, pp.1703–1709.
- Sauter, B. et al., 2000. Consequences of Cell Death: Exposure to Necrotic Tumor Cells, but Not Primary Tissue Cells or Apoptotic Cells, Induces the Maturation of Immunostimulatory Dendritic Cells. *J ExpMed*, 191(3), pp.423–434.
- Schöffski, P. et al., 2008. Clinical impact of trabectedin (ecteinascidin-743) in advanced / metastatic soft tissue sarcoma. *Expert Opin. Pharmacother.*, 9(9), pp.1609–1618.
- Schöffski, P. et al., 2011. Predictive impact of DNA repair functionality on clinical outcome of advanced sarcoma patients treated with trabectedin : A retrospective multicentric study. *Eur J Cancer*, 47, pp.1006–1012.
- Sehouli, J., Alfaro, V. & González-Martín, a, 2012. Trabectedin plus pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of patients with partially platinum-sensitive ovarian cancer: current evidence and future perspectives. *Ann Oncol*, 23(3), pp.556–62.
- Shen, C. & Houghton, P.J., 2014. Targeting FANCD2 for therapy sensitization. *Oncotarget*, 5(11), pp.6–7.
- Simbulan-Rosenthal, C.M. et al., 1998. Transient Poly(ADP-ribosyl)ation of Nuclear Proteins and Role of Poly(ADP-ribose) Polymerase in the Early Stages of Apoptosis. *J Biol Chem*, 273(22), pp.13703–13712.
- Simoens, C. et al., 2003. In vitro interaction between Ecteinascidin 743 (ET-743) and radiation , in relation to its cell cycle effects. *Br J Cancer*, 89, pp.2305–2311.
- Soares, D.G. et al., 2007. Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743. *PNAS*, 104(32), pp.13062–13067.
- Somaiah, N. & von Mehren, M., 2012. New drugs and combinations for the treatment of soft-tissue sarcoma : a review. *Cancer Manag Res*, 4, pp.397–411.
- Spiro, I.J., Denman, D.L. & Dewey, W.C., 1982. Effect of hyperthermia on CHO DNA polymerases alpha and beta. *Radiat Res*, 89(1), pp.134–49.
- Stennicke, H.R. & Salvesen, G.S., 1998. Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta*, 1387, pp.17–31.
- Sugasawa, K. et al., 1998. Xeroderma Pigmentosum Group C Protein Complex Is the Initiator of Global Genome Nucleotide Excision Repair. *Mol Cell*, 2(2), pp.223–232.

- Taamma, A. et al., 2001. Phase I and pharmacokinetic study of ecteinascidin-743, a new marine compound, administered as a 24-hour continuous infusion in patients with solid tumors. *J Clin Oncol*, 19(5), pp.1256–65.
- Taira, T. et al., 1999. Cell Cycle-dependent Switch of Up- and Down-regulation of Human hsp70 Gene Expression by Interaction between c-Myc and CBF/NF-Y. *J Biol Chem*, 274(34), pp.24270–24279.
- Takahashi, A. et al., 2004. Evidence for the Involvement of Double-Strand Breaks in Heat-Induced Cell Killing Evidence. *Cancer Res*, 64, pp.8839–8845.
- Takebayashi, Y. et al., 2001. Antiproliferative activity of ecteinascidin 743 is dependent upon transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nat Med*, 7(8), pp.961–966.
- Tavecchio, M. et al., 2008. Role of homologous recombination in trabectedin-induced DNA damage. *Eur J Cancer*, 44(4), pp.609–18.
- Terasima, T. & Tolmach, L.J., 1963. X-ray sensitivity and DNA synthesis in synchronous populations of HeLa cells. *Science*, 140(3566), pp.490–2.
- Tewari, D. et al., 2006. Activity of trabectedin (ET-743, Yondelis) in metastatic uterine leiomyosarcoma. *Gynecol Oncol.*, 102(3), pp.421–4.
- Troelstra, C. et al., 1990. Molecular Cloning of the Human DNA Excision Repair Gene ERCC-6. *Mol Cell Biol*, 10(11), pp.5806–5813.
- Trump, B.E. et al., 1997. The Pathways of Cell Death: Oncosis, Apoptosis, and Necrosis. *Toxicol Pathol*, 25(1), pp.82–88.
- Ueda, T., Kakunaga, S. & Ando, M., 2014. Phase I and pharmacokinetic study of trabectedin, a DNA minor groove binder, administered as a 24-h continuous infusion in Japanese patients with soft tissue sarcoma. *Invest New Drugs*, 32(4), pp.691–9.
- Venkitaraman, A.R., 2002. Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, 108, pp.171–182.
- Wang, C. & Chen, J., 2003. Phosphorylation and hsp90 binding mediate heat shock stabilization of p53. *J Biol Chem*, 278(3), pp.2066–71.
- Wegele, H., Müller, L. & Buchner, J., 2004. Hsp70 and Hsp90-a relay team for protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 151, pp.1–44.
- Weinstein, I.B. & Joe, A., 2008. Oncogene Addiction. *Cancer Res*, 68(9), pp.3077–3080.
- Wessalowski, R. et al., 2003. An approach for cure: PEI-chemotherapy and regional deep hyperthermia in children and adolescents with unresectable malignant tumors. *Klin Padiatr*, 215(6), pp.303–9.

