

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Claus Belka

Strahlentherapie plus HSP90-Inhibition:
Radiosensibilisierung von strahlenresistenten, aggressiven Weichgewebssarkomen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Heidi Kapfhammer

aus
Saarbrücken

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatterin: Prof. Dr. Kirsten Lauber

Mitberichterstatter: PD Dr. David Anz, PD Dr. Björn Krämer

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2020

Abstract

„Radiotherapy is an essential part of current multi-modality treatment regimens targeting soft tissue sarcomas. However, failures in treatment are frequent and often attributed to resistances towards radiotherapy (radioresistance), either intrinsic radioresistance or resistances that were acquired during the treatment. So far, no comprehensive analyses of radiosensitivity/radioresistance are available. Therefore, the intrinsic radioresistance of different soft tissue sarcoma cell lines was analysed and a radioresistance score was developed by dimensionality reduction via principal component analysis (PCA). The PCA-based radioresistance scores were then correlated with transcriptomic profiling data of key *DNA damage response* (DDR) regulators in order to identify molecular markers of radioresistance. Gene expression levels of *Heat shock protein 90* (HSP90) as well as of its client proteins *Ataxia-telangiectasia Mutated* (ATM), *Ataxia telangiectasia and RAD3-related* (ATR), and *Nijmegen-breakage syndrome-1* (NBS1), showed a strong positive correlation with the PCA-derived scores of intrinsic radioresistance. The contribution of HSP90 and its three client proteins to radioresistance of sarcoma cells was addressed by pharmacological inhibition of HSP90, using a novel pochoxime-based inhibitor termed NW457. This treatment resulted in preferential radiosensitization of formerly highly radioresistant soft tissue sarcoma cell lines, as being revealed by decreased clonogenic survival, delayed clearance of *phosphorylated histone H2AX* (γ -H2AX) foci, and increased levels of basal and irradiation-induced cellular senescence. However, no significant changes in irradiation-induced apoptosis or necrosis could be observed. Evaluation of our results in a soft tissue sarcoma cohort of The Cancer Genome Atlas (TCGA) revealed elevated gene expression levels of HSP90, ATR, ATM, and NBS1 in a relevant amount of cases mostly associated with exceptionally poor overall survival. Our data imply that this group of patients might significantly benefit from multi-modal treatment approaches encompassing radiotherapy and HSP90 inhibition.” (Ernst, Anders et al. 2015)

(Absatz entnommen und modifiziert aus: Ernst, Anders, Kapfhammer et al. 2015)

Zusammenfassung

„Die Radiotherapie stellt einen essenziellen Bestandteil der multimodalen Therapie von Weichgewebssarkomen dar. Ein Therapieversagen wird gewöhnlich auf eine intrinsische Strahlenresistenz zurückgeführt. Die Strahlenresistenz von Sarkomen wurde jedoch bisher noch nicht systematisch charakterisiert. In dieser Arbeit analysierten wir die intrinsische Strahlenresistenz einer Reihe verschiedener Weichgewebssarkomzelllinien und erstellten ein *Scoring* mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA). Zur Identifizierung von molekularen Markern der Strahlenresistenz wurden die PCA-basierten Radioresistenzscores mit Transkriptomdaten einer Reihe von DNA-Schadensantwort-Regulatoren korreliert. Die Expressionslevels des Hitzeschockproteins 90 (HSP90) sowie seiner Klientenproteine ATR, ATM und NBS1 zeigten eine positive Korrelation mit den Radioresistenzscores. Ein funktioneller Zusammenhang konnte durch HSP90-Inhibition mit dem pochoximbasierten HSP90-Inhibitor NW457 dargestellt werden, dessen Einsatz in erster Linie strahlenresistente Weichgewebssarkomzelllinien für ionisierende Strahlung sensibilisierte. Damit einher ging eine Verzögerung der DNA-Schadensreparatur (gemessen am Verschwinden der γ -H2AX-Foci nach Bestrahlung) sowie ein vermehrter Eintritt in die zelluläre Seneszenz, jedoch keine signifikanten Veränderungen bei strahlungsinduzierter Apoptose oder Nekrose. Ein Abgleich unserer Ergebnisse mit der Weichgewebssarkom-Kohorte des TCGA zeigte erhöhte Expressionslevels von HSP90, ATR, ATM sowie NBS1 in einer relevanten Subgruppe von Patienten mit signifikant verkürzter Gesamtüberlebenszeit. In Zukunft wäre eine Kombination von HSP90-Inhibition mit Strahlentherapie für diese Patientengruppe interessant, da eben diese Patienten möglicherweise in besonderem Maße davon profitieren könnten. Basierend auf unseren Ergebnissen können wir ebenso festhalten, dass eine HSP90-Inhibition in Kombination mit einer Radiotherapie bei dieser ausgewählten Patientengruppe einen wesentlich effektiveren Therapieansatz darstellen könnte als eine reine Monotherapie. Auch scheint eine HSP90-Inhibition einer ATR, ATM und/oder MRN-Komplex-Inhibition überlegen, da multiple Klientenproteine gleichzeitig von der Therapie angesprochen werden.“ (Ernst, Anders et al. 2015)

(Absatz entnommen, modifiziert und ins Deutsche übersetzt aus: Ernst, Anders, Kapfhammer et al. 2015)

Inhaltsverzeichnis

Abstract englisch	III
Zusammenfassung (Abstract deutsch)	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	1
1.1 Weichgewebssarkome.....	1
1.2 HSP90 in der multimodalen Tumorthherapie	4
2 Zielsetzung	13
3 Material und Methoden	14
4 Ergebnisse	19
5 Diskussion	36
6 Literaturverzeichnis.....	40
Anmerkung.....	53
Beiträge der Autoren und Mitarbeiter	53
7 Anhang	54
Danksagung.....	56
Lebenslauf	57
Eidesstattliche Versicherung	58

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Die Chaperonfunktion von HSP90.	6
Abbildung 2:	Initiierung und Koordination ausgewählter DNA-Reparaturmechanismen.	9
Abbildung 3:	Schematisches Modell der Chaperonfunktion von HSP90 in Gegenwart des HSP90-Inhibitors NW457.	12
Abbildung 4:	Unterschiede in der intrinsischen Radiosensitivität humaner Weichgewebssarkomzelllinien.	21
Abbildung 5:	Ein Transkriptionsprofil stellt eine Korrelation des Strahlenresistenz-Scores mit den mRNA-Expressionslevels bestimmter DNA-Schadensantwort-Regulatoren und HSP90AB1 her.	24
Abbildung 6:	Die Viabilität von Sarkomzellen wird durch eine alleinige HSP90-Inhibition im Vergleich zu einer Kombinationstherapie mit ionisierender Strahlung auf unterschiedliche Weise beeinflusst.	26
Abbildung 7:	Eine Vorbehandlung mit dem HSP90-Inhibitor NW457 verringert das klonogene Überleben vor allem in strahlenresistenten Sarkomzelllinien und verzögert die verzögert die DNA-Schadensreparatur.	29
Abbildung 8:	Eine Vorbehandlung mit niedernanomolaren Konzentrationen von NW457 hat keinen Effekt auf die Induktion von Apoptose und/oder Nekrose nach Bestrahlung, verstärkt jedoch die basale sowie strahleninduzierte Seneszenz	32
Abbildung 9:	Die Überexpression der HSP90-Isoformen HSP90AA1 und HSP90AB1, ATR, ATM und/oder NBS1 in einer Untergruppe von Weichgewebssarkompatienten ist assoziiert mit einem verkürzten Gesamtüberleben.....	34

Abkürzungsverzeichnis

μ	Micro (10 ⁻⁶)
17-AAG	17-Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin, Tanespimycin
17-DMAG	17-Dimethylaminoethylamino-17-Demethoxygeldanamycin, Alvespimycin
5-FU	5-Fluorouracil
ADP	Adenosindiphosphat
ATM	Ataxia telangiectasia mutated protein
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Ataxia telangiectasia and RAD3-related protein
ATRIP	ATR interacting protein
BER	Base exzision repair
bp	Basenpaar
BRIP1	BRCA1 interacting protein C-terminal Helicase 1
BRCA1/2	Breast cancer type 1/2 susceptibility protein
BLM	Bloom Syndrome RecQ like Helicase
c-kit	Tyrosinkinase KIT, auch CD117
CD95	Cluster of differentiation 95, auch Fas (Fas)
CDK4/6	Cyclin-dependent kinase 4/6
CHK1/2	Checkpoint-Kinase 1/2
cm	Zentimeter
C-RAF	Auch RAF1, rapidly accelerated fibrosarcoma, oder rat fibrosarcoma protein 1
C12-FDG	5-Dodecanoylaminofluoreszein-di-β-Galactopyranosid
DCLRE1	DNA cross-link repair 1 C
DDR	DNA damage response
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNA-PK(cs)	DNA-dependent protein kinase (catalytic subunit)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSB	DNA double-strand break
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor

EGF-R	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
EXO1	Exonuclease 1
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FAK	Focal adhesion kinase
FCS	Fetal calf serum
FDG-PET-CT	FDG-Positronen-Emissions-Tomographie und Computertomographie
FEN1	Flap endonuclease 1
FGF	Fibroblast growth factor family
FI	Fluorescence intensity
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	Forward scatter
FU	Fluorescence units
GA	Geldanamycin
Gy	Gray [J/kg]
γ -H2AX	Phosphorylierte Variante des Histons H2AX
HDAC	Histone deacetylase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic acid
HR	Homologous recombination
HSP	Heat shock protein
hTERT	Human telomerase reverse transcriptase
H2AX	Variante des Histons H2A
IF	Immunofluoreszenz
IGF	Insulin-like growth factor
IGF-1R	Insulin-like growth factor-1 receptor
IR	Ionisierende Radiatio (Bestrahlung)
kDa	Kilodalton
Ku70/80	Ku-Protein-Dimer 70/80, auch XRCC6/XRCC5
Lig4	DNA Ligase 4
m	Milli (10^{-3})
M	Molar
MCD1	Mediator of DNA damage checkpoint protein-1
MDM2	Mouse double minute 2 homolog

min	Minute
MMP	Matrixmetalloproteasen
MRE11	(A) Meiotic recombination 11 homolog (A)
MRN	MRE11, RAD50, NBS1-Komplex
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
n	Nano (10^{-9})
NBS1	Nijmegen-breakage syndrome-1
NHEJ	Nonhomologous end-joining
nM	Nanomolar
PARP 1, 2	Poly(ADP-ribose)polymerase 1, 2
PBS	Phosphate buffered saline
PCA	Principal component analysis
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGF-R	Platelet-derived growth factor receptor
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
p53	Cellular tumor antigen 53, auch tumor suppressor 53
qPCR	Quantitative real-time PCR
R0, R1, R2	Chirurgische Resektionsgrade
RAD50	Recombinase A Homolog / DNA repair protein RAD50
RAD51	DNA repair and recombination protein RAD51-like
RAD54	DNA repair and recombination protein RAD54-like
RB 1	Retinoblastoma 1
RBBP8	RB binding protein 8
RNA	Ribonucleic acid
RPA1	Replication protein A1
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Radiotherapie
s	Sekunde
SA- β -Gal	Seneszenz assoziierte β -Galactosidase
SD	Standard deviation
SDS	Sodiumdodecylsulfat

SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standard error of the mean
SFM	Serum-freies Medium
SNP	Single nucleotide polymorphism
SSB	DNA single-strand break
SSC	Sideward scatter
SSX1-4	Synovial Sarcoma X Breakpoint 1-4
SYT	Synaptotagmins
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TNM	Tumor, Nodi lymphatici, Metastase, Klassifikation zur Tumorstadieneinteilung
TOPBP1	Topoisomerase binding protein 1
TP53	Tumor protein 53
u	Unit
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGF-R	Vascular endothelial growth factor receptor
vol	Volumen
vs.	versus
WHO	World Health Organization
XRCC1-4	X-ray cross complementing proteins 1-4

1 Einleitung

1.1 Weichgewebssarkome

Sarkome stellen eine sehr heterogene und seltene Entität innerhalb der Malignome dar. Weichgewebssarkome sind mesenchymalen, extraskelettalen Ursprungs und können aus verschiedenen Zellen des Muskel-, Fett-, Binde- oder Nervengewebes sowie der Blutgefäße entstehen (Cormier and Pollock 2004, Clark, Fisher et al. 2005). Sie stellen demnach eine sehr heterogene Entität unter den Malignomen dar. Sarkome lassen sich gemäß der aktuellen WHO-Klassifizierung von 2002 nach dem Grad der Differenzierung der Tumorzellen einteilen. Unterschieden werden adipozytische, fibroblastische oder myofibroblastische, fibriohistozytische, glatt- und skelettmuskuläre, vaskuläre, perizytische und chondroossäre Tumore (Schlag, Hartmann, Budach 2011). Sarkome sind im Vergleich zu Karzinomen verhältnismäßig selten und für etwa 1 % aller Krebserkrankungen im Erwachsenenalter und etwa 7 % der Krebserkrankungen im Kindesalter verantwortlich. Die Inzidenz liegt bei ca. 3-4 neuen Fällen pro 100.000 im Jahr (Zahm and Fraumeni 1997).

Die große Mehrheit der Sarkome entsteht sporadisch mit unbekannter Ätiologie (Helman and Meltzer 2003). Jedoch konnten in Sarkomzellen besonders häufig Mutationen in den Genen *Tumor protein 53* (TP53) oder *Retinoblastoma 1* (RB1) (Abramson, Ellsworth et al. 1984) festgestellt werden, die nicht in gesunden, nicht-malignen Zellen nachgewiesen werden konnten (Kruzelock and Hansen 1995). Sehr häufig handelt es sich hierbei auch um Mutationen in solchen Genen, die auch bei sarkom-assoziierten Syndromen verändert sind, allerdings dann auf Keimbahnebene (Stratton, Moss et al. 1990, Karpeh, Brennan et al. 1995).

Auf Grundlage der zytogenetischen Differenzierung können Sarkome heute in zwei Gruppen eingeteilt werden (Helman and Meltzer 2003):

- Sarkome mit wenigen tumor-spezifischen genetischen Veränderungen und einfachem diploidem Karyotyp.
- Sarkome mit variablen genetischen Veränderungen und komplexem aneuploidem Karyotyp, (überwiegender Anteil der der Weichgewebesarkome).

Synoviale Sarkome, Ewing Sarkome und Rhabdomyosarkome gehören der ersten Gruppe an. Synoviale Sarkome beispielsweise zeigen häufig eine t(X;18)(p11.2;q11.2) Translokation, die

die Gene *Synovial Sarcoma X Breakpoint* (SSX)1, 2 oder 4 und *Synaptotagmins* (SYT) involviert (Saito, Nagai et al. 2006). Gut differenzierte Liposarkome (sowie dedifferenzierte Liposarkome) zeigen gewöhnlich Chromosom 12-Amplifikationen (Prävalenz 80-90 %). Die koplifizierten Onkogene *cyclin-dependent kinase 4* (CDK4) und *mouse double minute 2 homolog* (MDM2) können hier sowohl als diagnostische Marker als auch als potenzielle pharmakologische Zielgene dienen (Muller, Paulsen et al. 2007, Singer, Socci et al. 2007, Sirvent, Coindre et al. 2007). Diese Tumoren mit einfacherem Karyotyp entstehen zumeist de novo und zeigen häufig nur eine einzige definierende zytogenetische Veränderung, die in aller Regel Wachstumsfaktoren, Tyrosinkinase-Proteine und Transkriptionsfaktoren betreffen (Taylor, Barretina et al. 2011).

Interessanterweise entstehen Sarkome mit komplexem Karyotyp hingegen häufig als Sekundärtumore nach einer Strahlentherapie. Häufige Mutationen finden sich in den p53- und RB-Signalwegen (Stratton, Moss et al. 1990). Eine typische Mutation in Sarkomen mit komplexem Karyotyp ist eine Amplifikation des MDM2-Gens, einem negativen Regulator von p53 (Oliner, Kinzler et al. 1992). Weiterhin konnten bei einige Sarkomarten auch epigenetische Veränderungen nachgewiesen werden; wie beispielsweise Promotormethylierungen (Seidel, Schagdarsurengin et al. 2007, Sadikovic, Yoshimoto et al. 2008, He, Aisner et al. 2009). Diese Variation an Karyotypen und Mutationen zeigt umso deutlicher, dass es kein ‚einzelnes‘ Zielprotein gibt, dessen Hemmung als Angriffspunkt für eine zielgerichtete Therapie dienen könnte. Vielmehr müsste, wie z.B. bei der HSP90-Inhibition, simultan eine ganze Reihe verschiedener Proteine angesprochen werden, um einen vielversprechenden Therapieansatz in der Sarkomtherapie gewährleisten zu können.

Therapie

Die operative Therapie steht im Mittelpunkt des multimodalen Konzepts zur Behandlung von Weichgewebstumoren. Die chirurgische Exzision strebt immer eine R0-Resektion an. Aufgrund der Ausdehnung und der Lage des Tumors ist dies jedoch nicht immer möglich, sodass die Resektion häufig mit adjuvanter und/oder neoadjuvanter Chemo- und Radiotherapie kombiniert wird. Die Lokalisation des Tumors ist ein entscheidender Faktor für die Wahl des optimalen Therapieverfahrens. (Steinau, Homann et al. 2001, Schaser, Melcher et al. 2004, Gilbert, Cannon et al. 2009).

Im Rahmen der Chemotherapie kommen u.a. Adriamycin, Cisplatin und Ifosfamid sowie molekular zielgerichtete Therapeutika wie *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR)-Antagonisten, *Tyrosinkinase KIT (c-kit)*–/*Platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR)- und *Vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR)-Inhibitoren (Imatinib, Sorafenib, Sunitinib, u.v.m.) zum Einsatz (Schlag, Hartmann, Budach 2011). Neben der Chemotherapie ist auch die Radiotherapie ein wesentlicher Teil der multimodalen Tumorthherapie. Die Strahlentherapie stellt bekannterweise eine etablierte Therapieoption für lokalisierte und lokal fortgeschrittene Tumore verschiedenster Entität dar (Tatokoro, Koga et al. 2015). Mehr als 60 % aller Krebspatienten erhalten nach heutigem klinischem Standard eine Strahlentherapie (Schlag, Hartmann, Budach 2011).

Adjuvante Radiotherapie

Schon früh konnte in einer Reihe von Studien gezeigt werden, dass eine unzureichende Tumoresektion (R1/R2) bei Sarkomen zu hohen Lokalrezidivraten von 60-90 % führt, die bei adäquater chirurgischer Therapie auf unter 10 % (0-28 %) gesenkt werden können (Sadoski, Suit et al. 1993, Dinges, Budach et al. 1994, Pisters, Harrison et al. 1996, Zagars, Ballo et al. 2003, Jebsen, Trovik et al. 2008). Eine postoperative Strahlentherapie kann hierbei auch bei mikroskopischen Tumorresten eine lokale Kontrollrate von 70-90 % unter weitgehendem Erhalt der Funktion erzielen (Cheng, Dusenbery et al. 1996, Pollack, Zagars et al. 1998, Jebsen, Trovik et al. 2008). Weltweit vergleicht nur eine Studie die Amputation mit Extremitäten-erhaltender Operation und postoperativer Strahlentherapie. In dieser Studie konnte kein signifikanter Unterschied im tumorfreien – sowie im Gesamtüberleben nach 5 Jahren nachgewiesen werden (Rosenberg, Tepper et al. 1982, Yang and Rosenberg 1989), sodass heute, falls möglich, primär eine funktionserhaltende, operative Therapie in Kombination mit Radio- und/oder Chemotherapie angestrebt wird (Schlag, Hartmann, Budach. 2011. Weichgewebetumoren Interdisziplinäres Management. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag).

Daten der *Scandinavian Sarcoma Group* zeigen, dass in den Jahren von 1986 bis 2005 der Einsatz der Strahlentherapie von 28 % auf 53 % gestiegen ist, wohingegen die Zahl der weiten Resektionen weitgehend unverändert blieb (57 % vs. 52 %). Die Lokalrezidivrate konnte in diesem Zeitintervall von 27 % auf 15 % gesenkt werden (Jebsen, Trovik et al. 2008). Vor allem die Studien von Yang et al. (1998) und Pisters et al. (1996) konnten einen Vorteil für die postoperative Bestrahlung (perkutane Strahlentherapie bzw. Brachytherapie) nach Tumoresektion nachweisen (Pisters, Harrison et al. 1996, Yang, Chang et al. 1998).

Neoadjuvante Strahlentherapie

Therapeutische Ziele der neoadjuvanten Strahlentherapie sind die Tumorverkleinerung und damit die verbesserte Resektabilität, die potentiell verringerte Dissemination von vitalen Tumorzellen bei der chirurgischen Exzision, ein verringertes Bestrahlungsvolumen im Vergleich zur postoperativen Bestrahlung und damit die Reduzierung von Akuttoxizität und Langzeitmorbidität für den Patienten (Schlag, Hartmann, Budach 2011).

Die Studienlage ist hier allerdings nicht ganz eindeutig. Cheng et al. (1996) sowie O'Sullivan et al. (2002) erzielten für präoperative und postoperative Bestrahlung mit lokalen Kontrollraten von über 90 % gleich gute Ergebnisse nach 5 Jahren (Cheng, Dusenbery et al. 1996, O'Sullivan, Davis et al. 2002). Barkley et al. (1988) hingegen beschrieben eine 100%ige Resektabilität nach präoperativer Bestrahlung mit 50 Gy bei 114 Patienten mit ausgedehnten bzw. hochmalignen Sarkomen (Barkley, Martin et al. 1988).

1.2 HSP90 in der multimodalen Tumorthherapie

Tumorzellen sind in verschiedener Hinsicht einem – im Vergleich zu nicht malignen Zellen - erhöhten Stressniveau ausgesetzt. Eine elegante Strategie könnte demnach ein Eingreifen in die grundlegenden Mechanismen zur Stresskompensation in malignen Tumorzellen sein. Zellen reagieren auf ein erhöhtes Stresslevel mit der Synthese einer Reihe verschiedener Chaperonmoleküle, wie beispielsweise der Hitzeschockproteine 90 (HSP90) und 70 (HSP70). Hitzeschockproteine assistieren bei der Faltung von Proteinen und verhindern dadurch unerwünschte Nebenreaktionen in der Proteinsynthese, wie beispielsweise die unspezifische Aggregation un- oder fehlgefalteter Proteine. In den letzten Jahren erwies sich insbesondere HSP90 als essenzieller Faktor für das Überleben von Tumorzellen. Die Expression von HSP90 ist in malignen Zellen (im Vergleich zu nicht malignen Zellen) 2- bis 10-fach erhöht, was darauf hinweist, dass es von besonderer Wichtigkeit für das Wachstum und das Überleben von Tumorzellen sein könnte (Isaacs, Xu et al. 2003). Durch eine HSP90-Inhibition wird pharmakologisch eine ähnliche Reaktion hervorgerufen wie durch Hyperthermie (Lindner, Angele et al. 2014). Da diese in der Behandlung der Sarkome bereits erfolgreich Anwendung findet, bietet sie einen vielversprechenden Ansatz in einem multimodalen Therapiekonzept.

Die molekulare Chaperonfunktion von HSP90

HSP90 ist ein Adenosintriphosphat (ATP)-abhängiges Chaperon mit einem Molekulargewicht von 90 kDa, das an der Erhaltung der Homöostase der intrazellulären Proteine beteiligt ist (Talpale, Jarosz et al. 2010). HSP90 ist sowohl für Faltung neu synthetisierter Proteine als auch für die Rückfaltung destabilisierter Proteine verantwortlich (Freeman and Morimoto 1996, Picard 2002). Weiterhin wird durch HSP90 die Aktivität, Stabilität und intrazelluläre Lokation diverser Klientenproteine (s.o.) kontrolliert (Young, Agashe et al. 2004). Ferner werden fehlgefaltete Proteine durch die Aktivität von HSP90 der Ubiquitylierungsmaschinerie und in Folge dem Abbau durch das 26S Proteasom zugeführt (Connell, Ballinger et al. 2001, Xu, Marcu et al. 2002).

Das Protein HSP90 besteht aus drei Domänen: einer N-terminalen Domäne mit ATPase-Aktivität, einer mittleren Domäne zur temporären Interaktion mit Klientenproteinen sowie einer C-terminalen Domäne, die eine alternative ATP-Bindestelle bietet und an der Dimerisierung der Moleküle beteiligt ist (Prodromou and Pearl 2003). Die Chaperon-Aktivität von HSP90 ist abhängig von einer transienten Dimerisierung, der N-terminalen Domänen, welche die intrinsische ATPase-Aktivität dieser Domänen verstärkt (Prodromou, Panaretou et al. 2000). Die eigentliche Chaperon-Aktivität von HSP90 wird erst durch diese Hydrolyse von ATP ermöglicht (Obermann, Sondermann et al. 1998, Panaretou, Prodromou et al. 1998), da dadurch eine Konformationsänderung des HSP90 induziert wird (Csermely, Kajtar et al. 1993). Abbildung 4 zeigt ein vereinfachtes Modell des Chaperon-Zyklus. Findet dieser ATP-abhängige Schritt nicht statt, zum Beispiel aufgrund pharmakologischer Inhibition, so werden die HSP90-Klientenproteine ubiquityliert und proteasomal abgebaut (Mimnaugh, Chavany et al. 1996, Xu, Marcu et al. 2002). Die ATPase-Aktivität von HSP90 wird zum einen durch die Assoziation von Co-Chaperonen zum anderen durch die Bindung der Klientenproteine reguliert (Karzai and McMacken 1996, Laufen, Mayer et al. 1999, Young and Hartl 2000, McLaughlin, Smith et al. 2002, Siligardi, Panaretou et al. 2002).

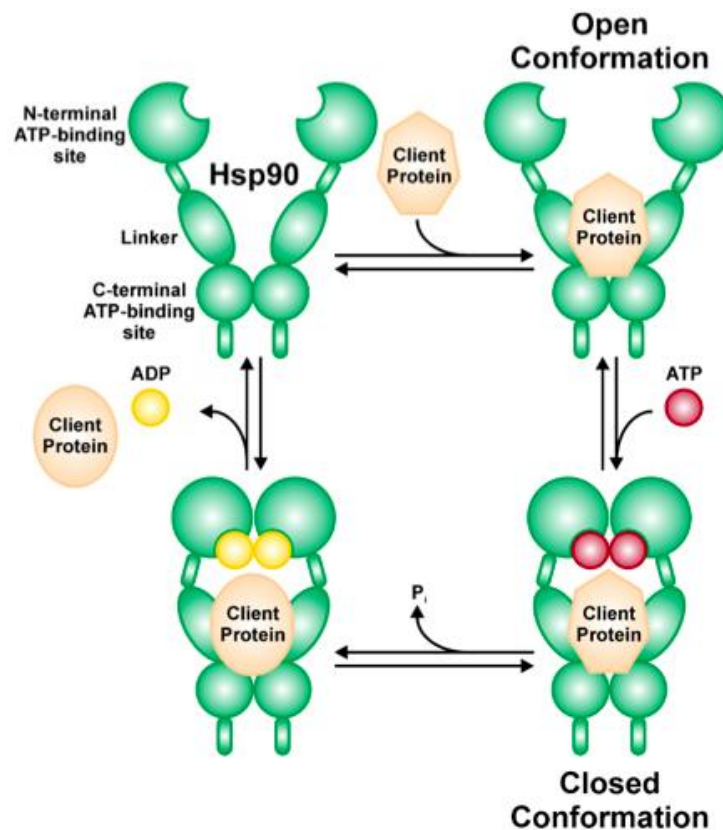


Abbildung 1: Die Chaperonfunktion von HSP90.

Das ungefaltete oder fehlerhaft gefaltete Klientenprotein bindet an die zentrale Bindedomäne des HSP90-Homodimers, das funktionell in einem Multiproteinkomplex mit anderen Hitzeschockproteinen und Co-Chaperonen (hier nicht dargestellt) vorliegt. Durch Bindung von ATP an die N-terminale Domäne und dessen folgender Hydrolyse ergibt sich eine Konformationsänderung des HSP90 von einer offenen hin zu einer geschlossenen Konformation. HSP90 katalysiert die Faltung des Klientenproteins, das nun wieder aus dem Chaperonkomplex freigegeben wird. Entnommen von Lauber, Brix et al. (Lauber, Brix et al. 2015).

Die HSP90-Klientenproteine ATM, ATR und NBS1 und ihre Bedeutung in der DNA-Reparatur

Ionisierende Strahlung ruft Schädigungen der zellulären DNA (vornehmlich in Form von Doppelstrangbrüchen (DSBs)) hervor, welche die Aktivierung eines komplexen Systems zur Erkennung und Reparatur dieser Schädigungen, der sogenannten DNA-Schadensantwort, bewirken. In Abhängigkeit vom jeweiligen Ausmaß der Schädigung kann dies entweder zu einem vorübergehenden oder zu einem permanenten Zellzyklusarrest und/oder zum Zelltod führen (Lauber, Ernst et al. 2012). Tumorzellen verfügen im Vergleich zu gesunden Zellen meist über ein geringeres Repertoire an DNA-Reparaturmechanismen. Maligne Zellen sind aufgrund des erhöhten Stressniveaus im besonderen Maße von einer funktionalen DNA-Schadensantwort ab-

hängig und damit im Vergleich zu nicht-malignen Zellen anfälliger für eine Inhibition verschiedener Faktoren der DNA-Reparatur (Brown, O-Carrigan et al. 2017). Für die Reparatur geschädigter DNA sind grundsätzlich drei Schritte entscheidend: zum einen die Detektion des DNA-Schadens, zum anderen die Kontrolle des Zellzyklus sowie der Genexpression (Transkription) und schließlich die Einleitung der DNA-Reparatur.

DDR- Sensorproteine detektieren und lokalisieren DNA-Schäden und induzieren die Aktivierung verschiedener Reparaturmechanismen. Ein bereits bekannter Sensor für DNA-Schäden ist das Protein *Poly(ADP-Ribose) Polymerase* (PARP), der eine wichtige Rolle in der *DNA base excision repair* (BER), der Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen und auch in der Reparatur von DSB mittels *alternative Non-homologous end-joining* (alt-NHEJ) spielt (Caldcott 2014, Frit, Barboule et al. 2014). Jedoch stellen im Falle von DSB die beiden Proteine Ku (ein Heterodimer aus Ku70/Ku80) und der MRN-Komplex (*Meiotic recombination 11 homolog* (MRE11)/ *Recombinase A Homolog 50* (RAD50)/ *Nibrin* (NBS1)) die prädominanten Sensorproteine dar. Ku bindet binnen Sekunden an DSB und bietet so eine Plattform für die DNA-Reparaturfaktoren des *classic* (c-)NHEJ. Der MRN-Komplex hingegen aktiviert das Signalprotein *Ataxia-telangiectasia Mutated* Kinase (ATM), sodass eine die DNA-Reparatur mittels *Homologous recombination* (HR) initiiert wird. Verschiedene Faktoren wie z.B. Transkriptionsstatus, das Ausmaß der Resektion der freien DNA-Enden oder die aktuelle Phase des Zellzyklus sind ausschlaggebend für die Wahl des DNA-Reparaturmechanismus, HR versus NHEJ und werden aktuell intensiv untersucht (Ceccaldi, Rondinelli et al. 2015, Lemaitre, Soutoglou 2014).

DDR-Signalproteine initiieren und koordinieren Auswahl und den Ablauf der verschiedenen Reparaturmechanismen, aktivieren *Zellzyklus-Checkpoints* und können bei zu großem Schaden auch den Übergang in Apoptose oder Seneszenz einleiten (Jackson, Bartek 2009). Die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen wird vor allem durch die Signalproteine ATM, ATR sowie die *DNA-dependent serine/threonine protein kinase catalytic subunit* (DNA-PKcs) koordiniert (Brown, O-Carrigan et al. 2017).

Das NHEJ stellt den dominanten Weg der Reparatur von DSB in humanen Zellen dar, und kann in jeder Phase des Zellzyklus stattfinden. Für die Einleitung des NHEJ ist die *DNA-dependent serine/threonine protein kinase* (DNA-PK), bestehend aus Ku und DNA-PKcs, von essenzieller Bedeutung. Ku bindet hier im Bereich des DSB an die DNA und rekrutiert die DNA-PKcs. Dieser Komplex schützt die freien DNA-Ende vor dem enzymatischen Abbau und aktiviert verschiedene Proteine zur DNA-Reparatur mittels NHEJ, darunter beispielsweise X-

ray cross complementing proteins 4 (XRCC4) und *DNA-Ligase 4* (LIG4) (Jette, Lees-Miller 2015, Davis, Chen 2013, Ochi, Blackford et al. 2015).

Das HSP90-Klientenprotein ATM wird zunächst durch den *Meiotic recombination 11 homolog* (MRE11)/ *Recombinase A Homolog 50* (RAD50)/ *Nibrin* (NBS1) (MRN)-Komplex an DSBs rekrutiert und phosphoryliert dort die Histon H2-Variante H2AX, was als Interaktionsplattform für weitere Faktoren der DNA-Reparatur dient (Shiloh 2006). *Mediator of DNA damage checkpoint protein-1* (MDC1) bindet an γ H2AX (Stucki, Clapperton et al. 2005), was durch die Rekrutierung zahlreicher weiterer H2AX-Histone zu einer Signalverstärkung führt. Diese Anreicherungen von H2AX-Histonen können als „Foci“ der aktiven DDR visualisiert werden. (Rogakou, Boon et al. 1999) Dies führt zur Rekrutierung und Aktivierung verschiedener DDR-Mediatorproteine. Des Weiteren aktiviert ATM die *Checkpoint kinase 2* (CHK2), die eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des G1-S-Phase-Checkpoints spielt. Darüber hinaus führt ATM durch die Inhibition des proteosomalen Abbaus durch *Mouse double minute 2 homolog* (MDM2) zur Stabilisierung von p53. (Siloh, Ziv 2013)

Im Gegensatz zu DNA-PK und ATM wird ATR (ebenfalls ein HSP90-Klientenprotein) durch *Replication protein A* (RPA)-gebundene DNA-Einzelstränge aktiviert. (Costanzo, Shechter et al. 2003) ATR wird dabei durch seinen obligaten Bindungspartner *ATR-interacting protein* (ATRIP) rekrutiert und durch verschiedene Faktoren (unter anderem durch *Topoisomerase binding partner 1* (TOPBP1) aktiviert. (Maréchal, Zou 2013) Das wohl bekannteste Substrat von ATR ist die *Checkpoint kinase 1* (CHK1), einem wichtigen Regulator der G2-M-Phase- und der Intra-S-Phase-Checkpoints. (Stracker, Usui et al. 2009).

Neben ATM, ATR und dem MRN-Komplex sind eine ganze Reihe weiterer Proteine am Prozess der DNA-Schadensreparatur beteiligt, für die eine Abhängigkeit von HSP90 beschrieben ist. Darunter fallen neben DNA-Pkcs, Ku70, Ku80, RAD51, RAD54, Ligase IV, XRCC4, und *Poly(ADP-ribose)polymerase-1* (PARP-1) auch Proteine, wie das *Breast cancer type 1 susceptibility protein* (BRCA1), *Breast cancer type 2 susceptibility protein* (BRCA2) (Shrivastav, De Haro et al. 2008, Lamarche, Orazio et al. 2010, Tichy, Vavrova et al. 2010).

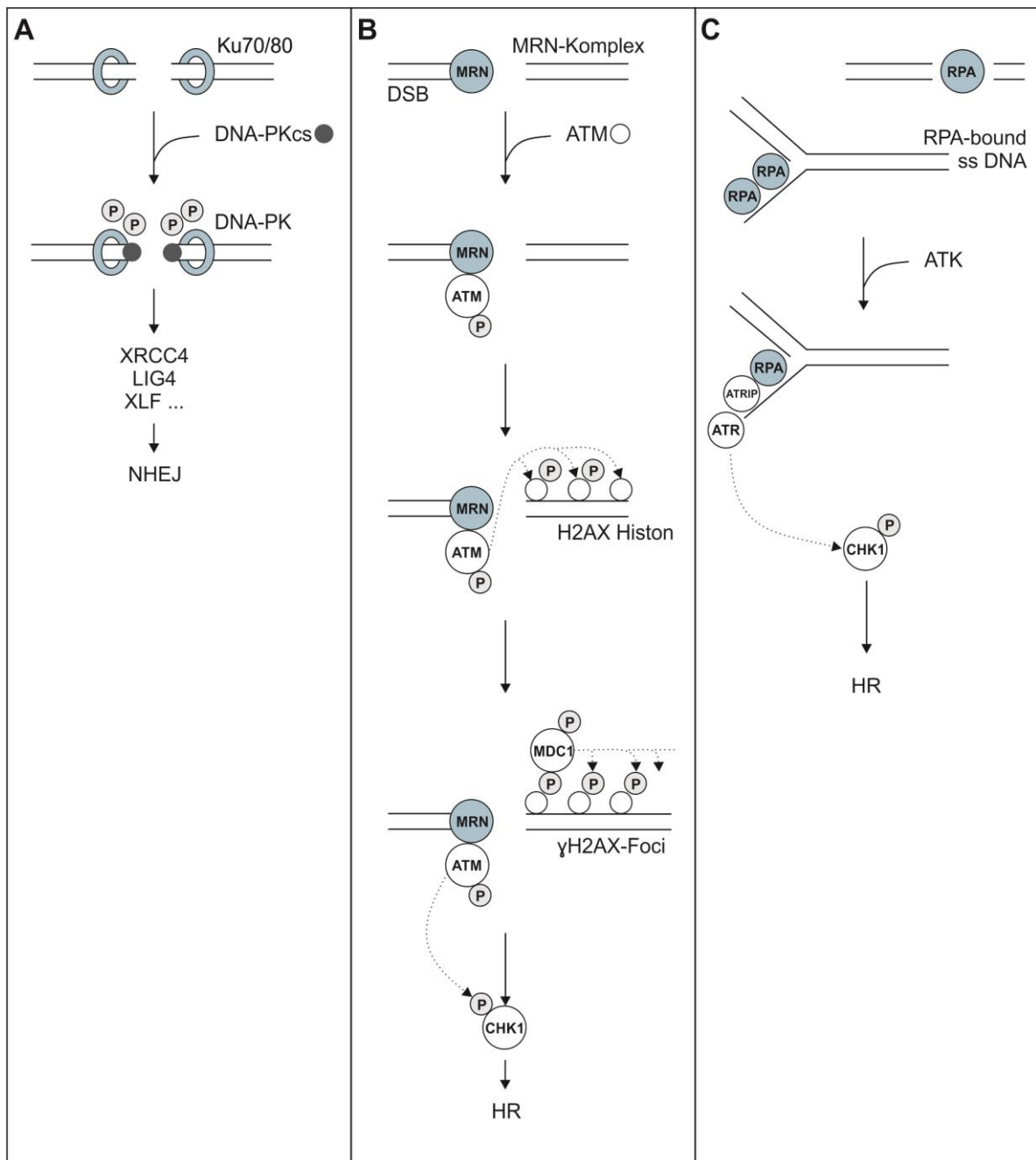


Abbildung 2: Initiierung und Koordination ausgewählter DNA-Reparaturmechanismen.

- (A) Ku70/80 bindet an DNA DSB und rekrutiert DNA-PKcs (zusammen bilden sie die DNA-PK). Die Autophosphorylierung der DNA-PK induziert eine Konformationsänderung und ermöglicht so die Initiierung der NHEJ-Reparatur.
- (B) Der MRN-Komplex dient als Sensor für DSB und rekrutiert ATM, das durch Interaktion mit NBS1/MRN-Komplex aktiviert wird. ATM wiederum ist verantwortlich für die Phosphorylierung der H2AX-Histone an Serin 139 (bekannt als γ H2AX). MDC1 bindet an γ H2AX und führt zur Rekrutierung weiterer H2AX-Histone und damit zur Signalverstärkung. Dies führt zur Aktivierung DDR-Mediatorproteine und zur Initiierung der DNA-Reparatur insb. via HR. Das ATM-Substrat CHK2 induziert eine Aktivierung der G1-S-Phase- und Intra-S-Phase-Checkpoints.
- (C) ATR wird durch RPA-gebundene DNA-Einzelstränge aktiviert. Die ATR-CHK1-Kaskade führt zur Aktivierung des G2-M-Phase-Checkpoints.

Abbildung entnommen und modifiziert aus Brown, O’Carrigan et al. 2017.

HSP90-Inhibition in Kombination mit Radiotherapie

Ein vielversprechender Ansatz für die Erhöhung der Effektivität der Strahlentherapie, ohne zugleich deren Wirkung auf gesundes Gewebe zu verstärken, könnte eine tumorspezifische pharmakologische Radiosensibilisierung sein (Gandhi, Wild et al. 2013). Die Strahlenresistenz von Tumorzellen wird jedoch vielmehr durch eine ganze Reihe verschiedener Faktoren und Signalwege vermittelt, als nur durch einzelne Proteine. Die Inhibition von HSP90 stellt aus diesem Grund einen besonders interessanten Therapieansatz dar, da multiple Signalwege und Faktoren simultan adressiert werden können (wie bspw. *Phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K)-Akt-mTOR, ATM, ATR und CHK1) (Lauber, Brix et al. 2015, Gandhi, Wild et al. 2013).

HSP90-Inhibitoren im Überblick

Geldanamycin ist ein benzoquinoides Ansamycin, d.h. ein natürlich vorkommender Wirkstoff, der durch das Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* produziert wird. 1994 beschrieben Whitesell und Kollegen die spezifische Bindung von Geldanamycin an HSP90 sowie dessen anti-tumorale Aktivität (Whitesell, Mimnaugh et al. 1994, Supko, Hickman et al. 1995). Die klinische Anwendbarkeit von Geldanamycin war jedoch aufgrund hoher Hepatotoxizitätswerte in therapeutischen Dosierungen stark limitiert (Supko, Hickman et al. 1995). Aus diesem Grund wurden vermehrt synthetische Derivate wie 17-Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin (17-AAG/Tanespimycin) und 17-Dimethylaminoethylamino-17-Demethoxygeldanamycin (17-DMAG/Alvespimycin) entwickelt, diese fanden jedoch trotz vielversprechender Wirksamkeit als Chemotherapeutika nie Einzug in den klinischen Alltag.

Einer der ersten Kandidaten der sogenannten zweiten Generation der HSP90-Inhibitoren, der in klinische Studien untersucht wurde, war BIIB021 (Biogen), ein synthetischer Wirkstoff basierend auf einem Puringerüst (Grenert, Sullivan et al. 1997, Stebbins, Russo et al. 1997, Fukuyo, Hunt et al. 2010, Saif, Takimoto et al. 2014). Die derzeit am intensivsten beforschten Wirkstoffe der zweiten Generation sind STA-9090 (Ganetespib, Synta Pharmaceuticals) und AUY922 (NVP-AUY922, Novartis), deren anti-tumorigenes Potenzial (sowohl in monotherapeutischen Ansätzen wie auch in Kombination mit anderen Therapieformen, beispielsweise Bestrahlung) derzeit in präklinischen und in klinischen Studien untersucht wird (Eccles, Massey et al. 2008, Jensen, Schoepfer et al. 2008, Lin, Bear et al. 2008, Gaspar, Sharp et al. 2010, Stingl, Stuhmer et al. 2010, Moser, Lang et al. 2012, Shimamura, Perera et al. 2012, Zaidi, McLaughlin et al. 2012, Okui, Shimo et al. 2013, Hendriks and Dingemans 2017, Felip, Barlesi et al. 2018).