- Westra, A. & Dewey, W.C., 1971. Variation in sensitivity to heat shock during the cell-cycle of Chinese hamster cells in vitro. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.*, 19(5), pp.467–77.
- Whitehead, K.A., Langer, R. & Anderson, D.G., 2009. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov*, 8, pp.129–138.
- Wust, P. et al., 2002. Review Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol*, 3, pp.487–497.
- Xu, M. et al., 2007. The effects of 41 degrees C hyperthermia on the DNA repair protein, MRE11, correlate with radiosensitization in four human tumor cell lines. *Int J Hyperthermia*, 23(4), pp.343–51.
- Yonezawa, M. et al., 1996. Hyperthermia induces apoptosis in malignant fibrous histiocytoma cells in vitro. *Int. J. Cancer*, 66(3), pp.347–51.
- Young, J.C., 2001. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *The J Cell Biol*, 154(2), pp.267–274.
- Zewail-Foote, M. & Hurley, L., 1999. Ecteinascidin 743 : A Minor Groove Alkylator That Bends DNA toward the Major Groove. *J Med Chem*, 42(14), pp.2493–2497.

5.2 Internetreferenzen

<http://de.statista.com/statistik/daten/studie/172573/umfrage/krebstote-in-deutschland/>

www.pubmed.org

www.genecards.org

6 Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Aquakultur von <i>Ecteinascidia turbinata</i> und Strukturformel von Tr_____	5
Abb. 1.2: DNA-Tr-XPG Komplex _____	5
Abb. 1.3: Wirkmechanismus von Tr_____	6
Abb. 1.4: Die Sensitivierung gegenüber Hitze durch die gezielte Inhibition apoptose- und proliferationsstimulierender Signalwege_____	11
Abb. 1.5: Darstellung eines Applikators für Regionale Tiefenhyperthermie _____	13
Abb. 1.6: Schematische Darstellung der GG-NER und der TC-NER _____	16
Abb. 1.7: DSB-Reparatur durch HR _____	20
Abb. 2.1: Darstellung eines Zellzyklushistogramms_____	37
Abb. 3.1: Schematische Darstellung der drei unterschiedlichen Behandlungsregime_____	47
Abb. 3.2: Identifizierung des optimalen Behandlungsregimes_____	49
Abb. 3.3: Effektivität von Tr und HS bei STS-Zelllinien _____	51
Abb. 3.4: mRNA- Gehalt von XPG, BRCA1 und ERCC1 bei den untersuchten Sarkomzelllinien _____	53
Abb. 3.5: DNA-Verteilung von SW872 und U2Os Zellen 24 h und 48 h nach Behandlung mit Tr und HS _____	55
Abb. 3.6: Analyse des DNA-Anteils im subG1-Bereich nach 72 h _____	56
Abb. 3.7: DEVDase-Aktivität der Caspasen 3 und 7 bei SW872 und U2Os Zellen	57
Abb. 3.8: Quantifizierung der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase-Aktivität bei U2Os und SW872 Zellen _____	59
Abb. 3.9: Western Blot der p21 Expression bei U2Os und SW872 Zellen_____	60
Abb. 3.10: Analyse der BRCA2-Expression nach Tr und HS mittels Western Blot_	62

Abb. 3.11: Quantifizierung DSB-positiver Zellen durch γ H2AX Foci bei U2Os	63
Abb. 3.12: Kolokalisationen von γ H2AX und RAD51 bei U2Os Zellen	64
Abb. 3.13: Transfektionsoptimierung für einen siRNA-vermittelten BRCA2-KD bei U2Os Zellen	66
Abb. 3.14: Analyse des klonogenen Überlebens von U2Os Zellen mit einem BRCA2-KD im Vergleich zur AS Negativkontrolle	67
Abb. 3.15: Reduktion der XPG-Proteinexpression nach einer Transfektion mit der AS-siRNA und dem siRNA-Mix gegen BRCA2	68
Abb. 3.16: Das klonogene Überleben von DLD1 <i>BRCA2</i> ^{-/-} Zellen im Vergleich zur parentalen Zelllinie	69
Abb. 3.17: Analyse des Tr-induzierten G2-Arrests bei DLD1 Zellen	70
Abb. 3.18: Ermittlung des DNA-Gehaltes im subG1-Bereich bei DLD1 Zellen	71
Abb. 3.19: Western Blot Analyse der Hsp70 und Hsp90 Expression bei U2Os	72
Abb. 3.20: Ermitteln der optimalen Behandlungskonzentration im Proliferationsassay bei SW872 Zellen	74
Abb. 3.21: Proliferationsfähigkeit von SW872 Zellen nach einer Transfektion mit der AS Negativkontrolle und einer kombinierten Tr und HS Behandlung	75
Abb. 3.22: Analyse der Wachstumsinhibition nach Transfektion mit einer siRNA- <i>Library</i> und einer Tr und HS Behandlung bei SW872 Zellen	78
Abb. 3.23: Das klonogene Überleben von U2Os Zellen nach einem BRCA1-, FANCD2-, PARP1-, ERCC1- oder CHEK1-KD im klonogenen Assay	81
Abb. 3.24: Streudiagramm der Wachstumsinhibition nach Tr und einem HS bei 41,8°C und 43°C bei SW872 Zellen	84
Abb. 3.25: Verteilung der Genprodukte, deren KD in einer von einem HS unbeeinflussten Tr-Toxizität resultiert	84

Abb. 4.1: Anzahl behandlungsinduzierter γ H2AX-Foci bei vier Studienpatienten__102

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: In der Arbeit verwendete Zelllinien _____27

Tab. 2.2: Optimierter Einsatz von siRNA und Transfektionsreagenz_____43

Tab. 3.1: Einzelwerte der mRNA Expressionsstärke von XPG, BRCA1 und ERCC1_53

Tab. 3.2: Transfektionsansätze für BRCA2-Transfektionsoptimierung _____66

Tab. 3.3: Auflistung der 139 Genprodukte bei denen ein siRNA-vermittelter
KD durchgeführt wurde_____75

Tab 3.4: Übereinstimmung der Vorhersagen aus siRNA-Library mit
klonogenen Assays _____82

Publikationen

Fachartikel

Harnicek D, Kampmann E, Lauber K, et al., 2015. Hyperthermia Sensitizes Human Sarcoma to Trabectedin by Heat-induced BRCA2 Degradation and Inhibition of Homologous Recombination Repair. *Mol Cancer Ther*

Status: Manuskript eingereicht

Harnicek D, Lauber K, Gallmeier E, et al. 2015. High throuput analyses reveals new therapeutic opportunities for combined trabectedin and hyperthermia treatment in human sarcoma.

Status: Manuskript in Vorbereitung

Kurzbeiträge und Abstracts

Kampmann E, Harnicek D, Cardoso Martins AS et al. 2013. Heat-shock (H-S) and trabectedin efficacy in human soft-tissue sarcoma (STS) cells in vitro. *J Clin Oncol 31 (suppl; abstr e13540)*

Harnicek D, Kampmann E, Tanović A et al. 2014. Hyperthermia combined with Trabectedin prolongs G2 cell cycle arrest and reduces cellular survival in human tumor cells. *Oncol Res Treat; 37 (suppl 1 Abstract ID 297):1–133*

Harnicek D, Kampmann E, Tanovic A. et al. 2014. Trabectedin combined with Hyperthermia: Characterization of enhanced drug-efficacy in human tumor cells *Annals of Oncology 25 (suppl_4): iv494-iv510. 10.1093/annonc/mdu354 (Abstract ID 6646; Poster No. 1438P)*