Ein weiterer HSP90-Inhibitor, genannt Radicol (Monorden), welcher ursprünglich aus dem Pilz *Monosporium bonorden* isoliert worden war (Delmotte and Delmotte-Plaque 1953, Kwon, Yoshida et al. 1992), weist eine ähnliche biologische Aktivität wie Geldanamycin, auf, da er ebenfalls mit der N-terminalen ATP-Bindestelle von HSP90 interagiert (Schulte, Akinaga et al. 1998). Da Radicol keine Hydroquinon-Einheit besitzt, besitzt es eine signifikant niedrigere Hepatotoxizität als Geldanamycin (Johnson, Singh et al. 2010, Kinzel, Ernst et al. 2016), jedoch zeichnet es sich durch ungünstige pharmakokinetischen Eigenschaften (unter anderem durch eine niedrige metabolische Stabilität) aus.

Aktuell wird Novobiocin, das als Aminocumarin als Antibiotikum eingesetzt wird, in präklinischen Studien untersucht. Zunächst als DNA-Gyrase-Inhibitor entwickelt hemmt es die ATP-Hydrolyse und bindet an die C-terminale ATP-Bindestelle von HSP90 (Donnelly and Blagg 2008, Terracciano, Russo et al. 2018). Auch NCT-50, ein Novobiocin-Deguelin-Analogon, zeigt in präklinischen Untersuchungen vielversprechende Ergebnisse (Hyun, Le et al. 2018).

NW457 – ein Pochoxim-basierter HSP90-Inhibitor

Das Labor von Prof. Winssinger (Abteilung für Organische Chemie, Universität Genf, Schweiz) entwickelte eine Serie verschiedener Radicol-verwandter, Pochoxim-basierter HSP90-Inhibitoren mit verbesserten pharmakologischen und pharmakokinetischen Eigenschaften bei vergleichbarer Effizienz (Barluenga, Wang et al. 2008, Barluenga, Fontaine et al. 2009, Wang, Barluenga et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit sollte die anti-tumorale und radiosensibilisierende Wirksamkeit von NW457 – einem der vielversprechendsten Wirkstoffe innerhalb dieser Serie – in Zellen von Weichgewebssarkomen untersucht werden.

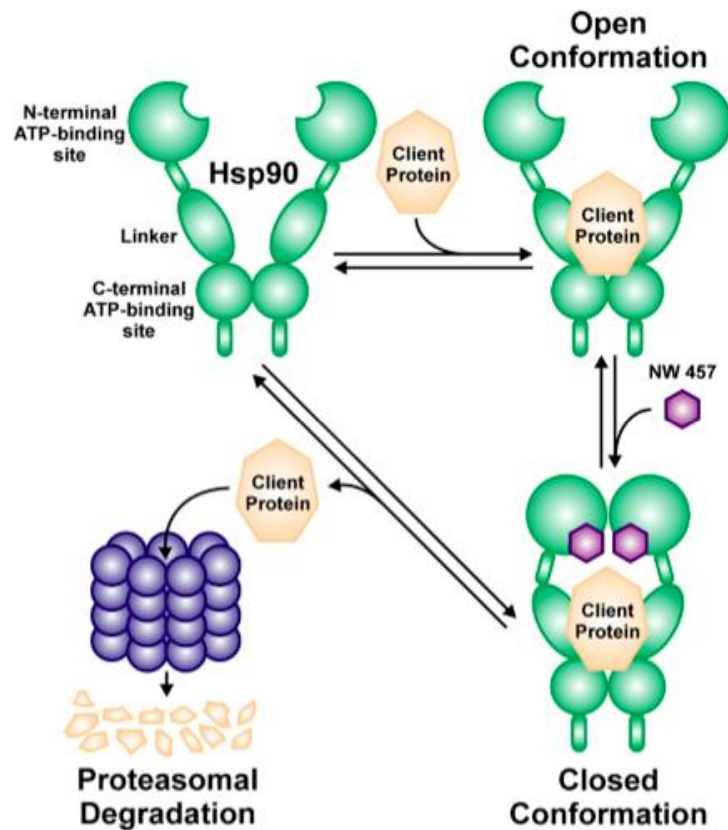


Abbildung 3: Schematisches Modell der Chaperonfunktion von HSP90 in Gegenwart des HSP90-Inhibitors NW457.

Fehl- oder ungefaltete Klientenproteine binden an die zentrale Bindedomäne des HSP90-Homodimers, die funktionell in einem Multikomplex mit anderen Hitzeschockproteinen und Co-Chaperonen (hier nicht abgebildet) vorliegt. Wenn pharmakologische HSP90-Inhibitoren, in diesem Fall NW457, an die N-terminale ATP-Bindestelle von HSP90 binden, so verhindert dies kompetitiv die Bindung von ATP und damit die Faltung/Maturierung des Klientenproteins. Dieses dissoziiert daraufhin in ungefalteter Form vom Chaperonkomplex und wird aufgrund seiner fehlenden bzw. fehlerhaften Funktionalität der proteasomalen Degradierung zugeführt. Entnommen von Lauber, Brix et al. 2015 (Lauber, Brix et al. 2015).

2 Zielsetzung

„Die Strahlentherapie spielt in der multimodalen Therapie von Weichgewebssarkomen eine essenzielle Rolle. Ein Grund für das Nichtansprechen auf die Strahlentherapie kann eine intrinsische Strahlenresistenz der Tumorzellen sein. Bisher wurde die Radiosensitivität von Sarkomen jedoch nicht systematisch charakterisiert. Von daher sind weder geeignete Biomarker noch Kandidaten für molekular zielgerichtete Therapien verfügbar.

Ziel dieser Arbeit war daher eine systematische Analyse der Strahlenresistenz anhand einer Reihe von verschiedenen humanen Weichgewebssarkom-Zelllinien. Mittels Dimensionsreduktion sollte ein ausgewogener und gleichzeitig belastbarer Score der Radioresistenz extrahiert werden und dessen Korrelation mit Transkriptomdaten von bekannten Regulatoren der DNA-Schadensantwort untersucht werden – mit dem Ziel der Identifizierung molekularer Marker der Strahlenresistenz. Im Anschluss sollte die funktionelle Relevanz von ausgewählten Kandidaten mittels pharmakologischer Inhibitionsversuche charakterisiert werden. Im Abgleich unserer Daten mit den Daten der TCGA- Weichgewebssarkom-Kohorte sollte abschließend eine Assoziation der Marker-Kandidaten mit der Gesamtüberlebenszeit von Weichgewebssarkom-Patienten geprüft werden“ (Ernst, Anders et al. 2015)

(Kapitel entnommen, modifiziert und ins Deutsche übersetzt aus: Ernst, Anders, Kapfhammer et al. 2015)

3 Material und Methoden

„Zelllinien und Reagenzien

Die humanen Weichgewebssarkomlinien HT-1080, TE-671, SW-872, SW-982, HS-729 und A-673 wurden direkt von Cell Lines Service (CLS, Heidelberg, Deutschland) erhalten. Kultiviert wurden die Zellen in DMEM, supplementiert mit 10 % Hitze-inaktiviertem FCS, 100 units/ml Penicillin sowie 0,1 mg/ml Streptomycin (alle von Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), bei 37 °C und 7,5 % CO₂. Die Authentizität der Zelllinien wurde mittels STR-Typisierung (Auftragsservice DSMZ, Braunschweig) sichergestellt. Der p53-Status der Zelllinien wurde mittels cDNA-Sequenzierung ermittelt (Hennel, Brix et al. 2014).

Der Pochoxim-basierte HSP90-Inhibitor NW457 (6-OH-Pochoxim C) wurde bereits in der Einleitung beschrieben (Barluenga, Wang et al. 2008). Gearbeitet wurde mit einer 10 mM Stock-Lösung in DMSO, die in Aliquots bei -20 °C gelagert wurden. Alle anderen Reagenzien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

Bestrahlung der Zelllinien

Die Zelllinien wurden mit den angegebenen Dosen mit einem RS225 Röntgen-Bestrahlungskabinett (X-Strahl, Camberley, Großbritannien; 200 kV und 10 mA, Thoraeus Filter, 1 Gy pro 63 s) bestrahlt.

Klonogenes Überleben

Das klonogene Überleben von Sarkomzellen nach Bestrahlung wurde mittels Koloniebildungsassays bestimmt. Hierzu wurden die Zellen als Einzelzellsuspension in *6-well*-Platten in aufsteigender Konzentration (200 bis 160.000 Zellen pro Kavität) ausgesät, so dass nach Ende der Inkubationszeit (abhängig von der Behandlung) 20 bis 150 Kolonien pro Kavität vorlagen. Nach vierstündiger Adhärenz wurde das Medium ersetzt und die Zellen entweder sofort bestrahlt, oder für 24 Stunden mit 10 nM NW457 vorbehandelt. Nach diesen 24 Stunden wurde das NW457-haltige Medium durch NW457-freies Kulturmedium ersetzt und die Zellen mit den angegebenen Dosen bestrahlt. In den folgenden 14 Tagen wurde die Koloniebildung abgewartet. Die Zellen wurden mittels 80 % Ethanol und 0,3 % Methylenblau fixiert und gefärbt. Bei der Auszählung wurden nur solche Kolonien berücksichtigt, die mehr als 50 Zellen umfassten.

Der prozentuale Anteil überlebender Zellen wurde errechnet und auf die jeweilige Plattierungseffizienz normiert.

Quantitative Realtime RT-PCR (qRT-PCR)

Die Erstellung von Transkriptomprofilen (*Transcriptomic profiling*) von Genen der DNA-Schadensantwort erfolgte mittels qRT-PCR (Wagner, Lindau et al. 2011, Harre, Keppeler et al. 2012). Die in den Zellen enthaltene RNA wurde mittels NucleoSpin RNA II Kit (Macherey & Nagel, Dueren, Deutschland) extrahiert. Für die reverse Transkription wurden 1 µg isolierte RNA und 200 u *RevertAid reverse transcriptase* verwendet. Im Folgenden wurden 50 µM *random hexamers*, 5 µM Oligo(dT)₁₈-Primer, 400 µM dNTPs sowie 1,6 u/µl *Ribolock RNase inhibitor* (alle Reagenzien von Fermentas, jetzt Thermofisher, Deutschland) zugegeben. Die daraus erhaltene cDNA wurde in Gegenwart von 300 nM *Primer* (siehe Tabelle 1, Anhang) in 1x *Maxima SYBR Green qPCR Mastermix* (Fermentas, jetzt Thermofisher) und einem standardisiertem *Cycling*-Protokoll (10 min 95 °C, 45x (15 s 95 °C, 30 s 60 °C)) auf einer LC480 qPCR-Plattform (Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland) amplifiziert. Quantifiziert wurden die Expressionslevels der Zielgene mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Als Referenz diente dabei eine Matrix aus 18S rRNA, δ -Amino-Lävulinat-Synthase und $\beta 2$ -Mirkoglobulin. Die relativen Expressionslevels wurden auf das mittlere Expressionslevel aller Zelllinien kalibriert. Durch die Verwendung von zwei verschiedenen cDNA-Mengen (4 ng und 20 ng) wurde eine Effizienzkorrektur vorgenommen. Pro Zelllinie wurden drei biologische Replikate analysiert.

Viabilitätsassay

Die zelluläre Viabilität wurde mit Hilfe eines AlamarBlue[®]-Reduktionsassays ermittelt (Bio-Rad Laboratories GmbH, Freiburg, Deutschland). Es wurden 4-5 x 10³ Zellen je Kavität in einer 96-well-Platte ausgesät und eine vierstündige Adhärenz-Zeit abgewartet. Die Zellen wurden einer Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von NW457 ausgesetzt, für 24 Stunden inkubiert und anschließend mit den angegebenen Dosen bestrahlt. Im Folgenden wurde das NW457 enthaltende Medium durch 10 % AlamarBlue-Reagenz enthaltendes Medium ersetzt und die Zellen wurden für 1–7 Stunden bei 37 °C inkubiert. Mithilfe eines *Microplate Readers* (Synergy Mx, BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) wurde anschließend die Fluoreszenz gemessen (Anregung 560/9nm, Emission 590/9nm). Die Daten wurden auf Basis unbehandelter Kontrollen (entsprechend 100 % Viabilität) kalibriert.

γ -H2AX-Immunfluoreszenzfärbung

Für die zeitaufgelöste Darstellung des Erscheinens und Verschwindens von phosphoryliertem Histon H2AX (γ -H2AX- *DNA damage repair foci*) wurden $3\text{-}5 \times 10^4$ Zellen pro Kavität in 24 *well*-Platten ausgesät und über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 20 nM NW457 behandelt und anschließend mit 2 Gy bestrahlt, oder blieben unbehandelt.

Nach der jeweils angegebenen Zeit wurden die Zellen in phosphatgepufferter Saline (*phosphate-buffered saline*, PBS) gewaschen und mit 3,7 % isotonischer Paraformaldehydlösung (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) + 0,1 % Triton-X-100 für 10 Minuten fixiert. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurden die Zellen 5 Minuten mit 0,5 % Triton X-100-PBS-Lösung behandelt. Unspezifische Bindestellen wurden mittels 3%iger Rinderserum-Albumin + 0,1 % Triton X-100-PBS-Lösung (über Nacht bei 4 °C) blockiert. Zur Färbung wurde ein muriner anti- γ -H2AX-Antikörper (Merck Millipore) verwendet. Die Zellen wurden über 3 Stunden bei Raumtemperatur mit dem Antikörper gefärbt, danach mit PBS + 0,1 % Triton X-100 gewaschen und mit *Alexa 488*-gekoppelten *anti-mouse-IgG*-Antikörpern (ThermoFisher, Karlsruhe) und Hoechst 33342 (2 $\mu\text{g/ml}$) für 45 Minuten gegengefärbt. Nach 4-maligem Waschen in PBS + 0,1 % Triton X-100 wurden die Deckgläser auf Objektträger (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) aufgesetzt und eingedeckelt. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde an einem inversen Epifluoreszenzmikroskop vom Typ Zeiss AxioObserver Z1 durchgeführt, das mit einem Zeiss LCI Plan-Neofluar 63x/1,3 Glycerin Objektiv, AxioVision 4.6 Software sowie einer AxioCam MR Rev3 Kamera (Carl Zeiss, Jena, Germany) ausgestattet war. Für die Hoechst 33342-Färbung wurde ein BP 365/12-Filter eingesetzt und für die *Alexa 488*-Färbung ein BP 470/40-Filter (beides ebenfalls von Carl Zeiss). Es wurden Bilderstapel (25 *Stacks* mit einem Abstand von jeweils 250 nm aufgenommen und mit Hilfe der AxioVision 4.6 Software dekonvoliert.

Durchflusszytometrische Messung der Plasmamembranintegrität, der apoptotischen DNA-Fragmentierung und der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase-Aktivität

Alle durchflusszytometrischen (FACS – *fluorescence-activated cell sorting*) Experimente wurden an einem LSRII Zytometer (BD Biosciences) durchgeführt, die hierbei erhobenen Daten wurden mittels FACSDiva (BD Biosciences) oder FlowJo 7.6.5 Software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) analysiert. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden 3×10^4 Zellen je Kavität in eine 24-*well*-Platte ausgesät und eine Adhärenzzeit von 4 Stunden gewährleistet. Die

Zellen wurden für 24 Stunden einer Behandlung mit 0 bis 625 nM NW457 ausgesetzt und anschließend mit 0 bis 6 Gy bestrahlt. 48 Stunden nach der Bestrahlung wurden Induktion von Nekrose, Apoptose und Seneszenz analysiert.

Die Induktion von Nekrose wurde mittels *Propidiumiodid (PI)–Exclusion-Assay* quantifiziert. *Propidiumiodid* ist ein Nukleinsäure-Interkalator und kann die Zellmembran toter Zellen aufgrund deren Fragmentierung von Membranen durchdringen. Die Zellen wurden dazu in PBS, supplementiert mit 5 µg/ml PI, resuspendiert und die PI-Fluoreszenz mit einem 575nm Filter gemessen; PI-gefärbte Zellen wurden als nekrotisch gewertet.

Als Grundlage für die Quantifizierung von Apoptose diente die PI-Färbung der hypotonisch freigelegten Zellkerne (Riccardi and Nicoletti 2006). Hierzu wurden die Zellen wie oben beschrieben behandelt. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellkerne mittels einer hypotonischen Pufferlösung (0,1 % (w/v) Na Citrate, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 50 µg/ml PI) aus den Zellen extrahiert und gleichzeitig deren DNA gefärbt (Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur). Die PI-Fluoreszenz wurde wiederum mit einem 575 nm Emissionsfilter gemessen, Dubletten wurden in einem PI-A vs. PI-W-Diagramm ausgeschlossen. Zellkerne mit einem geringeren DNA-Gehalt als 2n (2n entspricht dem DNA-Gehalt in G1-Phase, daher bezeichnet man Kerne mit weniger als 2n DNA als subG1-Fraktion) wurden als apoptotisch gewertet.

Induktion von Seneszenz wurde mittels 5-Dodecanoylaminofluoreszein-di-β-Galactopyranosid (C12-FDG, Thermofisher), einem fluorogenen Substrat der Seneszenz-assoziierten β-Galactosidase (SA-β-gal) (Debacq-Chainiaux, Erusalimsky et al. 2009) analysiert. Die Zellen wurden hierfür mit 100 nM Bafilomycin A1 (Tocris R&D Systems, Heidelberg, Deutschland) im serumfreien Medium für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, um eine lysosomale Alkalisierung zu ermöglichen. Für die Konvertierung des Substrats wurde C12-FDG mit einer finalen Konzentration von 50 µM zugegeben und die Zellen erneut für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen, mittels Trypsinierung gesammelt und durchflusszytometrisch analysiert. Zellen mit hohen C12-FDG- und hohen SSC-Signalen (entspricht einer hohen Granularität der Zellen) wurden als seneszent gewertet.

Statistische Analysen

Die Daten des klonogenen Überlebens der Sarkomzellen wurden mit Hilfe eines linear-quadratischen Regressionsmodells (Polynom zweiten Grades) ausgewertet. Für die Anpassung des Modells und zur Berechnung der entsprechenden α/β -Werte wurde OriginPro 9.1 (OriginLab

Ltd., Northampton, MA, U.S.A.) eingesetzt. Die Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) der standardisierten Überlebensdaten, ebenso wie die Korrelationsanalysen wurden ebenfalls mit Hilfe von OriginPro 9.1 durchgeführt. Mittels GENE-E 3.0 Software (Broad Institute, www.broadinstitute.org/cancer/software/GENE-E) wurde ein hierarchisches Clustering der Daten des klonogenen Überlebens der Sarkomzellen sowie der qRT-PCR-Daten erstellt..

Die Daten der Oncoprints sowie die Kaplan-Meier-Analysen der TCGA (The Cancer Genome Atlas)-Weichgewebssarkomdaten stammen von cBioPortal for cancer genomics (www.cbioportal.org). Die Ergebnisse basieren auf Daten, die vom TCGA Research Network (<http://cancergenome.nih.gov/>) generiert worden sind.“ (Ernst, Anders et al. 2015)

(Kapitel entnommen, modifiziert und ins Deutsche übersetzt aus: Ernst, Anders, Kapfhammer et al. 2015)

4 Ergebnisse

„Das Ziel dieser Arbeit war es, Marker für die Strahlenresistenz in Weichgewebssarkomzellen zu identifizieren, um zukünftig sowohl eine Stratifizierung von Patienten als auch eine zielgerichtete Radiosensibilisierung im Rahmen multi-modaler Behandlungsschemata zu ermöglichen. Daher wurde zunächst die intrinsische Radiosensitivität verschiedener Weichgewebssarkomzelllinien unterschiedlichen Gewebeansprungs und p53-Status untersucht (Abbildung 1A).

Intrinsische Radiosensitivität humaner Weichgewebssarkomzelllinien

Mittels Koloniebildungsassays wurde das klonogene Überleben der Weichgewebssarkomzellen nach Bestrahlung mit 0-6 Gy quantifiziert (Abbildung 3B). Die Ergebnisse wurden anschließend linear-quadratisch *gefittet*, wie es der klassischen Vorgehensweise bei radiobiologischen Untersuchungen zur Strahlensensitivität entspricht. Zugrunde liegt das linear-quadratische Modell, in dem die Abnahme des Überlebens nach Bestrahlung bei halblogarithmischer graphischer Darstellung über ein Polynom zweiten Grades mit der folgenden Gleichung angenähert wird (Franken, Oei et al. 2013):

$$\log(S(D)) = \log(S(0)) - (\alpha D + \beta D^2)$$

S(D): Überlebende Fraktion nach Bestrahlung mit Dosis D

S(0): Überlebende Fraktion nach Bestrahlung mit 0 Gy

α , β : Koeffizienten des linearen und des quadratischen Terms

Klassischerweise berechnet man bei radiobiologischen Untersuchungen zur Strahlensensitivität aus den Koeffizienten des linearen und des quadratischen Terms den sogenannten α/β -Wert. Dieser entspricht der Dosis, bei der der Beitrag von linearem und quadratischen Anteil zur Gesamtabnahme des klonogenen Überlebens gleich groß ist.