Poster

Harnicek, Kampmann, Tanović, Guo, Gallmeier, Lauber, Lindner, Issels: *Trabectedin combined with Hyperthermia: Characterization of enhanced drug-efficacy in human tumor cells*. ESMO 2014 Congress, Madrid (26.09 – 30.09.14)

Harnicek, Kampmann, Tanović, Cardoso Martins, Guo, Gallmeier, Kanaar, Lauber, Knösel, Lindner, Issels: *Hyperthermia combined with Trabectedin prolongs G2 cell cycle arrest and reduces cellular survival in human tumor cells*. Deutscher Krebskongress, Berlin (19.-22.02.14)

Kampmann, Harnicek, Cardoso Martins, Thomas Knösel, Tanović, Guo, Gallmeier, Lindner, Kanaar, Issels: *Thermo-sensitization of Trabectedin in human soft-tissue sarcoma (STS) cells: Hyperthermia-mediated BRCA2-degradation is involved in enhanced cytotoxicity*. Connective Tissue Oncology Society Annual Meeting, New York (30.10-02.11.13)

Kampmann, Cardoso Martins, Harnicek, Popp, Tanović, Knösel, Laubender, Mansmann, Moertl, Lindner, Issels: *Trabectedin with Regional Hyperthermia: Experiences in patients with high-risk liposarcoma*. Connective Tissue Oncology Society Annual Meeting, New York (30.10-02.11.13)

Harnicek, Kampmann, Tanović, Cardoso Martins, Eppink, Gallmeier, Lindner, Kanaar, Issels: *Hyperthermia-mediated BRCA2-degradation and cytotoxicity of trabectedin in human soft-tissue sarcoma (STS) cells*. ECCO 2013 Congress, Amsterdam (27.09-01.10.13)

Kampmann, Harnicek, Cardoso Martins, Eppink, Kanaar, Gallmeier, Lindner, Issels: *Heat-shock (H-S) and trabectedin efficacy in human soft-tissue sarcoma (STS) cells in vitro*. ASCO Annual Meeting 13, Chicago (31.05-03.06.2013)

Kampmann, Lindner, Popp, Moertl, Harnicek, Laubender, Mansmann, Issels (2012): *Trabectedin in combination with regional hyperthermia: First experiences in patients with high-risk soft tissue sarcoma (STS)*. Connective Tissue Oncology Society Annual Meeting, Prag (14-17.11.12)

Kampmann, Popp, Harnicek, Moertl, Laubender, Mansmann, Issels: *First clinical experience of trabectedin combined with regional hyperthermia in high-grade soft tissue sarcoma (STS)*. ESMO 2012 Congress, Wien (28.11 - 02.10.12)

Vorträge

Harnicek, Kampmann, Tanović, Guo, Gallmeier, Lauber, Lindner, Issels: *Thermosensitization of trabectedin in human soft-tissue sarcoma (STS) cells: Hyperthermia-mediated BRCA2-degradation is involved in enhanced cytotoxicity*
ESHO 2014 meeting, Turin (11.06 - 14.06.2014)

Kongressteilnahmen

September 2014 European Society for Medical Oncology (ESMO)
Congress
Madrid, Spanien

Juni 2014 29th Annual Meeting of the European Society for
Hyperthermic Oncology (ESHO)
Turin, Italien

Februar 2014 31. Deutscher Krebskongress (DKK)
Berlin, Deutschland

September 2013 17th European Cancer Congress (ECCO)
Amsterdam, Die Niederlande

Juli 2013 15. Wissenschaftliches Symposium der Medizinischen
Klinik III, Klinikum der Universität München
Herrsching, Deutschland

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name Dominique Harnicek
Geb. 18.05.1986, München
Wohnort 82377 Penzberg, Deutschland

Promotion

Nov. 2011 – März 2015

Promotion im Fach Biologie

in der klinischen Kooperationsgruppe
„Tumorthherapie durch Hyperthermie“
der medizinischen Klinik und Poliklinik III,
Ludwig-Maximilians-Universität München und
dem Helmholtz Zentrum München
Betreuer: Prof. Rolf D. Issels
Titel der Arbeit: Untersuchung der gesteigerten
Zytotoxizität von Trabectedin durch Hyperthermie
in Tumorzellen

Studium

2007 – 2011

Biologiestudium

Ludwig-Maximilians-Universität München
Abschluss: *Bachelor of Science* (8-semesterig)