Für das untersuchte Kollektiv an Sarkomzelllinien wurden α/β -Werte zwischen 1,2 bis 16,9 Gy erhalten (Abbildung 3C). Da der α/β -Wert aufgrund der Tatsache, dass er die Gesamtsteilheit der Kurve, die in direktem Zusammenhang mit der Radiosensitivität steht, nicht erfasst (Unkel, Belka, Lauber 2016), nur bedingt als Maß für die Radiosensitivität dienen kann, wurden die erhobenen Klonogenitätsdaten zusätzlich mit anderen Verfahren ausgewertet, um eine Aufspaltung des Kollektivs in radiosensitive und radioresistente Gruppen von Zelllinien zu ermöglichen und ein numerisches quantitatives Maß der Radiosensitivität zu erhalten. Zunächst wurde

ein hierarchisches Clustering der standardisierten Klonogenitätsdaten erstellt. Hierbei wurden zwei Cluster von Zelllinien beobachtet, eines mit höherer und eines mit geringerer intrinsischer Radioresistenz (Abbildung 3C). Die α/β -Werte der Zelllinien beider Cluster unterschieden sich hierbei signifikant: Strahlensensitivere Zelllinien wiesen einen signifikant höheren α/β -Wert auf als strahlenresistentere Linien. Somit kann der α/β -Wert zumindest in diesem Gruppenvergleich als Maß der intrinsischen Radiosensibilität herangezogen werden (Abbildung 3C).

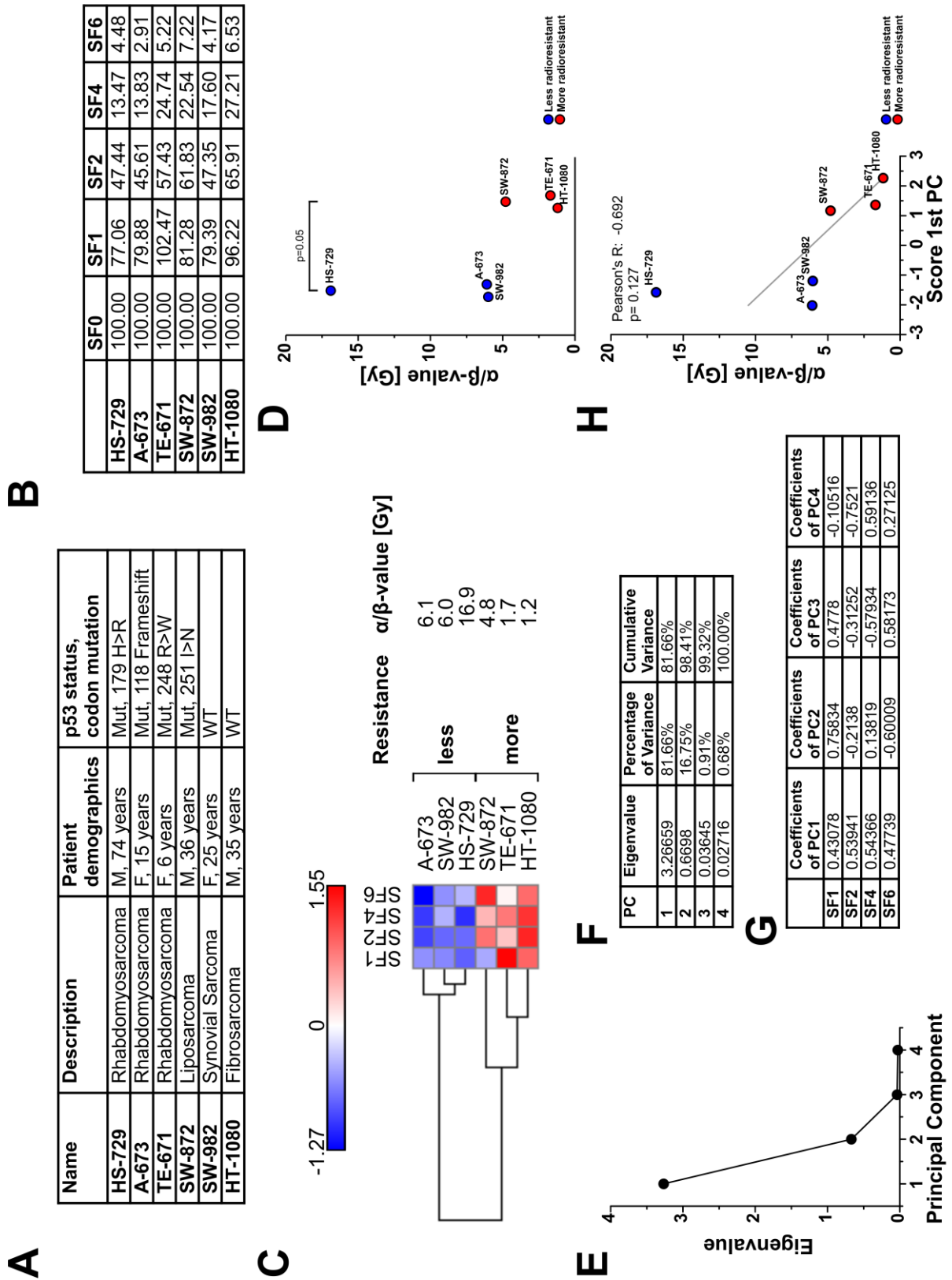


Abbildung 4: Unterschiede in der intrinsischen Radiosensitivität humaner Weichgewebssarkomzelllinien.

- (A) Sarkomzelllinien, die in dieser Arbeit Verwendung fanden. Das Ursprungsgewebe des jeweiligen Tumors und die Patientendemographie sind abgebildet, der p53-Mutationsstatus wurde mittels cDNA-Sequenzierung bestimmt.
- (B) Das prozentuale klonogene Überleben wurde in Koloniebildungsassays untersucht. Hier ist das Mittel aus fünf unabhängigen Experimenten gezeigt.
- (C) Die Daten des klonogenen Überlebens wurden standardisiert und einem hierarchischen Clustering unterzogen (Euclidean-distance method). Als Ergebnis zeigen sich zwei Cluster verschiedener Zelllinien mit hoher bzw. geringer intrinsischer Strahlenresistenz. α/β -Werte wurden mittels linear-quadratischer Regression bestimmt.
- (D) Ein Vergleich der α/β -Werte innerhalb der beiden Cluster wurde mit Hilfe eines one-sided exact Wilcoxon Rank-Tests durchgeführt.
- (E-G) Hauptkomponentenanalyse (PCA) der standardisierten Daten des klonogenen Überlebens.
- (E) Der Scree-Plot zeigt die Eigenwerte der extrahierten Hauptkomponenten (PCs).
- (F) Prozentuale Varianz und kumulative Varianz der Hauptkomponenten (PCs).
- (G) Ladungskoeffizienten der extrahierten PCs der Überlebensfraktionen bei 1 bis 6 Gy (SF1–6).
- (H) Pearson Korrelationsanalyse des Scores der ersten PC und der ermittelten α/β -Werte.

Abbildung entnommen aus Ernst, Anders, Kapfhammer et al. 2015.

Um die Gesamtsteilheit der Überlebenskurven zu berücksichtigen, wurde mittels einer Hauptkomponentenanalyse der standardisierten Überlebensdaten eine Dimensionsreduktion vorgenommen und ein Strahlenresistenz-Score extrahiert (Joliffe and Morgan 1992) (Abbildung. 3E-G). Nur die erste Hauptkomponente zeigte einen Eigenwert von >1 und trägt damit mehr Information als die Ursprungsvariablen (Abbildung 3E). Gleichzeitig deckt die erste Hauptkomponente 81,66 % der Varianz der Originaldaten ab (Abbildung 3F) und wird gleichmäßig beladen von den gemessenen Überlebensfraktionen nach Bestrahlung mit 1 bis 6 Gy (SF1–6, Abbildung 3G). Auf Grundlage dieser Kriterien stellt der Wert der ersten Hauptkomponente ein geeignetes Maß für die intrinsische Radioresistenz dar, welche das klonogene Überleben über den gesamten angewandten Dosisbereich und insbesondere auch die Steilheit der Überlebenskurve widerspiegelt. Die Korrelationsanalyse nach Pearson zeigte eine negative, statistisch jedoch nicht signifikante Korrelation zwischen den Werten der ersten Hauptkomponente und den α/β -Werten (Abbildung 3H). Als ursächlich hierfür ist die bereits beschriebene Limitierung der α/β -Werte bei der Abbildung der Gesamtsteilheit der Überlebenskurve anzunehmen. Dies zeigt sich am Beispiel der strahlensensiblen A-673-Zellen und der strahlenresistenten SW-872 Zellen, wenn man die Werte der Hauptkomponentenanalyse mit den α/β -Werten und denen vergleicht. Die Überlebenskurven zeigen zwar einen ähnlichen Verlauf, jedoch eine klar unterschiedliche Steigung (Abbildung 6A).

Korrelation der intrinsischen Strahlenresistenz mit der mRNA-Expression von Regulatoren der DNA-Schadensantwort sowie von HSP90AB1

Die Mechanismen, auf denen die intrinsische Radioresistenz von Krebszellen beruht, können vielfältiger Art sein; eine verstärkte Expression von Genen mit Bezug zur DNA-Schadensantwort stellt eine Möglichkeit dar (Begg, Stewart et al. 2011). Mittels qRT-PCR wurde daher ein Profil ausgewählter Mediatoren erstellt, die im Rahmen der DNA-Schadensantwort und der Doppelstrangbruch-Reparatur wichtige Funktionen einnehmen (Abbildung 4A). Das entsprechende, hierarchische Clustering der qRT-PCR-Ergebnisse zeigte jedoch keine Übereinstimmung mit dem Clustering, das aus den Daten des klonogenen Überlebens nach Bestrahlung erstellt wurde (Abbildung 3C). Auch wurden die Zelllinien nicht nach ihren Ursprungsgeweben oder nach ihrem p53-Status separiert. Dennoch zeigte sich eine deutliche Abgrenzung der TE-671-Zelllinie, die aus einem 6 Jahre alten Patienten isoliert worden war, von allen anderen Zelllinien, die aus Patienten stammen, die mindestens 10 Jahre alt oder älter waren. Auf den ersten Blick konnten keine offensichtlichen Marker für Strahlenresistenz identifiziert werden. Die strahlenresistente TE-671-Linie zeigte nahezu ausschließlich überhöhte Expression aller getesteten DSB-Regulatoren, wohingegen beispielsweise in der strahlensensitiven SW-872-Linie nur einzelne Faktoren hochreguliert waren. Die ebenfalls äußerst strahlenresistente HT-1080-Linie wies hingegen nur eine erhöhte Expression von ATR auf (im Vergleich zum Durchschnitt aller Zelllinien).

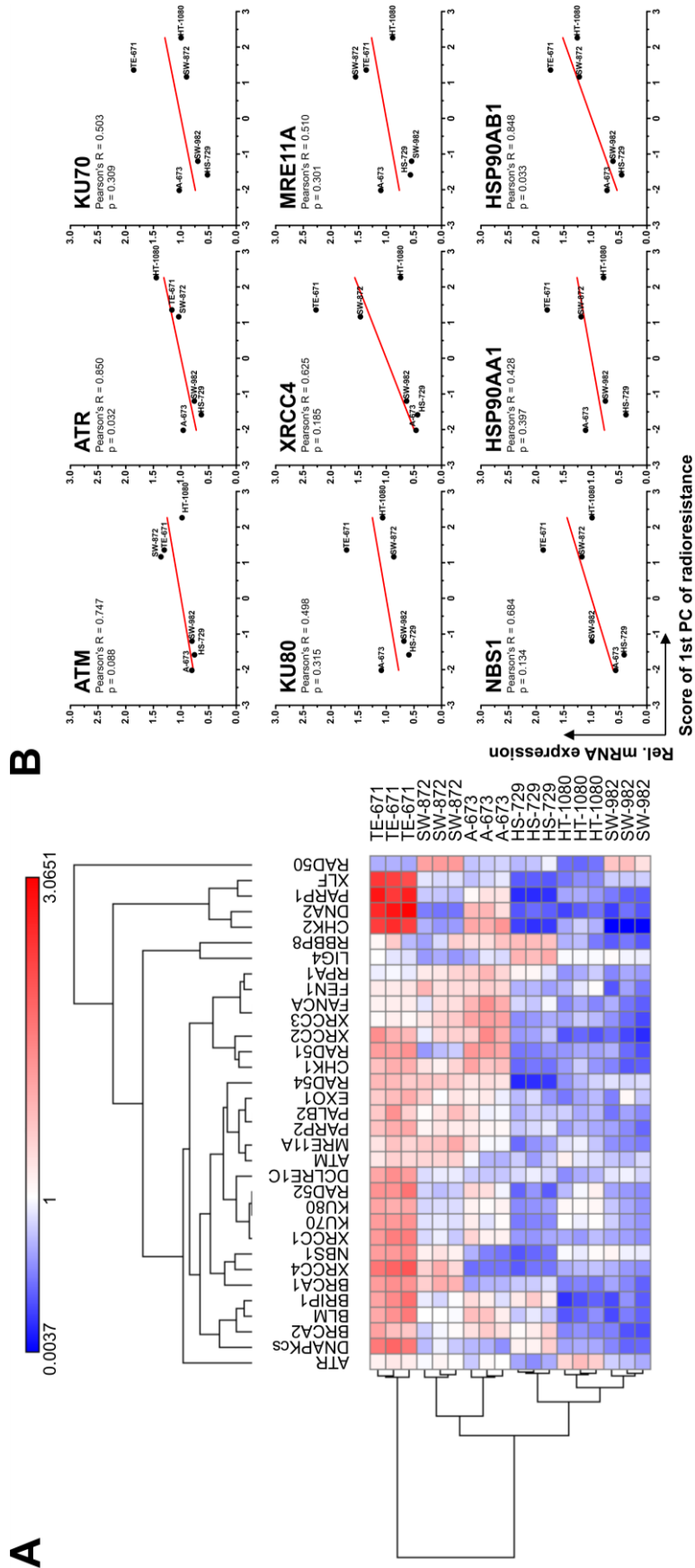


Abbildung 5: Ein Transkriptionsprofil stellt eine Korrelation des Strahlenresistenz-Scores mit den mRNA-Expressionslevels bestimmter DNA-Schadensantwort-Regulatoren und HSP90AB1 her.

- (A) *mRNA-Expressionslevels essentieller Regulatoren der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur wurden mittels qRT-PCR analysiert und in ein hierarchischen Clustering überführt. Pro Zelllinie wurden drei biologische Replikate untersucht.*
- (B) *Pearson Korrelationsanalyse der mRNA-Expressionslevels mit den Scores der ersten PC der Strahlenresistenz (aus Fig. 1). Korrelationen mit Pearson's $R \geq 0.5$ sind dargestellt.*

Abbildung entnommen aus Ernst, Anders, Kapfhammer et al. 2015.

Um die Prima-Vista-Beobachtungen zu präzisieren, wurden Pearson Korrelationsanalysen mit den Scores der ersten Hauptkomponente durchgeführt. Definiert man einen Schwellenwert von $|R| \geq 0.5$, so werden für sieben Faktoren der DNA-Schadensantwort relevante Korrelationen zwischen deren mRNA-Expression und ihren Radioresistenz-Scores beobachtet. Die stärksten Korrelationen wurden dabei für ATR, ATM und NBS1 erhalten – Faktoren, die für die frühe Phase der DNA-Schadensantwort wichtig sind, unter anderem für die Erkennung von DNA-Schädigungen und für die Initialisierung der DNA-Reparatur. Da die Abhängigkeit von ATM, ATR und des MRN-Komplex von der Aktivität von HSP90 bereits beschrieben war (Dote, Burgan et al. 2006, Ha, Fiskus et al. 2011), wurde nachfolgend untersucht, ob die Expression der HSP90-Isoformen HSP90AA1 und HSP90AB1 ebenfalls eine Korrelation mit der Strahlenresistenz in Sarkomzelllinien zeigt. Da für HSP90AB1 eine deutliche Korrelation erhalten werden konnte (Abbildung 4B), stellte sich nun die Frage, ob mittels HSP90-Inhibition radioresistente Sarkomzellen mit einer hohen Expression von DNA-Schadensantwort-Faktoren zielgerichtet radiosensibilisiert werden können.

Viabilität humaner Weichgewebssarkomzellen nach alleiniger HSP90-Inhibition im Vergleich zu deren Kombination mit ionisierender Strahlung

Für unsere Experimente wurde, wie bereits beschrieben, der HSP90-Inhibitor *epi-Pochoxim F* (NW457), ein Derivat von Radicicol, verwendet (Barluenga, Wang et al. 2008). Zuerst wurde die direkte Zytotoxizität von NW457 auf humane Sarkomzellen über einen Konzentrationsbereich von 1–1000 nM hinweg untersucht. Dabei konnten grundlegende Unterschiede in der relativen Empfindlichkeit gegenüber NW457 der verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 5A). TE-671 und HT-1080 Zellen erwiesen sich als am empfindlichsten, was sich in deren, im Vergleich zu den anderen Zelllinien, verstärkten Rückgang der Viabilität ausdrückte. Diese Ergebnisse passten somit zu dem als erhöht bestimmten Expressionslevel von HSP90AB1 in diesen beiden Zelllinien (Abbildung 4B). Gleichzeitig lässt dieses Ergebnis darauf schließen, dass HSP90AB1 in TE-671- und HT-1080-Zellen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der zellulären Viabilität und/oder der Proliferation spielt.

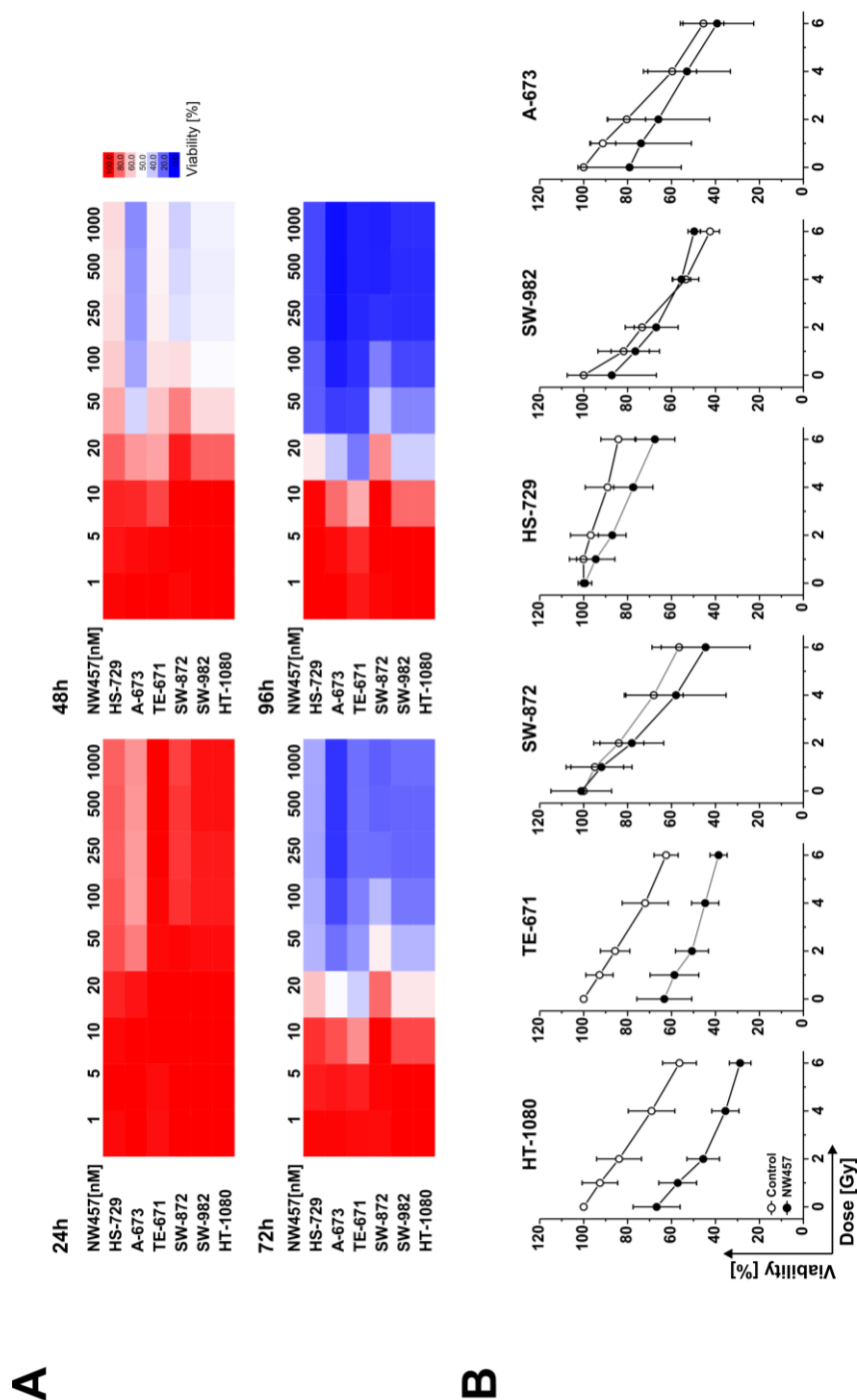


Abbildung 6: Die Viabilität von Sarkomzellen wird durch eine alleinige HSP90-Inhibition im Vergleich zu einer Kombinationstherapie mit ionisierender Strahlung auf unterschiedliche Weise beeinflusst.

- (A) Die Sarkomzellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von NW457 behandelt, und die zelluläre Viabilität wurde nach 24 bis 96 Stunden mittels AlamarBlue-Reduktionsassay ermittelt. Abgebildet sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.
- (B) Die Zellen wurden nach Behandlung mit 10 nM NW457 für 24 Stunden (oder unbehandelt) mit 0 bis 6 Gy bestrahlt. 48 Stunden nach Bestrahlung wurde die Viabilität mittels AlamarBlue-Reduktionsassay ermittelt. Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten.

Abbildung entnommen aus Ernst, Anders, Kapfhammer et al. 2015.

HSP90-Inhibition und der daraus resultierende Abbau von Klientenproteinen greift auf vielfältige Weise in zelluläre Signalwege ein, die für den Erhalt des malignen Phänotyps einer Tumorzelle verantwortlich sind (Lianos, Alexiou et al. 2015). Aus quantitativen Proteomanalysen ist bekannt, dass unterschiedliche Signalwege unterschiedlich empfindlich auf eine HSP90-Inhibition reagieren, und dass die DNA-Schadensantwort sowie die wachstumsvermittelnden Signalwege der Rezeptortyrosinkinasen zu den empfindlichsten zählen (Sharma, Vabulas et al. 2012, Lauber, Brix et al. 2015). Für Kombinationsexperimente in Verbindung mit Bestrahlung wurden daher nur 10 nM NW457 eingesetzt – eine Konzentration, die per se nur einen marginalen Einfluss auf die zelluläre Viabilität hatte. In der Kombination mit Bestrahlung führte allerdings die 24-stündige Vorbehandlung mit 10 nM NW457 zu einer deutlichen Reduzierung der Zellviabilität, vor allem bei den Zelllinien TE-671 sowie HT-1080 (Abbildung 5B). Die Inhibition von HSP90 durch NW457 scheint demzufolge die zelluläre Viabilität von Weichgewebssarkomzellen negativ zu beeinflussen und verstärkt insbesondere die Reduktion der Viabilität nach Bestrahlung.

Reduktion des klonogenen Überlebens und Verzögerung der DNA-Schadensreparatur durch Vorbehandlung mit dem HSP90-Inhibitor NW457 in strahlungsresistenten Sarkomzelllinien

Als nächstes untersuchten wir den Effekt einer Vorbehandlung mit nanomolarer Konzentration von NW457 (10 nM) vor der Bestrahlung auf das klonogene Überleben. Eine statistisch signifikante Sensibilisierung gegenüber Bestrahlung (Radiosensibilisierung) konnte für die Zelllinien HT-1080, SW-872 sowie HS-729 beobachtet werden (Abbildung 6A). In geringerem Ausmaß wurden auch TE-671-Zellen radiosensibilisiert, allerdings war dies statistisch nicht signifikant. Kein sensibilisierender Effekt zeigte sich hingegen in SW-982-Zellen, und die Zelllinie A-673 wies sogar ein höheres klonogenes Überleben in Folge der Vorbehandlung mit NW457 auf.

Die Vorbehandlung mit 10 nM NW457 bewirkte somit in allen strahlenresistenten Zelllinien einen Anstieg des α/β -Wertes und gleichzeitig einen Abfall des PCA-Wertes für die intrinsische Radioresistenz, was einer Radiosensibilisierung aller genannten Zelllinien entspricht (Abbildung 6B). Im Gegensatz dazu zeigte NW457 bei als strahlensensitiv eingestuften Zelllinien keinen Anstieg des α/β -Wertes und keinen Abfall des PCA-Wertes.

Da der von uns beobachtete radiosensibilisierende Effekt von NW457 höchst wahrscheinlich auf einer Beeinträchtigung der Funktion der DNA-Schadensantwort beruht (Camphausen and Tofilon 2007), haben wir die Auswirkung der NW457-Behandlung auf die Kinetik der DNA-Schadensreparatur am Beispiel des Erscheinens und Verschwindens von phosphoryliertem Histon H2AX (γ -H2AX) nach Bestrahlung charakterisiert (Abbildung 6C). In Zellen der Linie HT-1080 konnte bereits 15 min nach Bestrahlung eine Bildung von γ -H2AX-Foci beobachtet werden. Nach Durchlaufen eines Maximums bei ca. einer Stunde nahm die Anzahl der γ -H2AX-Foci wieder ab und erreichte ungefähr nach acht Stunden wieder das Ausgangsniveau. Die Vorbehandlung mit NW457 verlangsamte die DNA-Reparaturkinetik und damit das Verschwinden der Foci maßgeblich, sodass nach acht Stunden noch multiple residuelle Foci detektierbar waren. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass in HT-1080-Zellen die NW457-vermittelte Radiosensibilisierung einer beeinträchtigten und/oder verzögerten DNA-Schadensantwort geschuldet ist. In Zellen der Linie A-673 (höhere Radiosensitivität) war eine mit HT-1080 vergleichbare Kinetik in der Bildung der γ -H2AX-Foci zu erkennen, jedoch zeigte sich eine langsamere Abnahme, die durch die Behandlung mit NW457 nicht weiter verzögert wurde (Abbildung 6C). Zellen, die mit NW457 vorbehandelt wurden, zeigten zuweilen nach 8 Stunden sogar weniger verbliebene γ -H2AX-Foci als die entsprechenden Kontrollzellen. Diese Ergebnisse decken sich mit der Beobachtung, dass NW457 keinen radiosensibilisierenden Einfluss auf A-673-Zellen hat (Abbildung 6A).

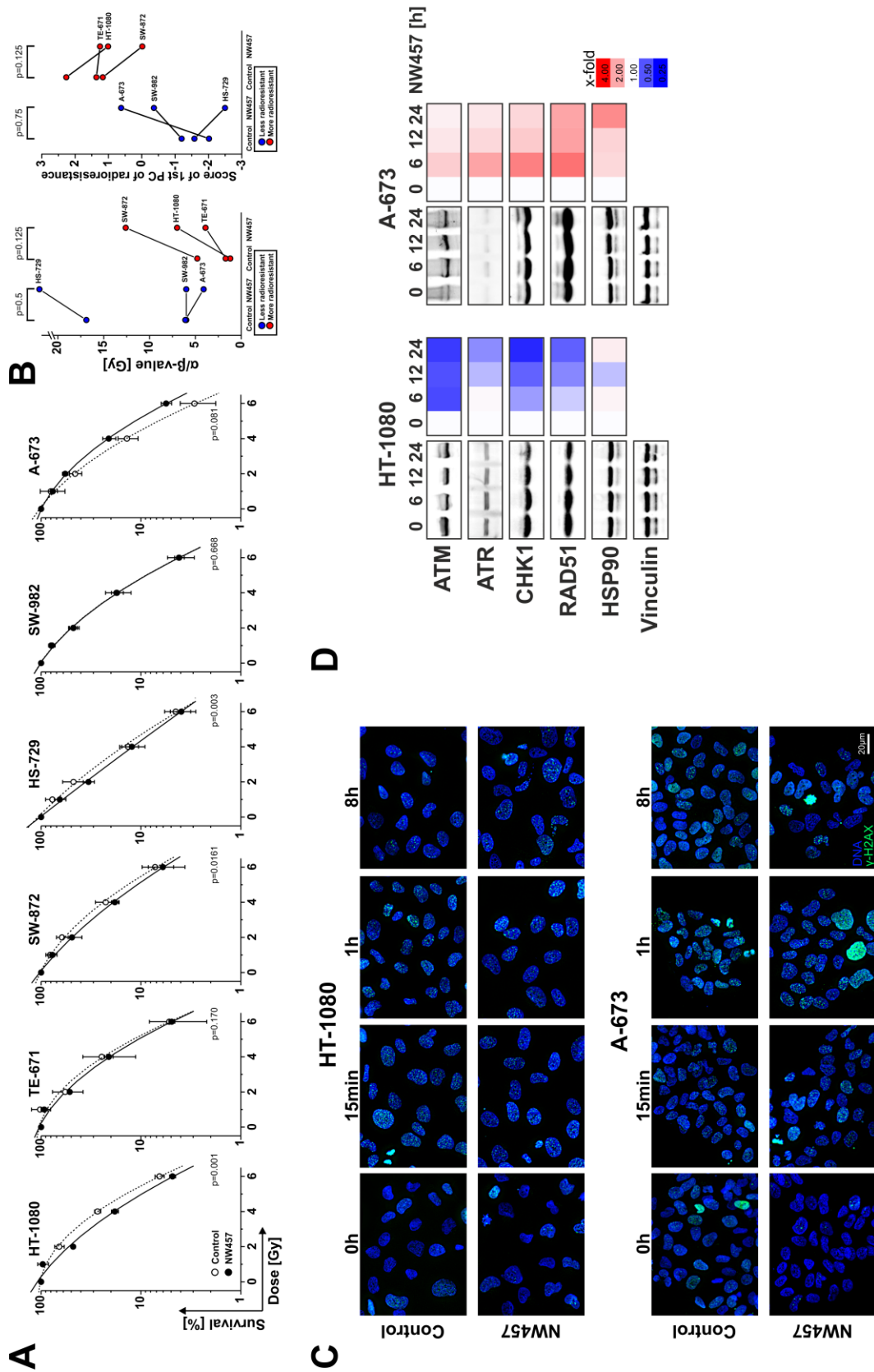


Abbildung 7: Eine Vorbehandlung mit dem HSP90-Inhibitor NW457 verringert das klonogene Überleben vor allem in strahlenresistenten Sarkomzelllinien und verzögert die verzögert die DNA-Schadensreparatur.

- (A) Die Sarkomzellen wurden nach Behandlung mit 10 nM NW457 für 24 Stunden (oder unbehandelt) mit 0 bis 6 Gy bestrahlt, und das klonogene Überleben wurde 14 Tage nach Bestrahlung ermittelt. Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse wurden mittels two-way ANOVA verglichen.
- (B) Die α/β -Werte wurden mittels linear-quadratischer Regression der Daten des klonogenen Überlebens berechnet, der Effekt einer NW457-Vorbehandlung wurde mittels one-sided exact Wilcoxon Rank-Test statistisch analysiert.
- (C) Die Sarkomzellen wurden nach Behandlung mit 20 nM NW457 für 24 Stunden (oder unbehandelt) mit 2 Gy bestrahlt. Die Kinetik der γ -H2AX-DNA-Foci-Formierung und Auflösung wurde mit Hilfe einer Immunfluoreszenzanalyse über 8 Stunden beobachtet.
- (D) Die Proteinlevel der zentralen Regulatoren der DNA-Reparaturmechanismen sowie HSP90 wurden in einem Total-Zelllysat nach Behandlung mit 10 nM NW457 für die angegebene Zeit durch 4-12%ige SDS-PAGE (20 oder 200 μ g Proteinextrakt pro Spur) und anschließender Westernblot-Analyse untersucht. Die Heatmaps zeigen eine relative Quantifizierung der Proteine mit Normierung auf die Ladekontrolle Vinculin als x-fold-Werte der unbehandelten Kontrollzellen.

Abbildung entnommen aus Ernst, Anders, Kapfhammer et al. 2015.

Zur weitergehenden Differenzierung der Mechanismen der NW457-vermittelten Beeinflussung der DNA-Reparatur von Sarkomzellen wurde die Proteinexpression entscheidender DDR-Regulatoren nach HSP90-Inhibition mittels Westernblot analysiert. Untersucht wurden dabei vor allem diejenigen Faktoren, deren mRNA-Expression die stärkste Korrelation mit Strahlenresistenz aufwies. Passend zur beobachteten Radiosensibilisierung in den Koloniebildungstests sowie der verzögerten DNA-Schadensreparatur, beobachtet in der γ -H2AX-Foci-Kinetik, zeigte sich eine deutliche, zeitabhängige Abnahme von ATM, ATR, CHK1 und RAD51 nach NW457-Behandlung in den HT-1080-Zellen, wohingegen in A-673-Zellen sogar ein leichter Anstieg der Mengen dieser Proteine zu erkennen war (Abbildung 6D). Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass eine NW457-vermittelte Radiosensibilisierung (durch Beeinträchtigung der DNA-Schadensantwort) durch ein Verschwinden verschiedener DDR-Faktoren wie ATM, ATR, CHK1 und RAD51 bedingt wird.

Nieder-nanomolare Konzentrationen von NW457 und die Induktion von Apoptose, Nekrose sowie von basaler und strahleninduzierter zellulärer Seneszenz

Das klonogene Zellüberleben nach einer Bestrahlung wird durch verschiedene Mechanismen beeinflusst, da verschiedene Zellen auf ionisierende Strahlung sehr unterschiedlich reagieren (Lauber, Ernst et al. 2012). Die wesentlichen Mechanismen umfassen die Induktion von Zelltod (Apoptose und/oder Nekr(opt)ose), Zellzyklusarrest und zelluläre Seneszenz. Im Folgenden haben wir diese Mechanismen mittels durchflusszytometrischer Analysemethoden näher charak-

terisiert. Die Apoptose-Induktion als Antwort auf ionisierende Bestrahlung wurde als prozentualer Anteil der Zellkerne mit einem DNA-Gehalt $< 2n$ (SubG1-Nuclei) quantifiziert. Diese fiel insgesamt moderat aus und war in der Zelllinie HS-729 noch am ausgeprägtesten (Abbildung 4A). Eine Vorbehandlung mit NW457 konnte die Apoptoserate zwar relevant verstärken, allerdings erst ab einer Konzentration von mehr als 10 nM. Apoptose-Induktion scheint demnach nicht für die beobachtete Radiosensibilisierung durch NW457 verantwortlich zu sein, die ja bereits mit Konzentrationen im nieder-nanomolaren Bereich messbar war.

Die Induktion von Nekrose wurde mittels Propidiumiodid-Exklusionsfärbung untersucht. Auch hier war das Ansprechen auf ionisierende Strahlung relativ gering, und HS-729-Zellen zeigten erneut die höchste Ansprechrate aller untersuchten Zelllinien. Eine durch NW457-Behandlung verstärkte Induktion von Nekrose konnte wiederum nur für NW457-Konzentrationen von mehr als 10 nM beobachtet werden (Abbildung 7B), womit auch die Induktion von Nekrose keine Erklärung für die beobachtete strahlensensibilisierende Wirkung von NW457 in nieder-nanomolaren Konzentrationen liefert.

Daher quantifizierten wir als nächstes die zelluläre Seneszenz. Hierzu identifizierten wir Zellen mit hoher Granularität (entsprechend einem hohen SSC-Signal) und Seneszenz-assoziiertes Aktivität von β -Galactosidase (SA- β -gal). Für die Linie HT-1080 zeigte sich eine dosisabhängige Akkumulation von seneszenten Zellen nach Bestrahlung, und die Vorbehandlung mit NW457 ging in dieser Zelllinie mit einer weiteren Zunahme der Seneszenz selbst im nanomolaren Bereich einher (Abbildung 7C). Im Gegensatz dazu wies die als sensitiv charakterisierte Zelllinie A-673 einen höheren basalen Wert an strahlungsinduzierter Seneszenz auf, dieser wurde jedoch durch eine HSP90-Inhibition nicht weiter erhöht. Stattdessen führte eine Behandlung mit NW457 zu einem leichten Rückgang der Seneszenz nach Bestrahlung (Abbildung 7C). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass zelluläre Seneszenz, vor allem bei stark radiore-sistenten Sarkomzelllinien, zur NW457-vermittelten Strahlensensibilisierung beiträgt.

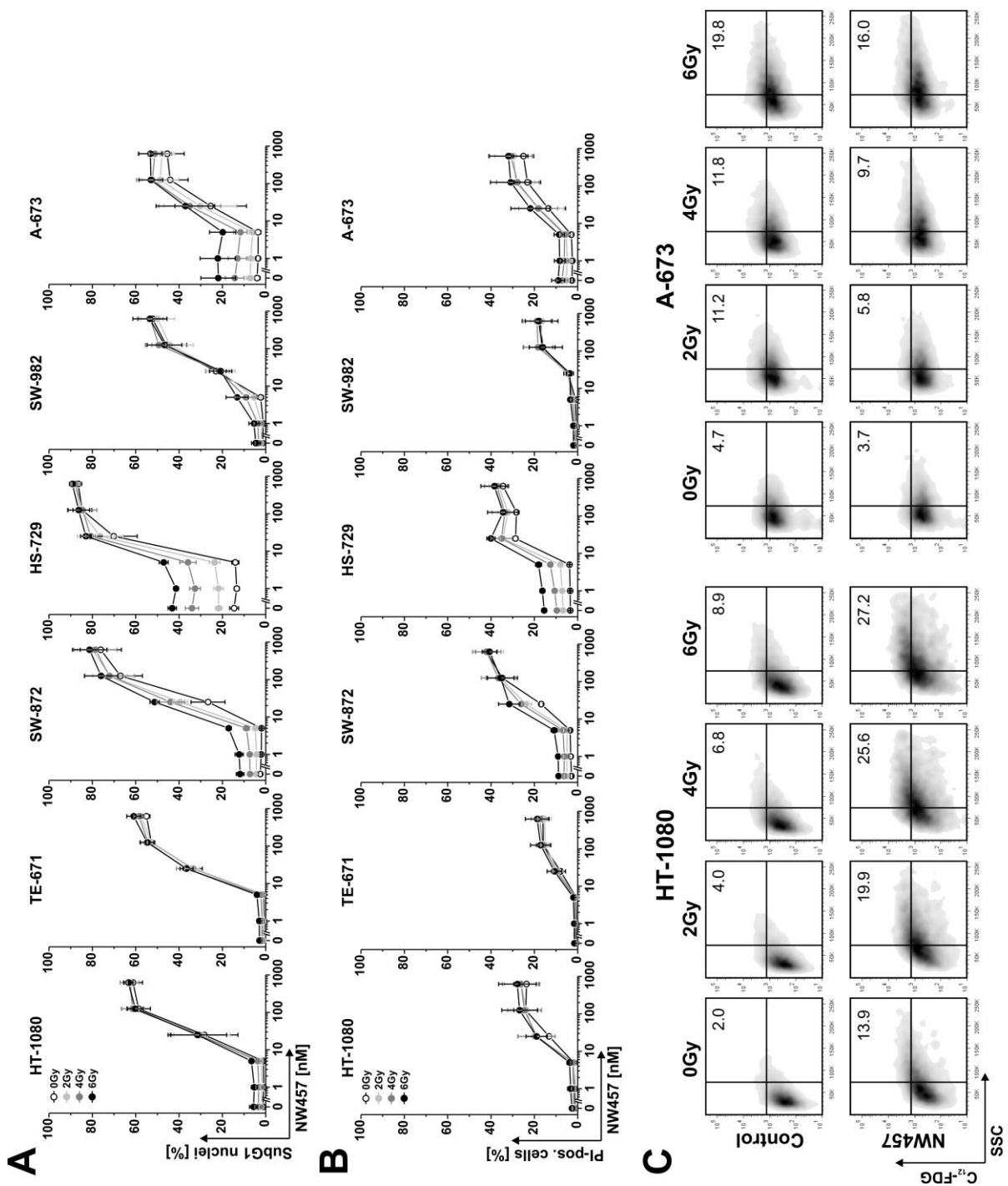


Abbildung 8: Eine Vorbehandlung mit niedernanomolaren Konzentrationen von NW457 hat keinen Effekt auf die Induktion von Apoptose und/oder Nekrose nach Bestrahlung, verstärkt jedoch die basale sowie strahleninduzierte Seneszenz

- (A) Die Sarkomzellen wurden nach Behandlung mit 10 nM NW457 für 24 Stunden (oder unbehandelt) mit 0 bis 6 Gy bestrahlt. 48 Stunden nach Bestrahlung wurde mittels FACS-Analyse der Nuclei mit SubG1-DNA-Gehalt die Apoptoserate ermittelt. Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.
- (B) Die Zellen wurden wie in (A) beschrieben behandelt. Mittels PI exclusion-Assay wurde durchflusszytometrisch nach 48 Stunden die Nekroserate ermittelt.

(C) Die Zellen wurden wie in (A) beschrieben behandelt. 48 Stunden nach Bestrahlung wurde mittels Durchflusszytometrie die Seneszenz-Induktion untersucht. Abgebildet sind exemplarische FACS Plots; der prozentuale Anteil der Zellen mit hohen SSC- und C12-FDG-Signalen ist angegeben.

Abbildung entnommen aus Ernst, Anders, Kapfhammer et al. 2015.

Überexpression der HSP90-Isoformen HSP90AA1 und HSP90AB1, sowie von ATM, ATR und NBS1 in Assoziation mit reduziertem Gesamtüberleben

Abschließend wurde die klinische Relevanz von HSP90-Inhibition als potenzielle neue Strategie zur Strahlensensibilisierung von Weichgewebssarkomen evaluiert. Da unsere in vitro Ergebnisse gezeigt haben, dass eine erhöhte mRNA-Expression von HSP90AB1, ATM, ATR und NBS1 mit erhöhter Strahlenresistenz einhergeht, wurde deren Genexpression im Datensatz der TCGA (The Cancer Genome Atlas) Weichgewebssarkom-Kohorte evaluiert. Bei 67 von 261 Patienten konnte eine erhöhte mRNA-Expression von mindestens einem der genannten Markergene (oberhalb eines Z-Score-Grenzwertes von +2,0) beobachtet werden (Abbildung 8A). Eine verringerte Expression der HSP90-Isoformen (unterhalb eines Z-Score-Grenzwertes von -2,0) konnte hingegen in dieser Kohorte nicht detektiert werden, in drei Fällen aber eine reduzierte Expression von ATR oder NBS1. Interessanterweise konnten wir feststellen, dass die Überexpression von HSP90AB1 mit einem besonders schlechten Gesamtüberleben von nur 5,9 Monaten assoziiert war, während bei nicht erhöhter HSP90AB1-Expression das Gesamtüberleben bei 46,8 Monaten lag (Abbildung 8B). Für HSP90AA1 konnte ein ähnlicher Trend beobachtet werden, der allerdings statistisch nicht signifikant war. Wenn HSP90AA1 und HSP90AB1 gemeinsam bewertet werden, so konnte eine Überexpression von HSP90 in insgesamt 41 Fällen (16,1 %) nachgewiesen werden; diese war mit einem mittleren Gesamtüberleben von nur 6,3 Monaten assoziiert, während das Gesamtüberleben des übrigen Patientenkollektivs bei 46,8 Monaten lag. Eine erhöhte Expression der HSP90-Klienten ATR, ATM und/oder NBS1 zeigte sich in insgesamt 49 Fällen und war ebenfalls mit einem verringerten Gesamtüberleben assoziiert, jedoch in geringerem Ausmaß als dies bei HSP90AB1-Überexpression der Fall war. Dennoch lässt sich festhalten, dass das Gesamtüberleben im Falle einer Überexpression von ATR, ATM und/oder NBS1 mit 14,0 Monaten im Vergleich zu 46,8 Monaten der übrigen Patienten signifikant reduziert war (in den 3 Fällen mit verringerter Expression oder nicht verfügbaren Follow-up-Daten wurde der Fall zensiert, da die Patienten zum Zeitpunkt der Analyse noch lebten).