März 2011 – Sep. 2011

Bachelorarbeit

Titel: Untersuchung der Hitzeschock-bedingten
Akt-Phosphorylierung in Sarkomzellen *in vitro*
Betreuer: Prof. Rolf D. Issels

Schulbildung

1996 – 2006

Gymnasium Penzberg
Abschluss: Abitur

Danksagungen

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Rolf D. Issels für die Möglichkeit bedanken, dass ich in der klinischen Kooperationsgruppe „Tumorthherapie durch Hyperthermie“ meine Doktorarbeit an diesem interessanten Thema anfertigen konnte. Ausserdem danke ich ihm für die zahlreichen Gelegenheiten, an nationalen und internationalen Kongressen teilnehmen zu können.

Ein weiterer Dank gilt Prof. Heinrich Leonhardt für die externe Betreuung an der biologischen Fakultät.

Prof. Kirsten Lauber und ihrer Arbeitsgruppe (Molekulare Onkologie im Department für Strahlenbiologie) sowie PD Dr. Eike Gallmeier und seinen Mitarbeiterinnen danke ich für die methodische Unterstützung bei einem Großteil meiner Experimente. Darüber hinaus danke ich Frau Lauber und ihrer Arbeitsgruppe für die freundliche und warmherzige Aufnahme und Unterstützung. Neben dem theoretischen und methodischen Input habt ihr mir auch sehr viel Kraft und Motivation gegeben!

Ein besonders großer Dank gilt natürlich Dr. Eric Kampmann, der mir zu jeder Tag- und Nachtzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat und mich in allen Belangen unterstützt hat. Eine solche Betreuung kann sich jeder Doktorand nur wünschen. Zusammen haben wir ein tolles Projekt verwirklicht!

Zu guter Letzt richtet sich ein ausgesprochen großer Dank an Manuel und meine Töchter Melina und Amelie für ihr Verständnis und ihre Unterstützung in den letzten Jahren. Ihr habt es mir ebenso ermöglicht, meinen Weg ohne viele Stolpersteine gehen zu können.

Abkürzungen aus Tab. 3.3

ABCF2	ATP-binding cassette, sub-family F, member 2	PARP1	poly (ADP-ribose) polymerase 1
APEX1	apurinic/apurimidinic endonuclease 1	PARP2	poly (ADP-ribose) polymerase 2
ATM	ataxia telangiectasia mutated	PARP3	poly (ADP-ribose) polymerase 3
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3 related	PARP4	poly (ADP-ribose) polymerase 4
BLM	Bloom syndrome, RecQ helicase-like	PCNA	proliferating cell nuclear antigen
BRCA1	breast cancer 1, early onset	POLA	polymerase A
BRCA2	breast cancer 2, early onset	POLB	polymerase B
BRIP1	BRCA1 interacting protein 1	POLD1	polymerase D1
CCNH	cyclin H	POLE	polymerase E
CDC2	cyclin-dependent protein kinase Cdk1/Cdc2	POLG	polymerase G
CDK2	cyclin-dependent kinase 2	POLH	polymerase H
CDK7	cyclin-dependent kinase 7	POLI	polymerase I
CDKN3	cyclin-dependent kinase inhibitor 3	POLK	polymerase K
CHEK1	checkpoint kinase 1	POLL	polymerase L
CHEK2	checkpoint kinase 2	POLM	polymerase M
CXCL6	chemokine (C-X-C motif) ligand 6	POLN	polymerase N
DCLRE1A	DNA cross-link repair 1A	POLQ	polymerase Q
DCLRE1B	DNA cross-link repair 1B	PRKDC	protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide
DCLRE1C	DNA cross-link repair 1C	RAD1	RAD1 checkpoint DNA exonuclease
DDB1	damage-specific DNA binding protein 1	RAD17	RAD17 homolog
DDB2	damage-specific DNA binding protein 2	RAD18	RAD18 E3 ubiquitin protein ligase
DNASE2	deoxyribonuclease 2	RAD21	RAD21 homolog
DNMT1	DNA methyltransferase 1	RAD23A	RAD23 homolog A
DNMT3A	DNA methyltransferase 3A	RAD23B	RAD23 homolog B
DNMT3B	DNA methyltransferase 3B	RAD50	RAD50 homolog
E2F5	E2F transcription factor 5	RAD51	RAD51 homolog
ENDO G	endonuclease G	RAD51AP1	RAD51 associated protein 1
ERCC1	excision repair cross-complementation group 1	RAD51C	RAD51 paralog C
ERCC2	excision repair cross-complementation group 2	RAD51L1	RAD51 paralog B
ERCC3	excision repair cross-complementation group 3	RAD51L3	RAD51 paralog D
ERCC4	excision repair cross-complementation group 4	RAD52	RAD52 homolog
ERCC5	excision repair cross-complementation group 5	RAD54L	RAD54-like
ERCC6	excision repair cross-complementation group 6	RAD9A	RAD9 homolog A
ERCC8	excision repair cross-complementation group 8	RECQL	RecQ helicase-like
EXO1	exonuclease 1	RPA1	replication protein A1
FANCA	Fanconi anemia, complementation group A	RPA2	replication protein A2