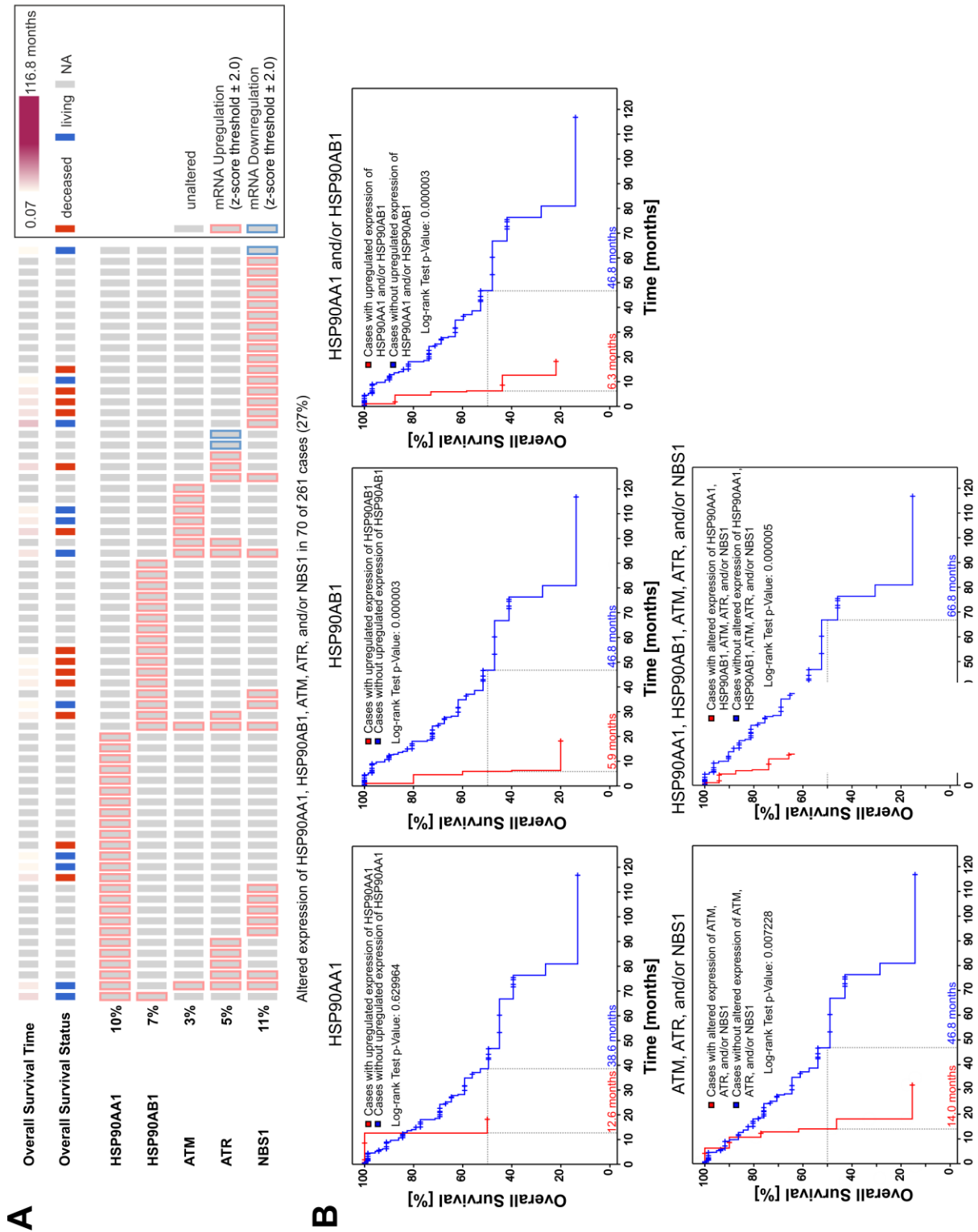


Abbildung 9: Die Überexpression der HSP90-Isoformen HSP90AA1 und HSP90AB1, ATR, ATM und/oder NBS1 in einer Untergruppe von Weichgewebssarkompatienten ist assoziiert mit einem verkürzten Gesamtüberleben.

(A) Eine Oncoprint-Analyse wurde in der TCGA Weichgewebssarkom-Kohorte durchgeführt. Jeder Balken repräsentiert einen individuellen Fall. Fälle ohne Veränderungen sind nicht dargestellt. Diese Analysen wurden unter Verwendung des cBioPortal (www.cbioportal.org/) durchgeführt.

(B) Kaplan-Meier-Analysen des Gesamtüberlebens der Sarkompatienten mit bzw. ohne erhöhte Expression von HSP90AA1 (oben), HSP90AB1 (mittig), und HSP90AA1 und/oder HSP90AB1 (unten). Die p-Werte wurde mittels Log-Rank Test ermittelt. Die Ergebnisse basieren auf Daten, die durch das TCGA Research Network (<http://cancergenome.nih.gov/>) erhoben wurden.

Abbildung entnommen aus Ernst, Anders, Kapfhammer et al. 2015.

Zusammenfassend zeigt sich, dass eine Überexpression der von uns identifizierten Markergene (HSP90AA1, HSP90AB1, ATR, ATM und/oder NBS1) mit einem deutlich verschlechterten Gesamtüberleben einhergeht. HSP90 (insbesondere die Isoform HSP90AB1) und seine Klientenproteine ATR, ATM und/oder NBS1 könnten somit zukünftig als potenzielle Stratifizierungsmarker zur Identifizierung hochaggressiver Subtypen innerhalb der Weichgewebssarcome klinische Anwendung finden. Gleichzeitig könnten auf Basis unserer Daten neue therapeutische Strategien, unter anderem eine auf HSP90-Inhibition beruhende Radiochemotherapie, zur Behandlung dieser Subtypen entwickelt werden.“ (Ernst, Anders et al. 2015)

(Kapitel entnommen und modifiziert aus: Ernst, Anders, Kapfhammer et al. 2015)

5 Diskussion

Seit Langem ist die Radiotherapie fester Bestandteil im multimodalen Therapieregime zur Behandlung von Weichgewebssarkomen (Rosenberg, Tepper et al. 1982). Ob eine alleinige adjuvante Strahlentherapie das Gesamtüberleben verbessern kann, ist umstritten (Lichter, Lawrence 1995, Strander, Turesson et al. 2003). Nach wie vor ist eine Bestrahlung nach vorangegangener marginaler Exzision (oder R1-Resektion) einer weiten chirurgischen Nachresektion unterlegen (Misra, Mistry et al. 2009, O’Sullivan, Davis et al. 2002). Aktuell werden unterschiedliche Strategien verfolgt, um die Ergebnisse einer Strahlentherapie zu verbessern. Multimodale Konzepte durch Kombination von Radiotherapie mit verschiedenen Chemotherapeutika und Hyperthermie werden ebenso untersucht wie verschiedene Bestrahlungsformen (Murphy, Lucas et al. 2008, Lindner and Issles 2011, DeLaney, Trofimov et al. 2005, Orth, Lauber et al. 2014). Während die Hyperthermie in Kombination mit einer Photonenbestrahlung vielsprechende Ergebnisse zeigen (Lindner, Issles 2011, Jingu, Tsujii, Mizoe et al 2012), wird die Effektivität einer Radiochemotherapie kontrovers diskutiert und geht darüber hinaus meistens mit einer Reihe zusätzlicher Nebenwirkungen einher (Look Hong, Hornicek et al. 2013, Curtis, Ashman et al. 2011).

Das Ziel der kombinierten Radiochemotherapie ist es, die Effektivität einer Strahlentherapie zu erhöhen, und gleichzeitig das gesunde Gewebe zu schonen. Ein interessanter Ansatz könnte eine molekular zielgerichtete Radiosensibilisierung der Tumorzellen sein. Bei einer Radiotherapie werden durch ionisierende Strahlen Schäden in der zellulären DNA (insbesondere in Form von Doppelstrangbrüchen) verursacht, die zu der Aktivierung eines komplexen Systems zur Reparatur der entstandenen Schäden führen (Vignard, Mirey et al 2013). Für die Initiierung und Koordinierung der DNA-Reparatur sind verschiedene Faktoren, wie unter anderem die HSP90-Klientenproteine ATM und ATR, von entscheidender Bedeutung. Ihre Aktivierung stellt einen der ersten Schritte innerhalb der DNA-Reparaturmechanismen dar (Smith, Tho et al. 2010, Vignard, Gladys et al 2013). Mit wachsendem Verständnis für die molekularen Grundlagen der DNA-Reparaturmechanismen sowie der zellulären Radiosensibilität werden vermehrt molekular zielgerichtete Wirkstoffe (sogenannte *targeted agents*) entwickelt, die beispielsweise die oben beschriebenen Regulatoren der DNA-Schadensantwort gezielt beeinflussen (Curtin 2012). Das Ziel dieser Ansätze ist ein verbessertes therapeutisches Ansprechen, möglichst bei gleichzeitig verringerter Toxizität für das umliegende Normalgewebe und einer Reduzierung der Strahlendosis. Die intrinsische Strahlenresistenz vieler Tumore ist jedoch meist nicht durch ein einzelnes Protein bedingt, sondern vielmehr durch eine Vielzahl molekularer

Mechanismen, multipler Signalwege und Schlüsselproteine, wie ATM, ATR oder NBS1 (Slichenmyer, Nelson et al. 1993, Bristow, Benchimol et al. 1996). Die Inhibition von Hitzeschockproteinen, wie HSP90, stellt hier eine Möglichkeit dar, die Funktion von mehreren solcher Faktoren, die zum einen für die intrinsische Radioresistenz, zum anderen aber auch für weitere onkogene Eigenschaften von Tumoren maßgeblich sind, simultan zu adressieren (Camphausen and Tofilon 2007, Jegou, Hazoume et al. 2013, Lauber, Brix et al. 2015). Demzufolge sollte die pharmakologische Radiosensibilisierung mittels HSP90-Inhibition einen vielversprechenden Ansatz zur Erhöhung der Effektivität bei gleichzeitiger Reduktion der Nebenwirkungen auf gesundes Gewebe darstellen (Gandhi, Wild et al. 2013). Als Mechanismen der radiosensibilisierenden Wirkung von HSP90-Inhibitoren konnten bisher eine verzögerte bzw. verminderte DNA-Schadensantwort, eine gestörte Regulation des Zellzyklusarrests nach Bestrahlung, ein vermindertes Proliferationsvermögen, erhöhter Zelltod sowie eine Beeinträchtigung des Tumorwachstums identifiziert werden (Camphausen and Tofilon 2007, Kabakov, Kudryavtsev et al. 2010, Sharma, Vabulas et al. 2012). Die meisten dieser Studien wurden mit der ersten Generation von HSP90-Inhibitoren, wie Geldanamycin oder Radicicol, durchgeführt. Aufgrund unzureichender pharmakologischer Eigenschaften sowie hoher Hepatotoxizität der ersten und zweiten Generation von HSP90-Inhibitoren, wurde eine dritte Generation der HSP90-Inhibitoren mit optimierten pharmakologischen Charakteristika entwickelt. Interessanterweise zeigte sich der radiosensibilisierende Effekt spezifisch für maligne Zellen, ohne einen signifikanten Effekt auf benachbarte nicht maligne Zellen auszuüben. Ein Vorteil der HSP90-Inhibitoren ist deren große therapeutische Breite aufgrund des raschen Abbaus in gesundem Gewebe sowie dem Blutkompartiment (Den and Lu 2012). In murinen Modellsystemen konnte gezeigt werden, dass HSP90-Inhibitoren in hohen Konzentrationen im Tumorgewebe vorliegen, in gesundem Gewebe jedoch nur eine Halbwertszeit zeigen, die etwa der in Plasma entspricht (Neckers 2007), Xu et al 2003, Vilenchik et al 2004, Banerji et al 2005, Eiseman et al 2005). Chiosis et al. beschrieben sogar eine aktive Akkumulation von 17-AAG in Tumorzellen (Chiosis et al., 2003). Verantwortlich hierfür ist die erhöhte Expression von HSP90 in Tumorzellen im Vergleich zu nicht malignen Zellen, was auf die besondere Wichtigkeit von HSP90 für das Tumorwachstum und/oder -überleben hinweist (Isaacs, Xu et al. 2003). Tumorzellen sind demnach, insbesondere im Vergleich zu nicht malignen Zellen, in besonderem Maße von der Funktionalität des HSP90 abhängig.

HSP90-Inhibitoren wurden als Monotherapien in verschiedenen klinischen Studien getestet, konnten jedoch keine überzeugenden Ergebnisse liefern. Ursächlich hierfür könnte eine unzureichende Dosierung aufgrund Dosis-limitierender toxischer Nebenwirkungen gewesen

sein (Wang, Mingjie 2016). Die Kombination von HSP90-Inhibition mit Radiotherapie bietet jedoch einen sehr interessanten und vielversprechenden Therapieansatz, da eine große Anzahl der Klientenproteine von HSP90 zentrale Regulatoren der intrinsischen Strahlenresistenz darstellen und schon auf geringste Konzentrationen von HSP90-Inhibitoren reagieren (Sharma, Vabulas et al. 2012). Insbesondere im Fall der Weichgewebssarkome könnte die HSP90-Inhibition von besonderer Relevanz sein, unter anderem da in unserer Studie eine Untergruppe von besonders aggressiven Sarkomen identifiziert werden konnte, die mit einer massiven Überexpression von HSP90AB1, ATR, ATM und NBS1 (in 27 % aller Fälle) und gleichzeitig mit besonders schlechter Prognose einhergingen. Diese Ergebnisse konnten durch unsere in vitro Analysen bestätigt werden. So konnten wir zeigen, dass die Radioresistenz verschiedener Sarkomzelllinien mit erhöhter Expression dieser Markergene einhergeht.

Unseres Wissens nach ist dies die erste systematische Studie des Strahlenresistenzverhaltens von Weichgewebssarkomzellen. Auch eine PCA-basierte Analyse des klonogenen Überlebens sowie ein auf diesen Daten entwickelter Strahlenresistenz-Score sind bisher nicht beschrieben worden. Durch eine Korrelation dieses Scores mit den transkriptomischen Daten der Expression der DNA-Schadensantwort-Regulatoren konnten wir ATR, ATM, NBS1 sowie HSP90 (HSP90AA1 und HSP90AB1) als potentielle Kandidaten für eine gezielte Radiosensibilisierung von Weichgewebssarkomen identifizieren. Unsere funktionellen Analysen legen nahe, dass HSP90-Inhibition zu einem Abbau essentieller DNA-Schadensantwort-Regulatoren, wie ATM und ATR, führt, gefolgt von einer verzögerten bzw. beeinträchtigten DNA-Schadensreparatur und letztlich einer verstärkten Induktion zellulärer Seneszenz nach Bestrahlung und verringertem klonogenen Überleben – vor allem in ursprünglich radioresistenten Weichgewebssarkomlinien.

Neben der Reduktion des klonogenen Überlebens nach Bestrahlung kann HSP90-Inhibition über eine verstärkte Freisetzung von Gefahrensignalen auch die Immunogenität der sterbenden Tumorzellen beeinflussen (Lauber, Brix et al. 2015). Dies führt zu Veränderungen im Mikromilieu des Tumorgewebes. In diesem Zusammenhang sind eine Erhöhung der CD8⁺-T-Zell-Aktivität, eine Verminderung von myeloiden Suppressorzellen und regulatorischen T-Zellen sowie die Aktivierung von tumorassoziierten Endothelzellen und damit verbessertem Leukozyten-*Recruitment* beschrieben worden (Rao, Taylor et al. 2012). Dies ist von besonderer Bedeutung in Hinblick auf die Induktion einer systemischen anti-tumoralen Immunreaktion, die sowohl lokal überlebende Tumorzellen als auch distante Tumormetastasen zugleich adressieren könnte. Da eine Strahlentherapie mit einer Immunstimulation assoziiert ist, und zugleich

eine Verminderung der Immunsuppression innerhalb des Tumorgewebes bewirkt, könnte die Immunmodulation im Kontext der HSP90-Inhibition einen weiteren Faktor für eine Verbesserung des Therapie-Erfolgs darstellen (Sharma, Bode et al. 2013). Besonders interessant und vielversprechend ist demnach auch die weitere Untersuchung der immunologischen Konsequenzen des strahleninduzierten Zelltods in Kombination mit HSP90-Inhibition – insbesondere die strahleninduzierte zelluläre Seneszenz.

Zusammenfassend zeigen die hier dargestellten Daten, dass die HSP90-Inhibition eine attraktive Strategie zur molekular zielgerichteten Radiosensibilisierung von Weichgewebssarkomen darstellen kann – insbesondere im Hinblick auf die Subgruppe von Weichgewebssarkomen mit erhöhter DNA-Schadensantwort-Regulator-Expression und dadurch bedingter intrinsischer Strahlenresistenz.

6 Literaturverzeichnis

- Abramson D.H., R.M. Ellsworth, F.D. Kitchin and G. Tung (1984). "Second nonocular tumors in retinoblastoma survivors." *Ophthalmology* **91**(12): 1638-47.
- Baeriswyl, V. and G. Christofori (2009). "The angiogenic switch in carcinogenesis." *Semin Cancer Biol* **19**(5): 329–337.
- Bakkenist, C. J. and M. B. Kastan (2003). "DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation." *Nature* **421**(6922): 499–506.
- Barkley, H. T., Jr., R. G. Martin, M. M. Romsdahl, R. Lindberg and G. K. Zagars (1988). "Treatment of soft tissue sarcomas by preoperative irradiation and conservative surgical resection." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **14**(4): 693–699.
- Barluenga, S., J. G. Fontaine, C. Wang, K. Aouadi, R. Chen, K. Beebe, L. Neckers and N. Winssinger (2009). "Inhibition of HSP90 with pochoximes: SAR and structure-based insights." *Chembiochem* **10**(17): 2753–2759.
- Barluenga, S., C. Wang, J. G. Fontaine, K. Aouadi, K. Beebe, S. Tsutsumi, L. Neckers and N. Winssinger (2008). "Divergent synthesis of a pochonin library targeting HSP90 and in vivo efficacy of an identified inhibitor." *Angew Chem Int Ed Engl* **47**(23): 4432–4435.
- Begg, A. C., F. A. Stewart and C. Vens (2011). "Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs." *Nat Rev Cancer* **11**(4): 239–253.
- Berkovich, E., R. J. Monnat, Jr. and M. B. Kastan (2007). "Roles of ATM and NBS1 in chromatin structure modulation and DNA double-strand break repair." *Nat Cell Biol* **9**(6): 683–690.
- Bhowmick, N. A., E. G. Neilson and H. L. Moses (2004). "Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression." *Nature* **432**(7015): 332–337.
- Blattmann, C., S. Oertel, V. Ehemann, M. Thiemann, P. E. Huber, M. Bischof, O. Witt, H. E. Deubzer, A. E. Kulozik, J. Debus and K. J. Weber (2010). "Enhancement of radiation response in osteosarcoma and rhabdomyosarcoma cell lines by histone deacetylase inhibition." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **78**(1): 237–245.
- Bonner, J.A., P.M. Harari, J. Giralt, R.B. Cohen, C.U. Jones, R.K. Sur, et al. (2010). "Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival." *Lancet Oncol* **11**(2010): 21–28.
- Bristow, R. G., S. Benchimol and R. P. Hill (1996). "The p53 gene as a modifier of intrinsic radiosensitivity: implications for radiotherapy." *Radiother Oncol* **40**(3): 197–223.
- Brown, J.S., B. O'Carrigan, S.P. Jackson, T.A. Yap (2017). "Targeting DNA repair in cancer: beyond PARP inhibitors." *Cancer Discov.* **7**(1): 20–37.
- Caldecott, K.W. (2014). "DNA single-strand break repair." *Exp Cell Res* **329**: 2–8.

- Camphausen, K. and P. J. Tofilon (2007). "Inhibition of Hsp90: a multitarget approach to radiosensitization." Clin Cancer Res **13**(15 Pt 1): 4326–4330.
- Canter, R. J., D. Borys, A. Olusanya, C. S. Li, L. Y. Lee, R. D. Boutin, S. D. Christensen, R. M. Tamurian and A. M. Monjazeb (2014). "Phase I trial of neoadjuvant conformal radiotherapy plus sorafenib for patients with locally advanced soft tissue sarcoma of the extremity." Ann Surg Oncol **21**(5): 1616–1623.
- Ceccaldi R., B. Rondinelli and A.D. D'Andrea (2015). "Repair pathway choices and consequences at the double-strand break." Trends Cell Biol **26**: 52–64.
- Cheng, E. Y., K. E. Dusenbery, M. R. Winters and R. C. Thompson (1996). "Soft tissue sarcomas: preoperative versus postoperative radiotherapy." J Surg Oncol **61**(2): 90–99.
- Cheng, N., A. Chytil, Y. Shyr, A. Joly and H. L. Moses (2008). "Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion." Mol Cancer Res **6**(10): 1521–1533.
- Ciccia, A. and S. J. Elledge (2010). "The DNA damage response: making it safe to play with knives." Mol Cell **40**(2): 179–204.
- Clark, M. A., C. Fisher, I. Judson and J. M. Thomas (2005). "Soft-tissue sarcomas in adults." N Engl J Med **353**(7): 701–711.
- Connell, P., C. A. Ballinger, J. Jiang, Y. Wu, L. J. Thompson, J. Hohfeld and C. Patterson (2001). "The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins." Nat Cell Biol **3**(1): 93–96.
- Costanzo, V., D. Shechter, P. J. Lupardus, K. A. Cimprich, M. Gottesman and J. Gautier (2003). "An ATR- and Cdc7-dependent DNA damage checkpoint that inhibits initiation of DNA replication". Mol Cell **11**: 203–13.
- Cormier, J. N. and R. E. Pollock (2004). "Soft tissue sarcomas." CA Cancer J Clin **54**(2): 94–109.
- Csermely, P., J. Kajtar, M. Hollosi, G. Jalsovszky, S. Holly, C. R. Kahn, P. Gergely, Jr., C. Soti, K. Mihaly and J. Somogyi (1993). "ATP induces a conformational change of the 90-kDa heat shock protein (hsp90)." J Biol Chem **268**(3): 1901–1907.
- Curtin, N. J. (2012). "DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target." Nat Rev Cancer **12**(12): 801–817.
- Curtis, K. K., J. B. Ashman, C. P. Beauchamp, A. J. Schwartz, M. D. Callister, A. C. Dueck, L. L. Gunderson and T. R. Fitch (2011). "Neoadjuvant chemoradiation compared to neoadjuvant radiation alone and surgery alone for Stage II and III soft tissue sarcoma of the extremities." Radiat Oncol **6**: 91.
- Davis A. and D. Chen (2013). "DNA double strand break repair via non-homologous end-joining." Transl Cancer Res **2**: 130–43.

- Debacq-Chainiaux, F., J. D. Erusalimsky, J. Campisi and O. Toussaint (2009). "Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo." *Nat Protoc* **4**(12): 1798–1806.
- DeLaney, T. F., A. V. Trofimov, M. Engelsman and H. D. Suit (2005). "Advanced-technology radiation therapy in the management of bone and soft tissue sarcomas." *Cancer Control* **12**(1): 27–35.
- Delmotte, P. and J. Delmotte-Plaque (1953). "A new antifungal substance of fungal origin." *Nature* **171**(4347): 344.
- Demand, J., S. Alberti, C. Patterson and J. Hohfeld (2001). "Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling." *Curr Biol* **11**(20): 1569–1577.
- Den, R. B. and B. Lu (2012). "Heat shock protein 90 inhibition: rationale and clinical potential." *Ther Adv Med Oncol* **4**(4): 211–218.
- Dinges, S., V. Budach, W. Budach, H. J. Feldmann, M. Stuschke and H. Sack (1994). "Local recurrences of soft tissue sarcomas in adults: a retrospective analysis of prognostic factors in 102 cases after surgery and radiation therapy." *Eur J Cancer* **30A**(11): 1636–1642.
- Donnelly A., B.S. Blagg (2008). "Novobiocin and additional inhibitors of the Hsp90 C-terminal nucleotide-binding pocket." *Curr Med Chem* **15**(26): 2702–17.
- Dote, H., W. E. Burgan, K. Camphausen and P. J. Tofilon (2006). "Inhibition of hsp90 compromises the DNA damage response to radiation." *Cancer Res* **66**(18): 9211–9220.
- Dupre, A., L. Boyer-Chatenet, R. M. Sattler, A. P. Modi, J. H. Lee, M. L. Nicolette, L. Kopolovich, M. Jasin, R. Baer, T. T. Paull and J. Gautier (2008). "A forward chemical genetic screen reveals an inhibitor of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex." *Nat Chem Biol* **4**(2): 119–125.
- Eccles, S. A., A. Massey, F. I. Raynaud, S. Y. Sharp, G. Box, M. Valenti, L. Patterson, A. de Haven Brandon, S. Gowan, F. Boxall, W. Aherne, M. Rowlands, A. Hayes, V. Martins, F. Urban, K. Boxall, C. Prodromou, L. Pearl, K. James, T. P. Matthews, K. M. Cheung, A. Kalusa, K. Jones, E. McDonald, X. Barril, P. A. Brough, J. E. Cansfield, B. Dymock, M. J. Drysdale, H. Finch, R. Howes, R. E. Hubbard, A. Surgenor, P. Webb, M. Wood, L. Wright and P. Workman (2008). "NVP-AUY922: a novel heat shock protein 90 inhibitor active against xenograft tumor growth, angiogenesis, and metastasis." *Cancer Res* **68**(8): 2850–2860.
- Ernst, A., H. Anders, H. Kapfhammer, M. Orth, R. Hennel, K. Seidl, N. Winssinger, C. Belka, S. Unkel, K. Lauber (2015). "HSP90 inhibition as a means of radiosensitizing resistant, aggressive soft tissue sarcoma." *Cancer Lett* **365** (2): 211–222.
- Falck, J., J. Coates and S. P. Jackson (2005). "Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage." *Nature* **434**(7033): 605–611.

- Felip, E., F. Barlesi, B. Besse, Q. Chu, L. Gandhi, S.W. Kim, E. Carcereny, L.V. Sequist, P. Brunsvig, C. Chouaid, E.F. Smit, H.J.M. Groen, D.W. Kim, K. Park, E. Avsar, S. Szpakowski, M. Akimov, E.B. Garon (2018). "Phase 2 Study of the HSP90 Inhibitor AUY922 in Previously Treated and Molecularly Defined Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer" *J Thorac Oncol* **13**(4): 576–584.
- Franken, N. A., A. L. Oei, H. P. Kok, H. M. Rodermond, P. Sminia, J. Crezee, L. J. Stalpers and G. W. Barendsen (2013). "Cell survival and radiosensitisation: modulation of the linear and quadratic parameters of the LQ model (Review)." *Int J Oncol* **42**(5): 1501–1515.
- Freeman, B. C. and R. I. Morimoto (1996). "The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding." *EMBO J* **15**(12): 2969–2979.
- Frit P., N. Barboule, Y. Yuan, D. Gomez and P. Calsou (2014). "Alternative end-joining pathway(s): bricolage at DNA breaks." *DNA Repair* **17**: 81–97.
- Fukuyo, Y., C. R. Hunt and N. Horikoshi (2010). "Geldanamycin and its anti-cancer activities." *Cancer Lett* **290**(1): 24–35.
- Gandhi, N., A. T. Wild, S. T. Chettiar, K. Aziz, Y. Kato, R. P. Gajula, R. D. Williams, J. A. Cades, A. Annadanam, D. Song, Y. Zhang, R. K. Hales, J. M. Herman, E. Armour, T. L. DeWeese, E. M. Schaeffer and P. T. Tran (2013). "Novel Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 radiosensitizes prostate cancer cells." *Cancer Biol Ther* **14**(4): 347–356.
- Gaspar, N., S. Y. Sharp, S. A. Eccles, S. Gowan, S. Popov, C. Jones, A. Pearson, G. Vassal and P. Workman (2010). "Mechanistic evaluation of the novel HSP90 inhibitor NVP-AUY922 in adult and pediatric glioblastoma." *Mol Cancer Ther* **9**(5): 1219–1233.
- Gilbert, N. F., C. P. Cannon, P. P. Lin and V. O. Lewis (2009). "Soft-tissue sarcoma." *J Am Acad Orthop Surg* **17**(1): 40–47.
- Grenert, J. P., W. P. Sullivan, P. Fadden, T. A. Haystead, J. Clark, E. Mimnaugh, H. Krutzsch, H. J. Ochel, T. W. Schulte, E. Sausville, L. M. Neckers and D. O. Toft (1997). "The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation." *J Biol Chem* **272**(38): 23843–23850.
- Ha, K., W. Fiskus, R. Rao, R. Balusu, S. Venkannagari, N. R. Nalabothula and K. N. Bhalla (2011). "Hsp90 inhibitor-mediated disruption of chaperone association of ATR with hsp90 sensitizes cancer cells to DNA damage." *Mol Cancer Ther* **10**(7): 1194–1206.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57–70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646–674.
- Harre, U., H. Keppeler, N. Ipseiz, A. Derer, K. Poller, M. Aigner, G. Schett, M. Herrmann and K. Lauber (2012). "Moonlighting osteoclasts as undertakers of apoptotic cells." *Autoimmunity* **45**(8): 612–619.

- He, M., S. Aisner, J. Benevenia, F. Patterson, L. E. Harrison and M. Hameed (2009). "Epigenetic alteration of p16INK4a gene in dedifferentiation of liposarcoma." Pathol Res Pract **205**(6): 386–394.
- Helman, L.J., P. Meltzer (2003). "Mechanisms of sarcoma development." Nat Rev Cancer **3**(9): 685–94
- Hendriks, L.E.L., A.C. Dingemans (2017). "Heat shock protein antagonists in early stage clinical trials for NSCLC." Expert Opin Investig Drugs **26**(5): 541–550.
- Hennel, R., N. Brix, K. Seidl, A. Ernst, H. Scheithauer, C. Belka and K. Lauber (2014). "Release of monocyte migration signals by breast cancer cell lines after ablative and fractionated gamma-irradiation." Radiat Oncol **9**(1): 85.
- Hyun S. Y., H.T. Le, C.T. Nguyen, Y.S. Yong, H.J. Boo, H.J. Lee, J.S. Lee, H.Y. Min, J. Ann, J. Chen, H.J. Park, J. Lee, H.Y. Lee (2018). "Development of a novel Hsp90 inhibitor NCT-50 as a potential anticancer agent for the treatment of non-small cell lung cancer." Sci Rep **8**(1): 13924.
- Isaacs, J. S., W. Xu and L. Neckers (2003). "Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics." Cancer Cell **3**(3): 213–217.
- Issels, R. D., L. H. Lindner, J. Verweij, P. Wust, P. Reichardt, B. C. Schem, S. Abdel-Rahman, S. Daugaard, C. Salat, C. M. Wendtner, Z. Vujaskovic, R. Wessalowski, K. W. Jauch, H. R. Durr, F. Ploner, A. Baur-Melnyk, U. Mansmann, W. Hiddemann, J. Y. Blay, P. Hohenberger, R. European Organisation for, T. Treatment of Cancer Soft, G. Bone Sarcoma and O. European Society for Hyperthermic (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): 561–570.
- Jackson S. P. and J. Bartek (2009). "The DNA-damage response in human biology and disease." Nature **461**: 1071-8.
- Jebsen, N. L., C. S. Trovik, H. C. Bauer, A. Rydholm, O. R. Monge, K. S. Hall, T. Alvegard and O. S. Bruland (2008). "Radiotherapy to improve local control regardless of surgical margin and malignancy grade in extremity and trunk wall soft tissue sarcoma: a Scandinavian sarcoma group study." Int J Radiat Oncol Biol Phys **71**(4): 1196–1203.
- Jego, G., A. Hazoume, R. Seigneuric and C. Garrido (2013). "Targeting heat shock proteins in cancer." Cancer Lett **332**(2): 275–285.
- Jensen, M. R., J. Schoepfer, T. Radimerski, A. Massey, C. T. Guy, J. Brueggen, C. Quadt, A. Buckler, R. Cozens, M. J. Drysdale, C. Garcia-Echeverria and P. Chene (2008). "NVP-AUY922: a small molecule HSP90 inhibitor with potent antitumor activity in preclinical breast cancer models." Breast Cancer Res **10**(2): R33.
- Jette N. and S. P. Lees-Miller (2015). "The DNA-dependent protein kinase: a multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosis." Prog Biophys Mol Biol **117**: 194–205.

- Jingu, K., H. Tsujii, J. E. Mizoe, A. Hasegawa, H. Bessho, R. Takagi, T. Morikawa, M. Tonogi, H. Tsuji, T. Kamada, S. Yamada and C. Organizing Committee for the Working Group for Head-and-Neck (2012). "Carbon ion radiation therapy improves the prognosis of unresectable adult bone and soft-tissue sarcoma of the head and neck." Int J Radiat Oncol Biol Phys **82**(5): 2125–2131.
- Johnson, J. L. and D. O. Toft (1994). "A novel chaperone complex for steroid receptors involving heat shock proteins, immunophilins, and p23." J Biol Chem **269**(40): 24989–24993.
- Johnson, V. A., E. K. Singh, L. A. Nazarova, L. D. Alexander and S. R. McAlpine (2010). "Macrocyclic inhibitors of hsp90." Curr Top Med Chem **10**(14): 1380–1402.
- Joliffe, I. T. and B. J. Morgan (1992). "Principal component analysis and exploratory factor analysis." Stat Methods Med Res **1**(1): 69–95.
- Kabakov, A. E., V. A. Kudryavtsev and V. L. Gabai (2010). "Hsp90 inhibitors as promising agents for radiotherapy." J Mol Med (Berl) **88**(3): 241–247.
- Karzai, A. W. and R. McMacken (1996). "A bipartite signaling mechanism involved in DnaJ-mediated activation of the Escherichia coli DnaK protein." J Biol Chem **271**(19): 11236–11246.
- Kinzel, L., A. Ernst, M. Orth, V. Albrecht, R. Hennel, N. Brix, B. Frey, U.S. Gaipl, G. Zuchtriegel, C.A. Reichel, A. Blutke, D. Schilling, G. Multhoff, M. Li, M. Niyazi, A.A. Friedl, N. Winssinger, C. Belka, K. Lauber (2016). "A novel HSP90 inhibitor with reduced hepatotoxicity synergizes with radiotherapy to induce apoptosis, abrogate clonogenic survival, and improve tumor control in models of colorectal cancer." Oncotarget **7**(28): 43199–43219.
- Kruzelock, R. P. and M. F. Hansen (1995). "Molecular genetics and cytogenetics of sarcomas." Hematol Oncol Clin North Am **9**(3): 513–540.
- Kwon, H. J., M. Yoshida, K. Abe, S. Horinouchi and T. Beppu (1992). "Radicicol, an agent inducing the reversal of transformed phenotypes of src-transformed fibroblasts." Bioosci Biotechnol Biochem **56**(3): 538–539.
- Lamarche, B. J., N. I. Orazio and M. D. Weitzman (2010). "The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance." FEBS Lett **584**(17): 3682–3695.
- Lauber, K., N. Brix, A. Ernst, R. Hennel, J. Krombach, H. Anders and C. Belka (2015). "Targeting the heat shock response in combination with radiotherapy: Sensitizing cancer cells to irradiation-induced cell death and heating up their immunogenicity." Cancer Lett **368**(2): 209–229.
- Lauber, K., A. Ernst, M. Orth, M. Herrmann and C. Belka (2012). "Dying cell clearance and its impact on the outcome of tumor radiotherapy." Front Oncol **2**: 116.
- Laufen, T., M. P. Mayer, C. Beisel, D. Klostermeier, A. Mogk, J. Reinstein and B. Bukau (1999). "Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5452–5457.

- Lemaître C. and E. Soutoglou (2014). "Double strand break (DSB) repair in heterochromatin and heterochromatin proteins in DSB repair." DNA Repair **19**: 163–8.
- Lianos, G. D., G. A. Alexiou, A. Mangano, A. Mangano, S. Rausei, L. Boni, G. Dionigi and D. H. Roukos (2015). "The role of heat shock proteins in cancer." Cancer Lett **360**(2): 114–118.
- Lichter, A.S., T.S. Lawrence (1995). "Recent advances in radiation oncology." J Med **332**(6):371–9.
- Lin, T. Y., M. Bear, Z. Du, K. P. Foley, W. Ying, J. Barsoum and C. London (2008). "The novel HSP90 inhibitor STA-9090 exhibits activity against Kit-dependent and -independent malignant mast cell tumors." Exp Hematol **36**(10): 1266–1277.
- Lindner, L.H., M. Angele, H.R. Dürr, J. Rauch and C. Bruns (2014). "Systemic therapy and hyperthermia for locally advanced soft tissue sarcoma." Chirurg **85**(5): 398-403.
- Lindner, L. H. and R. D. Issels (2011). "Hyperthermia in soft tissue sarcoma." Curr Treat Options Oncol **12**(1): 12–20.
- Look Hong, N. J., F. J. Hornicek, D. C. Harmon, E. Choy, Y. L. Chen, S. S. Yoon, G. P. Nielsen, J. Szymonifka, B. Y. Yeap, T. F. DeLaney and J. T. Mullen (2013). "Neoadjuvant chemoradiotherapy for patients with high-risk extremity and truncal sarcomas: a 10-year single institution retrospective study." Eur J Cancer **49**(4): 875–883.
- Lund-Andersen, C., S. Patzke, V. Nahse-Kumpf and R. G. Syljuasen (2014). "PLK1-inhibition can cause radiosensitization or radioresistance dependent on the treatment schedule." Radiother Oncol **110**(2): 355–361.
- Maloney, A. and P. Workman (2002). "HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds." Expert Opin Biol Ther **2**(1): 3–24.
- Maréchal A. and L. Zou (2013). "DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**: 1–18.
- McLaughlin, S. H., H. W. Smith and S. E. Jackson (2002). "Stimulation of the weak ATPase activity of human hsp90 by a client protein." J Mol Biol **315**(4): 787–798.
- Meyer, J. M., K. S. Perlewitz, J. B. Hayden, Y. C. Doung, A. Y. Hung, J. T. Vetto, R. F. Pomnier, A. Mansoor, B. R. Beckett, A. Tudorica, M. Mori, M. L. Holtorf, A. Afzal, W. J. Woodward, E. T. Rodler, R. L. Jones, W. Huang and C. W. Ryan (2013). "Phase I trial of preoperative chemoradiation plus sorafenib for high-risk extremity soft tissue sarcomas with dynamic contrast-enhanced MRI correlates." Clin Cancer Res **19**(24): 6902–6911.
- Mimnaugh, E. G., C. Chavany and L. Neckers (1996). "Polyubiquitination and proteasomal degradation of the p185c-erbB-2 receptor protein-tyrosine kinase induced by geldanamycin." J Biol Chem **271**(37): 22796–22801.
- Mirzoeva, O. K. and J. H. Petrini (2001). "DNA damage-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex." Mol Cell Biol **21**(1): 281–288.

- Misra A., N. Mistry, R. Grimer, F. Peart (2009). "The management of soft tissue sarcoma." JPRAS **62(2)**: 161–74.
- Moser, C., S. A. Lang, C. Hackl, C. Wagner, E. Scheiffert, H. J. Schlitt, E. K. Geissler and O. Stoeltzing (2012). "Targeting HSP90 by the novel inhibitor NVP-AUY922 reduces growth and angiogenesis of pancreatic cancer." Anticancer Res **32(7)**: 2551–2561.
- Muller, C. R., E. B. Paulsen, P. Noordhuis, F. Pedeutour, G. Saeter and O. Myklebost (2007). "Potential for treatment of liposarcomas with the MDM2 antagonist Nutlin-3A." Int J Cancer **121(1)**: 199–205.
- Murphy, J. D., D. R. Lucas, Y. R. Somnay, D. A. Hamstra and M. E. Ray (2008). "Gemcitabine-mediated radiosensitization of human soft tissue sarcoma." Transl Oncol **1(1)**: 50–56.
- Murphy, J. D., A. C. Spalding, Y. R. Somnay, S. Markwart, M. E. Ray and D. A. Hamstra (2009). "Inhibition of mTOR radiosensitizes soft tissue sarcoma and tumor vasculature." Clin Cancer Res **15(2)**: 589–596.
- Neckers, L. (2002). "Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents." Trends Mol Med **8(4 Suppl)**: S55–61.
- Neckers, L. (2007). "Heat shock protein 90: the cancer chaperone." J Biosci **32(3)**: 517–530.
- Neckers, L. and K. Neckers (2002). "Heat-shock protein 90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents." Expert Opin Emerg Drugs **7(2)**: 277–288.
- Nelms, B. E., R. S. Maser, J. F. MacKay, M. G. Lagally and J. H. Petrini (1998). "In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts." Science **280(5363)**: 590–592.
- O'Sullivan, B., A. M. Davis, R. Turcotte, R. Bell, C. Catton, P. Chabot, J. Wunder, R. Kandel, K. Goddard, A. Sadura, J. Pater and B. Zee (2002). "Preoperative versus postoperative radiotherapy in soft-tissue sarcoma of the limbs: a randomised trial." Lancet **359(9325)**: 2235–2241.
- Obermann, W. M., H. Sondermann, A. A. Russo, N. P. Pavletich and F. U. Hartl (1998). "In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis." J Cell Biol **143(4)**: 901–910.
- Ochi T., A. N. Blackford, J. Coates, S. Jhujh, S. Mehmood, N. Tamura, et al. (2015). "DNA repair. PAXX, a paralog of XRCC4 and XLF, interacts with Ku to promote DNA double-strand break repair." Science **347** (6218): 185–8.
- Okui, T., T. Shimo, T. Fukazawa, N. Mohammad Monsur Hassan, T. Honami, S. Ibaragi, M. Takaoka, Y. Naomoto and A. Sasaki (2013). "Novel HSP90 inhibitor NVP-AUY922 enhances the anti-tumor effect of temsirolimus against oral squamous cell carcinoma." Curr Cancer Drug Targets **13(3)**: 289–299.
- Oliner, J. D., K. W. Kinzler, P. S. Meltzer, D. L. George and B. Vogelstein (1992). "Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas." Nature **358(6381)**: 80–83.