Anhang

FANCB	Fanconi anemia, complementation group B	RPA3	replication protein A3
FANCC	Fanconi anemia, complementation group C	RPA4	replication protein A4
FANCD2	Fanconi anemia, complementation group D2	SET7	SET domain containing (lysine methyltransferase) 7
FANCE	Fanconi anemia, complementation group E	SET8	SET domain containing (lysine methyltransferase) 8
FANCF	Fanconi anemia, complementation group F	SHFM1	split hand/foot malformation type 1
FANCG	Fanconi anemia, complementation group G	SMC1L1	structural maintenance of chromosomes
FANCL	Fanconi anemia, complementation group L	SSBP1	single-stranded DNA binding protein 1, mitochondrial
FANCM	Fanconi anemia, complementation group M	TERT	telomerase reverse transcriptase
FEN1	flap structure-specific endonuclease 1	TK1	thymidine kinase 1
GMNN	geminin	TOP1	topoisomerase (DNA) I
H2AFX	H2A histone family, member X	TOP1MT	topoisomerase (DNA) I, mitochondrial
H2AFZ	H2A histone family, member Z	TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha
HDAC1	histone deacetylase 1	TOP2B	topoisomerase (DNA) II beta
HDAC10	histone deacetylase 10	TOP3A	topoisomerase (DNA) III alpha
HDAC11	histone deacetylase 11	TP53	tumor protein p53
HDAC2	histone deacetylase 2	TP53BP1	tumor protein p53 binding protein 1
HDAC4	histone deacetylase 4	TREX1	three prime repair exonuclease 1
HDAC6	histone deacetylase 6	TREX2	three prime repair exonuclease 2
Hsp90 _(Tra1 9)	heat shock protein 90kDa beta , member 1	UBE2A	ubiquitin-conjugating enzyme E2A
HSPD1	heat shock 60kDa protein 1	UBE2B	ubiquitin-conjugating enzyme E2B
HUS1	HUS1 checkpoint homolog	UBE2N	ubiquitin-conjugating enzyme E2N
LIG1	ligase 1, DNA, ATP-dependent	UBE2S	ubiquitin-conjugating enzyme E2S
LIG4	ligase 4, DNA, ATP-dependent	UBE2V1	ubiquitin-conjugating enzyme E2V1
MBD1	methyl-CpG binding domain protein 1	UBE2V2	ubiquitin-conjugating enzyme E2V2
MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	WRN	Werner syndrome, RecQ helicase-like
MMP9	matrix metalloproteinase 9	XPA	xeroderma pigmentosum, complementation group A
MMS19L	MMS19 nucleotide excision repair homolog	XPC	xeroderma pigmentosum, complementation group C
MRE11A	meiotic recombination 11 homolog A	XRCC1	X-ray repair complementing defective repair in Chin. h. cells 1
MSH2	mutS homolog 2	XRCC2	X-ray repair complementing defective repair in Chin. h.cells 2
MUTYH	mutY homolog	XRCC3	X-ray repair complementing defective repair in Chin. h. cells 3
NBN	nibrin	XRCC4	X-ray repair complementing defective repair in Chin. h. cells 4
NHEJ	nonhomologous end-joining factor 1	XRCC5	X-ray repair complementing defective repair in Chin. h.cells 5
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase	XRCC6	X-ray repair complementing defective repair in Chin. h.cells 6
OGT	O-linked N-acetylglucosamine transferase		