- Orth, M., K. Lauber, M. Niyazi, A. A. Friedl, M. Li, C. Maihofer, L. Schuttrumpf, A. Ernst, O. M. Niemoller and C. Belka (2014). "Current concepts in clinical radiation oncology." Radiat Environ Biophys **53**(1): 1–29.
- Panaretou, B., C. Prodromou, S. M. Roe, R. O'Brien, J. E. Ladbury, P. W. Piper and L. H. Pearl (1998). "ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo." EMBO J **17**(16): 4829–4836.
- Panaretou, B., G. Siligardi, P. Meyer, A. Maloney, J. K. Sullivan, S. Singh, S. H. Millson, P. A. Clarke, S. Naaby-Hansen, R. Stein, R. Cramer, M. Mollapour, P. Workman, P. W. Piper, L. H. Pearl and C. Prodromou (2002). "Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha1." Mol Cell **10**(6): 1307–1318.
- Picard, D. (2002). "Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation." Cell Mol Life Sci **59**(10): 1640–1648.
- Pisters, P. W., L. B. Harrison, D. H. Leung, J. M. Woodruff, E. S. Casper and M. F. Brennan (1996). "Long-term results of a prospective randomized trial of adjuvant brachytherapy in soft tissue sarcoma." J Clin Oncol **14**(3): 859–868.
- Pollack, A., G. K. Zagars, M. S. Goswitz, R. A. Pollock, B. W. Feig and P. W. Pisters (1998). "Preoperative vs. postoperative radiotherapy in the treatment of soft tissue sarcomas: a matter of presentation." Int J Radiat Oncol Biol Phys **42**(3): 563–572.
- Powers, M. V. and P. Workman (2006). "Targeting of multiple signalling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors." Endocr Relat Cancer **13 Suppl 1**: S125–135.
- Prodromou, C., B. Panaretou, S. Chohan, G. Siligardi, R. O'Brien, J. E. Ladbury, S. M. Roe, P. W. Piper and L. H. Pearl (2000). "The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains." EMBO J **19**(16): 4383–4392.
- Prodromou, C. and L. H. Pearl (2003). "Structure and functional relationships of Hsp90." Curr Cancer Drug Targets **3**(5): 301–323.
- Rao, A., J.L. Taylor, N. Chi-Sabins, M. Kawabe, W.E. Gooding, W.J. Storkus (2012). "Combination therapy with HSP90 inhibitor 17-DMAG reconditions the tumor microenvironment to improve recruitment of therapeutic T cells." Clin. Cancer Res. **72**: 3196–3206.
- Rao, S. S., C. Thompson, J. Cheng, A. Haimovitz-Friedman, S. N. Powell, Z. Fuks and R. N. Kolesnick (2014). "Axitinib sensitization of high Single Dose Radiotherapy." Radiother Oncol **111**(1): 88–93.
- Reinhardt, H. C. and M. B. Yaffe (2009). "Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2." Curr Opin Cell Biol **21**(2): 245–255.
- Riccardi, C. and I. Nicoletti (2006). "Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." Nat Protoc **1**(3): 1458–1461.

- Rogakou E. P., C. Boon, C. Redon and W. M. Bonner (1999). "Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo." *J Cell Biol* **146**: 905-16.
- Rosenberg, S. A., J. Tepper, E. Glatstein, J. Costa, A. Baker, M. Brennan, E. V. DeMoss, C. Seipp, W. F. Sindelar, P. Sugarbaker and R. Wesley (1982). "The treatment of soft-tissue sarcomas of the extremities: prospective randomized evaluations of (1) limb-sparing surgery plus radiation therapy compared with amputation and (2) the role of adjuvant chemotherapy." *Ann Surg* **196**(3): 305–315.
- Rouleau, M., A. Patel, M.J. Hendzel, S.H. Kaufmann, G.G. Poirier (2010). "PARP inhibition: PARP1 and beyond." *Nat Rev Cancer* **10**(2010): 293–301.
- Sadikovic, B., M. Yoshimoto, K. Al-Romaih, G. Maire, M. Zielenska and J. A. Squire (2008). "In vitro analysis of integrated global high-resolution DNA methylation profiling with genomic imbalance and gene expression in osteosarcoma." *PLoS One* **3**(7): e2834.
- Sadoski, C., H. D. Suit, A. Rosenberg, H. Mankin and J. Efid (1993). "Preoperative radiation, surgical margins, and local control of extremity sarcomas of soft tissues." *J Surg Oncol* **52**(4): 223–230.
- Saif, M.W., C. Takimoto, M. Mita, U. Banerji, N. Lamanna, J. Castro, S. O'Brien, C. Stogard, D. von Hoff (2014). "A phase 1, dose-escalation, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of BIIB021 administered orally in patients with advanced solid tumors." *Cancer Res* **20**: 445–455.
- Schaser, K. D., I. Melcher, U. Settmacher and N. P. Haas (2004). "[The multidisciplinary approach to reconstructive surgery of the extremities-considerations for trauma and orthopedic surgery]." *Chirurg* **75**(4): 399–410.
- Schulte, T. W., S. Akinaga, S. Soga, W. Sullivan, B. Stensgard, D. Toft and L. M. Neckers (1998). "Antibiotic radicicol binds to the N-terminal domain of Hsp90 and shares important biologic activities with geldanamycin." *Cell Stress Chaperones* **3**(2): 100–108.
- Seidel, C., U. Schagdarsurengin, K. Blumke, P. Wurl, G. P. Pfeifer, S. Hauptmann, H. Taubert and R. Dammann (2007). "Frequent hypermethylation of MST1 and MST2 in soft tissue sarcoma." *Mol Carcinog* **46**(10): 865–871.
- Semenza, G. L. (2002). "HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics." *Trends Mol Med* **8**(4 Suppl): S62–67.
- Sharma, A., B. Bode, G. Studer, H. Moch, M. Okoniewski, A. Knuth, L. von Boehmer and M. van den Broek (2013). "Radiotherapy of human sarcoma promotes an intratumoral immune effector signature." *Clin Cancer Res* **19**(17): 4843–4853.
- Sharma, K., R. M. Vabulas, B. Macek, S. Pinkert, J. Cox, M. Mann and F. U. Hartl (2012). "Quantitative proteomics reveals that Hsp90 inhibition preferentially targets kinases and the DNA damage response." *Mol Cell Proteomics* **11**(3): M111 014654.
- Shiloh, Y. (2006). "The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape." *Trends Biochem Sci* **31**(7): 402–410.

- Shiloh Y. and Y. Ziv (2013). "The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more." Nat Rev Mol Cell Biol **14**: 197-210.
- Shimamura, T., S. A. Perera, K. P. Foley, J. Sang, S. J. Rodig, T. Inoue, L. Chen, D. Li, J. Carretero, Y. C. Li, P. Sinha, C. D. Carey, C. L. Borgman, J. P. Jimenez, M. Meyerson, W. Ying, J. Barsoum, K. K. Wong and G. I. Shapiro (2012). "Ganetespib (STA-9090), a nongeldanamycin HSP90 inhibitor, has potent antitumor activity in in vitro and in vivo models of non-small cell lung cancer." Clin Cancer Res **18**(18): 4973–4985.
- Shrivastav, M., L. P. De Haro and J. A. Nickoloff (2008). "Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice." Cell Res **18**(1): 134–147.
- Siligardi, G., B. Panaretou, P. Meyer, S. Singh, D. N. Woolfson, P. W. Piper, L. H. Pearl and C. Prodromou (2002). "Regulation of Hsp90 ATPase activity by the co-chaperone Cdc37p/p50cdc37." J Biol Chem **277**(23): 20151–20159.
- Singer, S., N. D. Socci, G. Ambrosini, E. Sambol, P. Decarolis, Y. Wu, R. O'Connor, R. Maki, A. Viale, C. Sander, G. K.
- Schwartz and C. R. Antonescu (2007). "Gene expression profiling of liposarcoma identifies distinct biological types/subtypes and potential therapeutic targets in well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma." Cancer Res **67**(14): 6626–6636.
- Sirvent, N., J. M. Coindre, G. Maire, I. Hostein, F. Keslair, L. Guillou, D. Ranchere-Vince, P. Terrier and F. Pedeutour (2007). "Detection of MDM2-CDK4 amplification by fluorescence in situ hybridization in 200 paraffin-embedded tumor samples: utility in diagnosing adipocytic lesions and comparison with immunohistochemistry and real-time PCR." Am J Surg Pathol **31**(10): 1476–1489.
- Slichenmyer, W. J., W. G. Nelson, R. J. Slebos and M. B. Kastan (1993). "Loss of a p53-associated G1 checkpoint does not decrease cell survival following DNA damage." Cancer Res **53**(18): 4164–4168.
- Smith, J., L. M. Tho, N. Xu and D. A. Gillespie (2010). "The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer." Adv Cancer Res **108**: 73–112.
- Stebbins, C. E., A. A. Russo, C. Schneider, N. Rosen, F. U. Hartl and N. P. Pavletich (1997). "Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent." Cell **89**(2): 239–250.
- Steinau, H. U., H. H. Homann, D. Drucke, A. Torres, D. Soimaru and P. Vogt (2001). "[Re-section method and functional restoration in soft tissue sarcomas of the extremities]." Chirurg **72**(5): 501–513.
- Stingl, L., T. Stuhmer, M. Chatterjee, M. R. Jensen, M. Flentje and C. S. Djuzenova (2010). "Novel HSP90 inhibitors, NVP-AUY922 and NVP-BEP800, radiosensitise tumour cells through cell-cycle impairment, increased DNA damage and repair protraction." Br J Cancer **102**(11): 1578–1591.

- Stracker T. H., T. Usui and J. H. J. Petrini (2009). "Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response." DNA Repair **8**: 1047-54.
- Strander, H., I. Turesson, E. Cavallin-Stahl (2003). "A systematic overview of radiation therapy effects in soft tissue sarcomas." Acta Oncologica **42**: (5-6)526–31.
- Stratton, M. R., S. Moss, W. Warren, H. Patterson, J. Clark, C. Fisher, C. D. Fletcher, A. Ball, M. Thomas, B. A. Gusterson and et al. (1990). "Mutation of the p53 gene in human soft tissue sarcomas: association with abnormalities of the RB1 gene." Oncogene **5**(9): 1297–1301.
- Stucki M., J. A. Clapperton, D. Mohammad, M.B. Yaffe, S. J. Smerdon and S. P. Jackson (2005). "MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks." Cell **123**: 1213-26.
- Supko, J. G., R. L. Hickman, M. R. Grever and L. Malspeis (1995). "Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent." Cancer Chemother Pharmacol **36**(4): 305–315.
- Taipale, M., D. F. Jarosz and S. Lindquist (2010). "HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(7): 515–528.
- Tatokoro, M., F. Koga, S. Yoshida and K. Kihara (2015). "Heat shock protein 90 targeting therapy: state of the art and future perspective." EXCLI J **14**: 48–58.
- Taylor, B. S., J. Barretina, R. G. Maki, C. R. Antonescu, S. Singer and M. Ladanyi (2011). "Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets." Nat Rev Cancer **11**(8): 541–557.
- Terracciano S., A. Russo, M.G. Chini, M.C. Vaccaro, M. Potenza, A. Vassallo, R. Riccio, G. Bifulco, I. Bruno (2018). "Discovery of new molecular entities able to strongly interfere with Hsp90 C-terminal domain." Sci Rep **8**(1): 1709
- Tichy, A., J. Vavrova, J. Pejchal and M. Rezacova (2010). "Ataxia-telangiectasia mutated kinase (ATM) as a central regulator of radiation-induced DNA damage response." Acta Medica (Hradec Kralove) **53**(1): 13–17.
- Unkel, S., C. Belka, K. Lauber (2016). "On the analysis of clonogenic survival data: Statistical alternatives to the linear-quadratic model." Radiat Oncol **11**: 11.
- Vignard J., G. Mirey, B. Salles (2013). "Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: a direct and indirect lighting up." Radiother Oncol **108**(3): 362–9.
- Wagner, A. J., R. Chugh, L. S. Rosen, J. A. Morgan, S. George, M. Gordon, J. Dunbar, E. Normant, D. Grayzel and G. D. Demetri (2013). "A phase I study of the HSP90 inhibitor retaspimycin hydrochloride (IPI-504) in patients with gastrointestinal stromal tumors or soft-tissue sarcomas." Clin Cancer Res **19**(21): 6020–6029.

- Wagner, B. J., D. Lindau, D. Ripper, Y. D. Stierhof, J. Glatzle, M. Witte, H. Beck, H. Keppler, K. Lauber, H. G. Rammensee and A. Konigsrainer (2011). "Phagocytosis of dying tumor cells by human peritoneal mesothelial cells." *J Cell Sci* **124**(Pt 10): 1644–1654.
- Wang, C., S. Barluenga, G. K. Koripelly, J. G. Fontaine, R. Chen, J. C. Yu, X. Shen, J. C. Chabala, J. V. Heck, A. Rubenstein and N. Winssinger (2009). "Synthesis of pochoxime prodrugs as potent HSP90 inhibitors." *Bioorg Med Chem Lett* **19**(14): 3836–3840.
- Wang, H., L. Mingjie, Y. Mengqian, Z. Wei (2016). "Effects of treatment with an Hsp90 inhibitor in tumors based on 15 phase II clinical trials." *Mol Clin Oncol* **5**(3): 326–334.
- Weber, A. M. and A. J. Ryan (2015). "ATM and ATR as therapeutic targets in cancer." *Pharmacol Ther* **149**: 124–138.
- Whitesell, L. and N. U. Lin (2012). "HSP90 as a platform for the assembly of more effective cancer chemotherapy." *Biochim Biophys Acta* **1823**(3): 756–766.
- Whitesell, L., S.L. Lindquist (2005). "HSP90 and the chaperoning of cancer." *Nat. Rev. Cancer* **5**: 761–772.
- Whitesell, L., E. G. Mimnaugh, B. De Costa, C. E. Myers and L. M. Neckers (1994). "Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(18): 8324–8328.
- Workman, P. (2004). "Combinatorial attack on multistep oncogenesis by inhibiting the Hsp90 molecular chaperone." *Cancer Lett* **206**(2): 149–157.
- Workman, P. (2005). "Drugging the cancer kinome: progress and challenges in developing personalized molecular cancer therapeutics." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **70**: 499–515.
- Xu, W., M. Marcu, X. Yuan, E. Mimnaugh, C. Patterson and L. Neckers (2002). "Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c-ErbB2/Neu." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(20): 12847–12852.
- Yang, J. C., A. E. Chang, A. R. Baker, W. F. Sindelar, D. N. Danforth, S. L. Topalian, T. DeLaney, E. Glatstein, S. M. Steinberg, M. J. Merino and S. A. Rosenberg (1998). "Randomized prospective study of the benefit of adjuvant radiation therapy in the treatment of soft tissue sarcomas of the extremity." *J Clin Oncol* **16**(1): 197–203.
- Yang, J. C. and S. A. Rosenberg (1989). "Surgery for adult patients with soft tissue sarcomas." *Semin Oncol* **16**(4): 289–296.
- You, Z., C. Chahwan, J. Bailis, T. Hunter and P. Russell (2005). "ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1." *Mol Cell Biol* **25**(13): 5363–5379.
- Young, J. C., V. R. Agashe, K. Siegers and F. U. Hartl (2004). "Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(10): 781–791.

- Young, J. C. and F. U. Hartl (2000). "Polypeptide release by Hsp90 involves ATP hydrolysis and is enhanced by the co-chaperone p23." EMBO J **19**(21): 5930–5940.
- Zagars, G. K., M. T. Ballo, P. W. Pisters, R. E. Pollock, S. R. Patel and R. S. Benjamin (2003). "Preoperative vs. postoperative radiation therapy for soft tissue sarcoma: a retrospective comparative evaluation of disease outcome." Int J Radiat Oncol Biol Phys **56**(2): 482–488.
- Zahm, S. H. and J. F. Fraumeni, Jr. (1997). "The epidemiology of soft tissue sarcoma." Semin Oncol **24**(5): 504-514.
- Zaidi, S., M. McLaughlin, S. A. Bhide, S. A. Eccles, P. Workman, C. M. Nutting, R. A. Hurdart and K. J. Harrington (2012). "The HSP90 inhibitor NVP-AUY922 radiosensitizes by abrogation of homologous recombination resulting in mitotic entry with unresolved DNA damage." PLoS One **7**(4): e35436.9.

Anmerkung

Sämtliche Daten, die Abbildungen 4–9 sowie Inhalt der Kapitel 1–7 – soweit nicht anders vermerkt – wurden aus Ernst, Anders, Kapfhammer et al. (2015) übernommen.

Beiträge der Autoren und Mitarbeiter

Klonogenes Überleben: Heidi Kapfhammer und Viola Blockus

qRT-PCR: Heidi Kapfhammer

Viabilitätsassays: Heidi Kapfhammer und Heike Anders

γ -H2AX-Immunfluoreszenzfärbung: Heike Anders, Michael Orth

FACS-Analysen: Heidi Kapfhammer, Anne Ernst, Heike Anders,

Statistische Auswertung: Steffen Unkel, Kirsten Lauber

7 Anhang

Tabelle 1: qPCR-Primer

Name	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
ATM	TGTTCCAGGACACGAAGGGAGA	CAGGGTTCTCAGCACTATGGGA
ATR	GGAGATTTCTGAGCATGTTCCG	GGCTTCTTTACTCCAGACCAATC
BLM	GGTGATAAGACTGACTCAGAAGC	AACGTGCCAAGAGCTTCCTCTC
BRCA1	CTGAAGACTGCTCAGGGCTATC	AGGGTAGCTGTTAGAAGGCTGG
BRCA2	GGCTTCAAAAAGCACTCCAGATG	GGATTCTGTATCTCTTGACGTTCC
BRIP1	TCTGGAGTTGGTGAAGACAGTCA	CCACGACAAACTGCTACCAGGA
CHK1	GTGTCAGAGTCTCCAGTGGAT	GTTCTGGCTGAGAACTGGAGTAC
CHK2	GACCAAGAACCTGAGGAGCCTA	GGATCAGATGACAGCAGGAGTTC
DCLRE1C	GAGCTAGAACAGTTCACCGAGAC	CAGGCTGCTTTTCTGATACTGCA
DNAPKcs	GCGCCATATCTGTCATCTGCTG	TTATAGCGGCGCTTCAGGTCGA
DNA2	GATTTCTGGCACCAGCATAGCC	ACACCTCATGGAGAACCGTACC
EXO1	TCGGATCTCCTAGCTTTTGGCTG	AGCTGTCTGCACATTCCTAGCC
FANCA	CAGAACCCAACTCTGCTGAGGA	ATCACTGCCACCTGTGCCGATA
FEN1	ACTAAGCGGCTGGTGAAGGTCA	GCAGCATAGACTTTGCCAGCCT
Ku70	GGTTTCAAGCCGTTGGTACTGC	CTCCAGACACTTGATGAGCAGAG
Ku80	GTTCTAAAGGTCTTTGCAGCAAGA	AAAAGCCACGCCGACTTGAGGA
LIG4	CAGCAGAGATCGTACCCAGTGA	TGCGAGCTTACCAGATGCCTTC
MRE11A	CAGCAACCAACAAAGGAAGAGGC	GAGTTCCTGCTACGGGTAGAAG
NBS1	TCTGTCAGGACGGCAGGAAAGA	CACCTCCAAAGACAACCTGCGGA
PALB2	GGAGCTGCATAAACATTCGTCG	CTACGGAACAGGAACCTGAAGG
PARP1	CCAAGCCAGTTCAGGACCTCAT	GGATCTGCCTTTTGCTCAGCTTC
PARP2	GGTGGCTTGTTCAAGCAATCTC	GGTGGCATAGTCCATCTGTAGC
RAD50	GGAAGAGCAGTTGTCCAGTTACG	GAGTAAACTGCTGTGGCTCCAG
RAD51	TCTCTGGCAGTGATGTCCTGGA	TAAAGGGCGGTGGCACTGTCTA
RAD52	GCCCAGAATACATAAGTAGCCGC	CCACATTCTGCTGCGTGATGGA
RAD54	ACGGCGTTAGTGGTTTGTCTC	GCAGCATGTAGCTTCTCTCCTG

Name	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
RBBP8	TGGCAGACAGTTTCTCCCAAGC	GGCTCCACAAACGCTTTCTGCT
XLF	CAGTCACCACACAAGAGGTCCA	TGAGGAGACCAGTTGTTCTGGC
XRCC1	CGGATGAGAACACGGACAGTGA	GAAGGCTGTGACGTATCGGATG
XRCC2	TCTGTTTGCTGATGAAGATTCACC	CATCGTGCTGTTAGGTGATAAAGC
XRCC3	TGACGTTCCAGGAGAGCTGCTT	GATGACCACCAGGCGAGCCAT
XRCC4	ATGGCTCCTCAGGAGAATCAGC	GAGGTCTTCTGGGCTGCTGTTT

Danksagung

Vielen Dank an Prof. Dr. Claus Belka für die Möglichkeit und Unterstützung, im Labor für Molekulare Onkologie die Forschungsarbeiten im Rahmen meiner Dissertation durchzuführen zu können.

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Kirsten Lauber für ihr Vertrauen, ihre stete Unterstützung, ihre Ideen und ihre Geduld nicht nur während meiner Zeit im Labor.

Vielen Dank natürlich auch an Anne Ernst, für ihre großartige Betreuung, zuverlässige Hilfe und Geduld zu jeder Zeit.

Ein besonderer Dank geht an Anne Ernst, Heike Anders, Viola Blockus, Karin Seidl, Michael Orth, Roman Hennel, Steffen Unkel, Prof. Dr. Claus Belka und Prof. Dr. Kirsten Lauber, für die gemeinsame Arbeit und die Beiträge zu unserer Arbeit "HSP90 inhibition as a means of radiosensitizing resistant, aggressive soft tissue sarcoma."

Vielen Dank an Nicolas Winssinger für die Bereitstellung von NW457.

Mein Dank gilt all meinen Kollegen die mich während meiner Arbeit im Labor jeden Tag mit Rat und Tat unterstützt haben: Linda Kinzel, Roman Hennel, Seyd Shnayien, Viola Blockus, Karin Seidl, Heike Anders und Michael Orth. Vielen Dank, Anne, Seyd, Michael und Heike für die Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern Britta und Andreas Kapfhammer, die mich nicht nur auf meinem Weg durch das Studium begleitet haben.

Eidesstattliche Versicherung

Kapfhammer, Heidi

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Strahlentherapie plus HSP90-Inhibition:

Radiosensibilisierung von strahlenresistenten, aggressiven Weichgewebssarkomen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlichgemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Hamburg, 28.07.2020

Heidi Kapfhammer

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin