

**Die Bedeutung des Hitzeschockproteins HSP90 für die
Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen unterschiedlicher
Entitäten**

Dissertation
zur
Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von
Dipl. Biol. Lavinia Stingl
aus Bukarest, Rumänien

Würzburg, 2012

Eingereicht am: _____

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. W. Rössler

1. Gutachterin: PD Dr. T. Djuzenova

2. Gutachter: Prof. Dr. R. Benz

Tag des Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
1. Einleitung	9
1.1. Allgemeines zur klinischen Strahlenbiologie	9
1.2. Neuartige molekulare Strategien für die adjuvante Strahlentherapie.....	15
1.3. HSP90 als molekulares Target für die Radiosensibilisierung	16
1.4. Zelluläre Wirkungen der HSP90-Inhibition	22
1.5. Zielsetzung der Arbeit	25
2. Material und Methoden	27
2.1. Zelllinien und Zellkultur	27
2.2. Behandlung	28
2.3. Röntgenbestrahlung	28
2.4. <i>In vitro</i> Zytotoxizitätstest	29
2.5. <i>In vitro</i> Zellproliferationstest	30
2.6. Kolonietest	30
2.7. Proteindetektion mittels SDS-PAGE/Western Blot	31
2.8. Durchflusszytometrie	35
2.9. Alkaliner Comet Assay	36
2.10. siRNA Transfektion	37
2.11. Reverse Transkriptase PCR	38
2.12. Sonstige Chemikalien	40
2.13. Plastik- und Glasmaterial	40
2.14. Statistik	40
3. Ergebnisse	41
3.1. Modulation der Strahlenempfindlichkeit humaner Tumorzelllinien mittels der neuartigen HSP90-Inhibitoren NVP-AUY922 und NVP-BEP800	41
3.1.1. Bestimmung der Zellviabilität nach HSP90-Inhibition	41
3.1.2. Einfluss von HSP90-Inhibition und Bestrahlung auf die Koloniebildungsfähigkeit	43
3.1.3. Messung der subG1-Fraktion nach HSP90-Inhibition und Bestrahlung	46

3.1.4.	Einfluss von HSP90-Inhibition und Bestrahlung auf die Expression von Apoptose-regulierenden Proteinen	54
3.1.5.	Messung der DNA-Fragmentierung nach HSP90-Inhibition und Bestrahlung	59
3.1.6.	Einfluss von HSP90-Inhibition und Bestrahlung auf die DNA-Schäden	62
3.1.7.	Einfluss von HSP90-Inhibition und Bestrahlung auf die Expression von DNA-Reparaturproteinen	68
3.1.8.	Einfluss von HSP90-Inhibition und Bestrahlung auf den Zellzyklus	69
3.1.9.	Einfluss von HSP90-Inhibition und Bestrahlung auf die Expression von Zellzyklus-assoziierten Proteinen	79
3.2.	Einfluss des siRNA-vermittelten HSP90α-Knock-downs alleine oder in Kombination mit HSP90-Inhibition auf die Strahlenantwort humaner Tumorzelllinien	83
3.2.1.	Nachweis des HSP90 α -Knock-downs auf mRNA- und Proteinebene.....	84
3.2.2.	Einfluss von HSP90 α -Knock-down und Bestrahlung auf die Koloniebildungsfähigkeit	86
3.2.3.	Einfluss von HSP90 α -Knock-down, HSP90-Inhibition mittels NVP-AUY922 und Bestrahlung auf die Zellviabilität.....	88
3.2.4.	Einfluss von HSP90 α -Knock-down, HSP90-Inhibition mittels NVP-AUY922 und Bestrahlung auf die Proliferationsrate	89
3.2.5.	Einfluss des HSP90 α -Knock-downs auf die NVP-AUY922-vermittelte Radiosensibilisierung	90
3.2.6.	Einfluss von HSP90 α -Knock-down, HSP90-Inhibition mittels NVP-AUY922 und Bestrahlung auf den Zellzyklus	92
3.2.7.	Einfluss von HSP90 α -Knock-down, HSP90-Inhibition mittels NVP-AUY922 und Bestrahlung auf die Expression von Markerproteinen.....	96
3.2.8.	Einfluss von HSP90 α -Knock-down, HSP90-Inhibition mittels NVP-AUY922 und Bestrahlung auf die DNA-Schäden.....	99
3.3.	Einfluss der Suppression der Stressantwort nach HSP90-Inhibition mittels des HSF-1-Inhibitors KNK437 auf die Strahlenantwort humaner Tumorzelllinien	102
3.3.1.	Bestimmung der Zellviabilität nach Behandlung mit KNK437 allein oder in Kombination mit NVP-AUY922	102

3.3.2.	Einfluss der Behandlung mit KNK437 auf die NVP-AUY922-vermittelte Radiosensibilisierung	104
3.3.3.	Einfluss der Behandlung mit KNK437 allein oder in Kombination mit NVP-AUY922 und Bestrahlung auf die Expression diverser Markerproteine	107
3.3.4.	Einfluss der Behandlung mit KNK437 allein oder in Kombination mit NVP-AUY922 und Bestrahlung auf den Zellzyklus	114
3.3.5.	Einfluss der Behandlung mit KNK437 allein oder in Kombination mit NVP-AUY922 und Bestrahlung auf die DNA-Schäden	124
4.	Diskussion	
4.1.	Modulation der Strahlenempfindlichkeit humaner Tumorzelllinien mittels der neuartigen HSP90-Inhibitoren NVP-AUY922 und NVP-BEP800	130
4.2.	Einfluss des siRNA-vermittelten HSP90 α -Knock-downs alleine oder in Kombination mit HSP90-Inhibition auf die Strahlenantwort humaner Tumorzelllinien	140
4.3.	Einfluss der Suppression der Stressantwort nach HSP90-Inhibition mittels des HSF-1-Inhibitors KNK437 auf die Strahlenantwort humaner Tumorzelllinien	142
4.5.	Zusammenfassung und Ausblick	145
4.6.	Summary and Outlook	149
5.	Literaturverzeichnis	153
	Eidesstattliche Erklärung	163

Abkürzungsverzeichnis

γ H2AX	phosphorylierte Form der Histon-Variante H2AX
17-AAG	17-Allylamino-17-desmethoxygeldanamycin, HSP90 Inhibitor
17-DMAG	17-Dimethylaminoethylamino-17-desmethoxygeldanamycin, HSP90-Inhibitor
a. u.	arbitrary units, relative Einheiten
AKT	Proteinkinase B, Komponente des pro-survival Signaltransduktionsweges RAS/PI3K/AKT
ATM	Ataxia telangiectasia mutated kinase, Detektion und Reparatur der DSB
ATP	Adenosin triphosphat, wichtigster zellulärer Energieträger
BCL-2	B-cell lymphoma 2, Mitglied einer Apoptose-regulierenden Proteinfamilie
bp	Basenpaar(e)
BRCA-2	breast cancer 2 susceptibility protein, DSB-Reparaturprotein involviert in HR
BrdU	Bromdesoxyuridin, Tymidin-Analogon
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
CDK	cyclin-dependent kinase, Zellzyklus-regulierende Kinase
CHK-1/CHK-2	checkpoint Kinasen, inhibieren die Aktivierung von CDKs und vermitteln dadurch den Zellzyklusarrest zusammen mit ATM/ATR
D10	Bestrahlungsdosis, bei der 10 % der Zellen überleben
DMSO	Dimethylsulfoxid, organisches Lösungsmittel
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA dependent protein kinase, DSB-Reparaturprotein involviert in NHEJ
DNase	Desoxyribonuklease, DNA abbauende Nuklease
DSB	Doppelstrangbruch der DNA
ECL	enhanced chemiluminescence, verstärkte Chemilumineszenzreaktion
EDTA	Etylendiamidtetraacetat
ERK/MAPK	mitogen activated protein kinase, Komponente des Signaltransduktionsweges RAS/RAF/MEK/ERK
FACS	fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FCS	fetal calf serum, fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Enzym der Glykolyse
Gy	Gray, Einheit der Energiedosis
HR	Homologe Rekombination, Mechanismus involviert in der DSB-Reparatur

HSP	Hitzeschockprotein
IR	ionising radiation, Ionisierende Strahlung
kDa	Kilodalton
KNK437	N-formyl-3, 4-methylenedioxy-benzylidene- γ -butyrolactam, HSP-Inhibitor
KU70/KU80	DNA-Reparaturproteine involviert in NHEJ
MDM2	Ubiquitinligase, negativer Regulator des p53-Proteins
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase, Komponente des Signaltransduktionsweges RAS/RAF/MEK/ERK
MRE11	Komponente des MRN-Komplexes mit Endo- und Exonukleaseaktivität
MRN	Komplex bestehend aus MRE11, RAD50 und NBS1, involviert in NHEJ
mRNA	messenger ribonucleic acid, messenger-RNA
n.d.	nicht detektierbar
NBS1	Komponente des MRN-Komplexes
NHEJ	non homologous end joining, nicht homologe Endverknüpfung
NVP-AUY922	5-(2,4-dihydroxy-5-isopropylphenyl)-4-(4-morpholin-4-yl-methylphenyl)isoxazole-3-carboxylic acid ethylamide, ein 4,5-Isoxazol-Resorcinol-Derivat, HSP90-Inhibitor
NVP-BEP800	2-amino-4-[2,4-dichloro-5-(2-pyrrolidin-1-yl-ethoxy)phenyl]thieno[2,3-d]pyrimidine-6-carboxylic acid ethylamide, ein 2-Aminothieno [2,3-d]Pyrimidin-Derivat, HSP90-Inhibitor
p16	Inhibitor von CDK4 und CDK6
p21	p53-induzierbarer CDK-Inhibitor
p53	53 kDa Protein, Tumorsuppressorfaktor
PARP	poly ADP ribose polymerase, DNA-Reparaturprotein
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PE	plating efficiency, Plattiereffizienz
PI	Propidiumjodid, DNA-Interkalator
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase, Komponente des Signaltransduktionsweges RAS/PI3K/AKT
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid, Proteaseinhibitor
pRB	phosphoryliertes Retinoblastoma Protein
RAD50	DNA-Reparaturprotein involviert in NHEJ
RAD51	DNA-Reparaturprotein involviert in HR
RAD54	Helikase, beteiligt bei DNA-Reparatur und Replikation

RAF-1	Kinase, Komponente des Signaltransduktionsweges RAS/RAF/MEK/ERK
RNase	Ribonuklease, eine RNA abbauende Nuklease
rpm	rotations per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Receptor tyrosine kinase, Membran-gebundenes Rezeptor
SDS	sodium dodecylsulfate, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SF2	survival fraction at 2 Gy, Zellüberleben nach einer Strahlendosis von 2 Gy
siRNA	small interfering RNA, kleine interferierende RNA
SMAD	Komponente des anti-mitogenen TGF β -Signaltransduktionsweges
TBST	tris buffered saline with Tween, Detergenz-enthaltender Puffer
TGF β R	transforming growth factor beta receptor
TM	tail moment
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1. Allgemeines zur klinischen Strahlenbiologie

Trotz der erheblichen Verbesserungen in der medizinischen Versorgung und den dadurch gestiegenen Überlebenschancen sind Tumorerkrankungen nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Für die Behandlung von Tumorerkrankungen stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung, die als Monotherapie oder in Kombination angewandt werden: die operative Entfernung des Tumors und des umgebenden Gewebes, die Behandlung mit zytotoxischen und zytostatischen Substanzen, welche das unkontrollierte Wachstum und die Teilung der Tumorzellen aufhalten (Chemotherapie), sowie die gezielte und schonende Strahlentherapie. Die Strahlentherapie ist ein hochwirksames zytotoxisches Agens, das den Vorteil hat, nicht nur in der Dosis, sondern auch zeitlich und räumlich exakt gesteuert werden zu können. Diese etablierte onkologische Therapieform nutzt die Wirkung der ionisierenden Strahlung auf Menschen und Tiere, um Tumorerkrankungen zu heilen oder deren Fortschreiten zu verzögern.

Die Erforschung der Strahlenwirkung ist eine wesentliche Grundlage der klinischen Strahlenbiologie. Nach heutiger Kenntnis ist die DNA das wichtigste Ziel der ionisierenden Strahlung, neben anderen zellulären Strukturen wie Membranen, Organellen und Proteinen. Der Mechanismus der DNA-Schädigung nach ionisierender Strahlung (IR), wozu die Röntgenstrahlung zählt, beruht auf der Ionisierung der Wassermoleküle in der Zelle. Dadurch entstehen freie Radikale, bekannt als reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS), die dann mit der DNA interagieren und DNA-Schäden verursachen (indirekte Strahlenwirkung). Teilchenstrahlung wie α - und β -Strahlung, sowie Protonen- und Neutronenstrahlung interagieren direkt mit der DNA und schädigen sie auf direktem Weg. Dabei können mehrere strahleninduzierte DNA-Schäden auftreten: Basenschäden, Einzelstrangbrüche (SSB), Doppelstrangbrüche (DSB) und DNA-Protein-Vernetzungen.

Die zelluläre Antwort nach ionisierender Strahlung ist in Abb. 1.1. zusammengefasst. Die strahleninduzierten DNA-Schäden werden erkannt und nach Möglichkeit repariert, um das Überleben der Zellen zu ermöglichen. Die DNA-Reparatur wird durch das Anhalten des Zellzyklus (Zellzyklusarrest) in der Regel unterstützt. Übersteigen die DNA-Schäden die Reparaturmöglichkeiten, bleiben unreparierte DNA-Schäden zurück. Diese führen zum späteren Zelltod aufgrund von DNA-Verlust und Chromosomenaberrationen. Schwere zelluläre Schäden führen zum Zelltod unmittelbar nach der Bestrahlung.

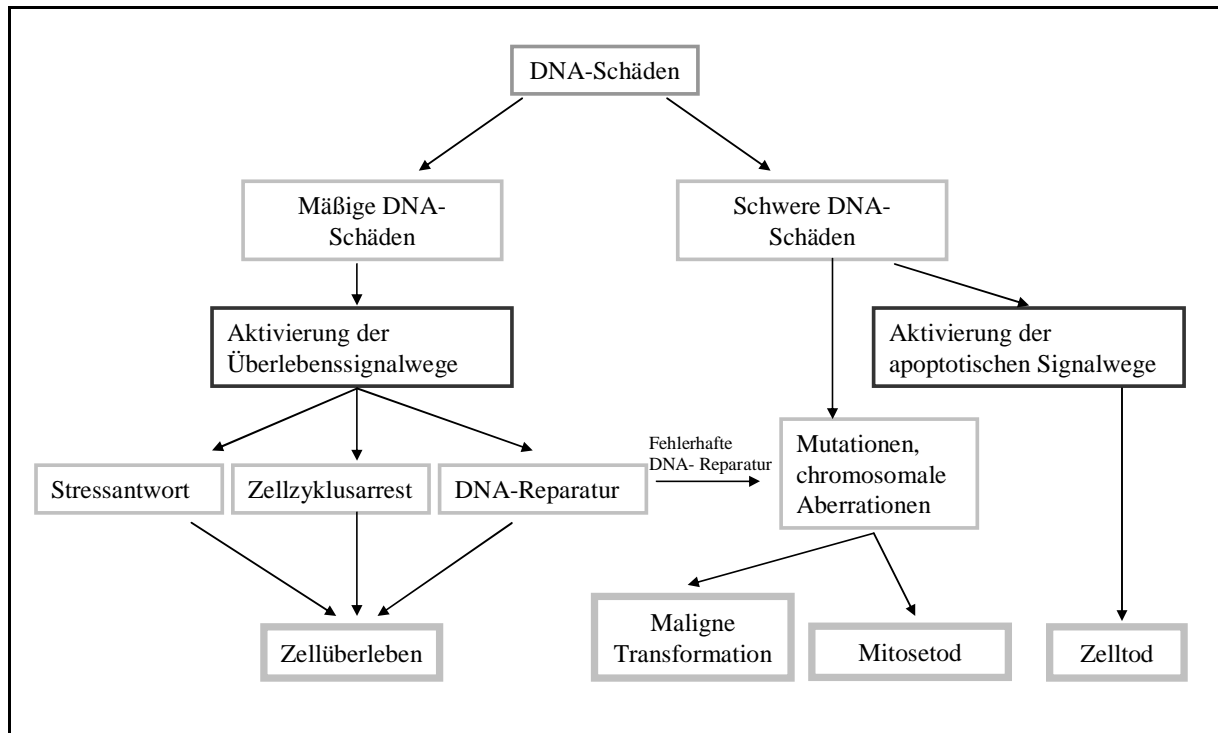


Abb. 1.1. Zelluläre Antwort nach ionisierender Strahlung. Die strahleninduzierten DNA-Schäden werden erkannt und nach Möglichkeit repariert. Um die DNA-Reparatur zu ermöglichen, wird nach Bestrahlung der Zellzyklus an den Checkpoints angehalten. Unreparierte DNA-Schäden führen zum Verlust der Teilungsfähigkeit und zum strahleninduzierten Zelltod. Während ein Teil der Zellen durch frühe Apoptose oder Nekrose nach der Bestrahlung abstirbt, bleiben die meisten Zellen morphologisch intakt und metabolisch aktiv und teilen sich sogar noch ein paar Mal weiter, bevor sie wegen DNA-Verlust und Chromosomenaberrationen an der Zellteilung gehindert werden (Abb. modifiziert nach Shiloh 2003).

Die DNA-Schäden werden durch komplexe molekulare Mechanismen detektiert und repariert. Dabei spielt die Phosphorylierung der Histon-Variante H2AX eine entscheidende Rolle bei der zellulären Antwort auf DNA-Schäden. Sie ist für die Rekrutierung der DNA-Reparaturproteine sowie für die Aktivierung der Checkpoint-Proteine, die den Zellzyklusarrest regulieren, notwendig (zusammengefasst in Podhorecka et al. 2010).

Die Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden erfolgt innerhalb nur weniger Stunden mithilfe verschiedener DNA-Reparaturmechanismen. Einfachere DNA-Schäden wie Einzelstrangbrüche und Basenschäden werden mittels Basenexzisionsreparatur (BER) beseitigt, wobei das DNA-Reparaturprotein PARP eine wichtige Rolle spielt (Los et al. 2002). Für komplexe DNA-Schäden wie die DNA-Kernprotein-Verbindungen werden BER- und DSB-Reparaturmechanismen kombiniert. Für die Reparatur der strahleninduzierten DSB kommen zwei mögliche Mechanismen in Frage (Abb. 1.2), die nicht homologe Endverknüpfung (NHEJ) und die homologe Rekombination (HR), zusammengefasst von Burdak-Rothkamm & Prise (2009).

Bei der NHEJ handelt es sich um den wichtigsten DSB-Reparaturmechanismus bei Säugetierzellen. Er basiert auf der Vereinigung von beschädigten DNA-Enden, unabhängig

von der DNA-Sequenz, mithilfe verschiedener Reparaturenzyme (zusammengefasst von Cahill et al. 2006). Zuerst werden die beschädigten DNA-Enden mittels des Komplexes KU70/KU80/DNA-PK in räumliche Nähe gebracht und von Endonukleasen geschützt. Andere Reparaturproteine, wie die Exonuklease MRE11 (als Teil des MRN-Komplexes, zusammen mit RAD50 und NBS1), entfernen abstehende Enden und schaffen 3'OH-Enden, damit die DNA-Polymerasen die Lücken auffüllen können. Letztendlich fügt DNA-Ligase IV im Komplex mit XRCC4 die reparierten DNA-Enden unter Verbrauch von ATP zusammen.

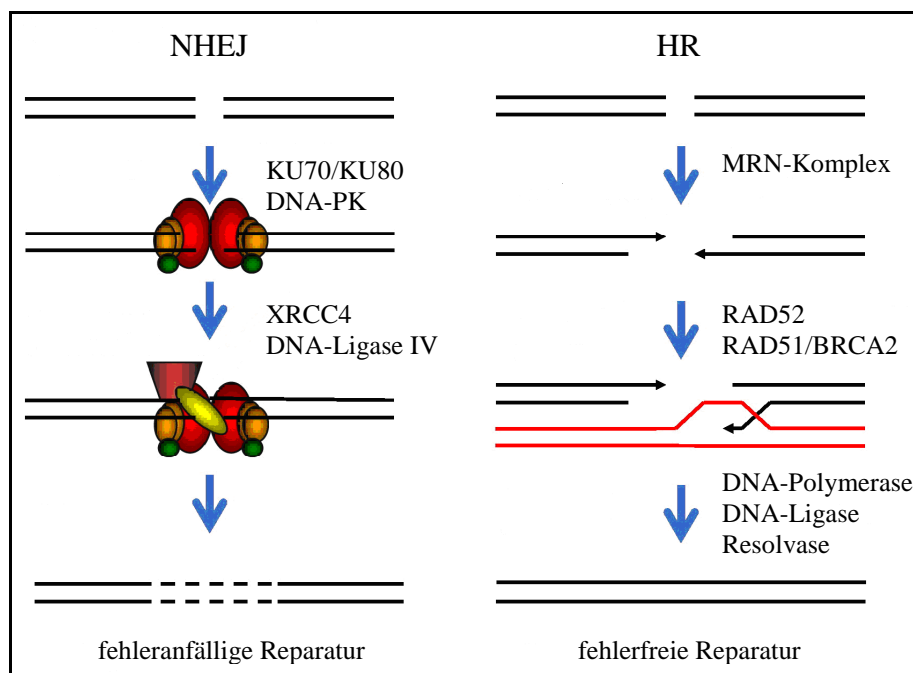


Abb. 1.2. DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturmechanismen. Dabei handelt es sich um die nicht homologe Endverknüpfung (NHEJ) und um die homologe Rekombination (HR), wodurch die DNA-Schäden fehleranfällig bzw. fehlerfrei repariert werden. Die Abb. wurde nach Burdak-Rothkamm & Prise, 2009 modifiziert.

Während die NHEJ-Reparatur fehleranfällig ist, handelt es sich bei der HR-Reparatur um einen fehlerfreien Mechanismus. Dieser setzt homologe, doppelsträngige DNA-Abschnitte als Matrize voraus, die aber nur während der Replikation in der S- und G2-Phase des Zellzyklus, durch die unbeschädigten Schwesterchromatiden frei zugänglich sind. Auch in diesem Fall werden zuerst die DSB erkannt und für die nächsten Schritte vorbereitet: die beschädigten DNA-Enden werden von Endonukleasen durch mehrere einzelstrangbindende Proteine geschützt (RAD51, RAD52 und andere, die durch BRCA2 rekrutiert werden), anschließend werden die abstehenden Enden von Exonukleasen (als MRN-Komplex) entfernt und 3'OH-Enden geschaffen. Danach findet die Invasion des entstandenen Nukleoproteins in das

homologe Schwesterchromatid mithilfe von Helikasen wie RAD54 statt, wodurch eine fehlerfreie Reparatur der DNA-DSB ermöglicht wird (Cahill et al. 2006).

Damit die Zellen mehr Zeit für die Reparatur der DNA-Schäden haben, kommt es in der Regel nach der Bestrahlung zu einer dosisabhängigen Verzögerung der Zellteilung durch Zellzyklusarrest. Der Zellzyklusarrest wird durch die Modulation der Schlüsselproteine der Zellzyklusmaschinerie, die Zyklin-abhängigen Kinasen (CDK), über mehrere unabhängige Mechanismen wie Assoziation mit Zyklinen, Phosphorylierung sowie Assoziation mit spezifischen CDK-Inhibitoren erreicht (Iliakis et al. 2003). Eine wichtige Rolle spielen dabei die Zellzyklus-Kontrollpunkte (Checkpoints), an denen der Zellzyklus angehalten werden kann (Lukas et al. 2004; Iliakis et al. 2003). Der G1/S- und der G2/M-Checkpoint sind in Abb. 1.3 dargestellt.

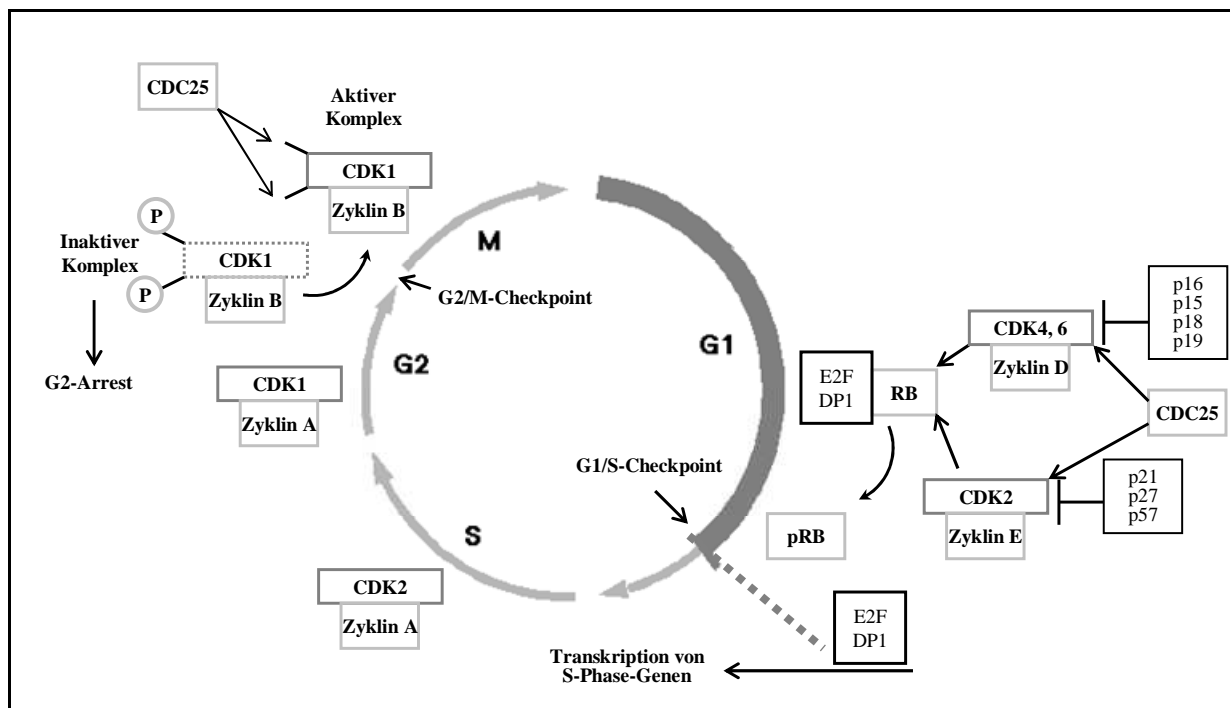


Abb. 1.3. Zellzyklusregulation durch CDKs, Zyklinen und CDK-Inhibitoren. Das Fortschreiten des Zellzyklus durch die distinkten Phasen (G1, S, G2 und M) wird über die CDKs gefördert, die positiv durch Zyklinen oder CDC25, oder negativ durch CDKI-Inhibitoren (p16, p15, p18, p19, p21, p27, p57) reguliert werden können. Die Kinasen CDK4 und CDK6, assoziiert mit Zyklin D-Isoformen, sind zuständig für die Progression des Zellzyklus durch die G1-Phase. Die Assoziation von Zyklin E aktiviert CDK2 am Übergang zwischen G1 und S-Phase. Der Eintritt in die S-Phase wird über den G1/S-Checkpoint kontrolliert. In Form von aktivierten Zyklin-Kinase-Komplexen initiieren CDK4, CDK6 und CDK2 den Eintritt in die S-Phase, indem sie das RB-Protein phosphorylieren. Die S-Phase ist reguliert über den Zyklin A/CDK2-Komplex, während der Zyklin A/CDK1-Komplex wichtig für die Progression durch die G2-Phase ist. Am Ende der G2-Phase befindet sich der G2/M-Checkpoint. Während der G2-Phase wird CDK1 inaktiv gehalten. CDC25 aktiviert den Zyklin B/CDK1-Komplex und ermöglicht den Eintritt in die M-Phase (modifiziert nach Shah & Schwartz 2001 und Pietenpol & Stewart 2002).

Der G1-Checkpoint befindet sich am Ende der G1-Phase und verhindert, dass die Zellen trotz beschädigter DNA in die S-Phase übergehen. Dabei spielen CDK4, CDK6 und CDK2, assoziiert mit Zyklinen, sowie ein Transkriptionskomplex, bestehend aus dem Transkriptionsfaktor E2F-DP1, dem Retinoblastomprotein (RB) und anderen Proteinen, eine wichtige Rolle. In Form von aktivierten Kinase-Zyclin-Komplexen initiieren die genannten Kinasen die Progression des Zellzyklus durch die G1- und S-Phase, indem sie das RB-Protein phosphorylieren. Die Phosphorylierung des RB-Proteins erlaubt die Freisetzung aus dem inhibierenden Komplex sowie die Translokation des Transkriptionsfaktors E2F-DP1 in den Zellkern, wodurch die Transkription der S-Phase-Gene, darunter Zyclin E, Zyclin A und CDK1 sowie solche für die DNA-Replikation, ermöglicht wird.

In Folge von DNA-Schäden kann der Zellzyklus am G1-Checkpoint angehalten werden (G1-Arrest). Dabei werden die Checkpoint-Kinasen ATM/ATR und CHK1/CHK2 aktiviert, welche ihrerseits zwei distinkte Checkpoint-Effektoren, die CDC25A-Phosphatase und den Transkriptionsfaktor p53, phosphorylieren (Lukas et al. 2004). Die CHK1/CHK2-vermittelte Phosphorylierung der CDC25A-Phosphatase führt zur Inaktivierung dieses Proteins, wodurch die aktivierende Dephosphorylierung der CDK-Zyclin-Komplexe durch CDC25A entfällt. Der ATM/CHK/CDC25A-Signalweg ist ein rapider Mechanismus, welcher über post-translationale Modifikationen der Effektorproteine operiert, er kann aber den Zellzyklus nur begrenzt anhalten. Der Signalweg über p53 ist zeitverzögert, weil diesem zunächst die Expression und Akkumulation der Effektorproteine voraus geht. Er wird durch die Stabilisation und Akkumulation des p53-Proteins induziert. Dazu trägt die Phosphorylierung von p53 durch ATM/ATR und CHK1/CHK2, sowie die Inaktivierung der Ubiquitinligase MDM2, welches normalerweise die rapide Degradation des p53-Proteins gewährleistet, bei. Im Kern führt p53 zur Transkription bestimmter CDK-Inhibitoren. Dieser Mechanismus kann die transiente Inhibition der CDK-Zyclin-Komplexe ersetzen, wodurch ein anhaltender Zellzyklusarrest erreicht wird. Mutationen im p53-Gen, die meistens die Inaktivierung des Proteins verursachen, führen zum Ausfall des p53-vermittelten Zellzyklusarrestes. Allerdings kann der Zellzyklus weiterhin über den ATM/CHK/CDC25A-Signalweg angehalten werden (Lukas et al. 2004).

Der G2/M-Checkpoint befindet sich vor der Mitose und wird über CDK1 reguliert. In Folge von DNA-Schäden werden ATM/ATR und CHK1/CHK2 aktiviert, wodurch ein akuter Mechanismus, basierend auf der Phosphorylierung von CDC25A, sowie distinkte zeitverzögerte Mechanismen, zum Teil p53-vermittelt, eingeleitet werden (Lukas et al. 2004). Anschließend wird der Zyclin-CDK1-Komplex inaktiviert, was zum Anhalten des Zellzyklus

vor der Mitose führt. Dies verhindert die Teilung von Zellen mit beschädigter DNA und erlaubt die Reparatur der DNA-Schäden. Ein Ausfall des G2/M-Checkpoints führt zu aberranter Chromosomensegregation und Aneuploidie, und aufgrund dessen zum Zelltod.

Sollten die DNA-Schäden die DNA-Reparaturkapazität der Zellen überschreiten, bleiben unreparierte oder falsch reparierte DNA-Schäden zurück. Diese Restschäden sind für die biologische Wirkung der Bestrahlung zuständig, da sie im Idealfall zum Verlust der unbegrenzten Teilungsfähigkeit der Tumorzellen und zum strahleninduzierten Zelltod führen. In Abb. 1.4 ist die Caspase-abhängige Apoptose dargestellt als eine der meistuntersuchten Signalwege, die zum Zelltod nach Bestrahlung führen können.

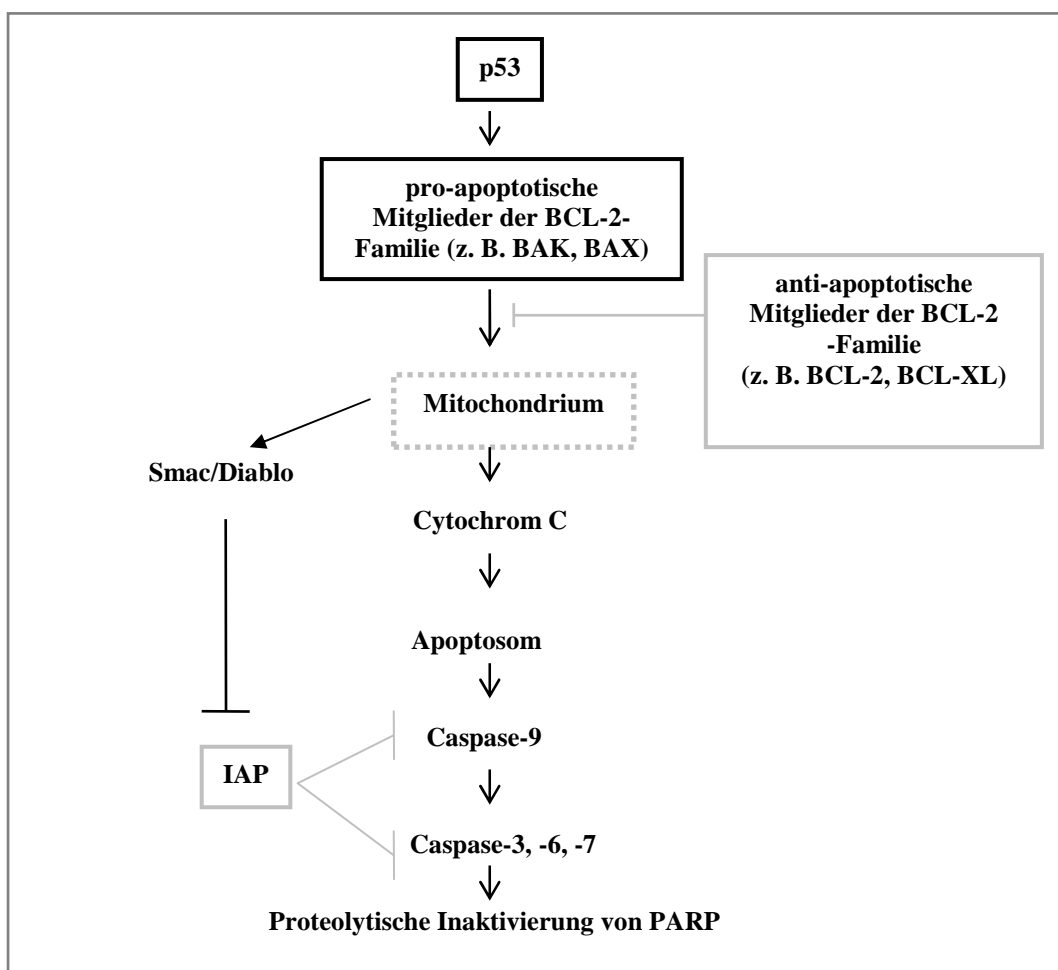


Abb. 1.4. Mitochondrialer Signaltransduktionsweg der Caspase-abhängigen Apoptose. Zellschäden werden über p53 oder p53-unabhängige Sensoren erkannt, wodurch die Apoptose als mögliche Stressantwort eingeleitet wird. Dabei bilden die pro-apoptotischen Proteine Poren in der Oberfläche der Mitochondrien, wodurch mitochondriales Cytochrom C, sowie Smac/Diablo ins Zytoplasma abgegeben werden. Smac/Diablo inhibiert die Apoptose-Inhibitoren (IAP). Durch das Freiwerden von Cytochrom C wird eine irreversible Signalkaskade eingeleitet: Bildung des Apoptosoms und Aktivierung der Initiator-Caspase 9, Aktivierung der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 und anschließend die proteolytische Inaktivierung diverser Zellkomponenten, darunter PARP. Die Apoptoseinduktion kann durch bestimmte Mechanismen verhindert werden. Einerseits kann das Freiwerden von Cytochrom C durch Interaktionen mit anti-apoptotischen Mitgliedern der BCL-2-Familie inhibiert werden. Andererseits können IAPs, darunter Survivin, die Caspase-Aktivität inhibieren (modifiziert nach Dumont et al. 2009).

Die Signalkaskade wird durch das Ausschleusen pro-apoptotischer Faktoren, wie Cytochrom C aus Mitochondrien initiiert, gefolgt von einer Aktivierung der Cysteinyl-Aspartat-spezifischen Proteasen (Caspasen) und endet mit der proteolytischen Spaltung bestimmter Substrate wie PARP, Lamin und Aktin. Der Caspase-abhängige Signalweg kann durch Hitzeschock-proteine wie HSP90 und HSP70 (Beere 2004), durch Survivin (Fortugno et al. 2003) sowie über die anti-apoptotischen Signaltransduktionswege RAS/RAF/MEK/ERK und RAS/PI3K/ AKT reguliert werden (Hanahan & Weinberg 2000).

Neben der Apoptose sind diverse Arten von Zelltod bekannt, die sich morphologisch und molekularbiologisch voneinander unterscheiden. Bröker und Kollegen unterscheiden zwischen akzidentellem Zelltod (Nekrose) und programmiertem Zelltod, wobei bei letzterem zwischen Caspase-abhängigem Zelltod (Apoptose) und Caspase-unabhängigem Zelltod differenziert wird (Bröker et al. 2005). Okada und Mak unterscheiden zwischen apoptotischen Signalwegen, darunter Caspase-abhängige und Caspase-unabhängige Signalwege, sowie nicht-apoptotische Signalwege, welche die Seneszenz, die Nekrose, die Autophagie sowie den bereits erwähnten Mitosetod regulieren (Okada & Mak 2004). Dabei ist der Mitosetod, auch reproduktiver Zelltod genannt, verantwortlich für den Verlust der Teilungsfähigkeit der Zellen und nach heutigem Kenntnisstand der wichtigste Mechanismus für die Strahlenbiologie und Strahlentherapie.

1.2. Neuartige molekulare Strategien für die adjuvante Strahlentherapie

Die Effizienz der Bestrahlung als Monotherapie für Tumorerkrankungen ist durch die Radiotoxizität auf gesundem Gewebe sowie durch die Radioresistenz der Tumoren bei strahlentherapeutisch relevanten Dosen limitiert. Deswegen gilt die Kombination zwischen Bestrahlung und chemotherapeutischen Substanzen, welche vorzugsweise die Radiotoxizität der Tumorzellen verstärken (Radiosensibilisatoren), als eine vielversprechende Strategie, um die Tumorthherapie zu verbessern (Oehler et al. 2007; Bischoff et al. 2009).

Die Reparatur der strahleninduzierten DNA-Schäden und die Inhibierung der strahleninduzierten Apoptose sind die Hauptmechanismen der Tumorradiosensibilisierung (Dumont et al. 2009). Die zum Teil bekannten molekularen Komponenten, die diese Mechanismen regulieren und bei der Radioresistenz der Tumoren eine wichtige Rolle spielen, sind die sogenannten Radioresistenz-assoziierte Proteine, die daher vielversprechende Targets für die Tumorradiosensibilisierung sind. Solche Zielproteine sind in die DNA-Reparatur involviert (z. B. ATM, DNA-PK, PARP), für die Verzögerung der Zellteilung durch Zellzyklusarrest

zugunsten der DNA-Reparatur zuständig (z. B. CHK), für das Wachstum und Überleben der Tumorzellen verantwortlich (z. B. EGFR, PI3K, AKT) oder verhindern die Apoptose (mutiertes p53-Protein, BCL-2, XIAP, Survivin, NF- κ B). Diese Targets werden als potentielle Radiosensibilisatoren erachtet und werden bereits in klinischen Studien evaluiert (Dumont et al. 2009). Die Inhibition einzelner Zielmoleküle zur Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit, die man als Single-Target-Therapien bezeichnet, hat sich jedoch als problematisch herausgestellt. Tumorzellen sind meist in der Lage, den blockierten Zellsignalweg durch alternative Signalwege zu umgehen und entwickeln somit eine Resistenz gegen das spezifische Therapeutikum (Zhang & Burrows 2004).

Eine Multi-Target-Therapie kann alternativ angesetzt werden, um die Gefahr der Resistenzbildung zu vermindern. Ziel der Multi-Target-Strahlentherapie ist die gleichzeitige Inhibition multipler Radioresistenz-assoziiierter Proteine und der damit verbundenen Signalwege. Dadurch wird versucht, diejenigen Tumorzellen zu sensibilisieren, bei denen die Inhibition einzelner Targets keine Wirkung zeigte (Camphausen & Tofilon 2007). Zu diesem Zweck können mehrere Single-Target-Therapien kombiniert oder mittels eines einzigen Hemmstoffs gleichzeitig mehrere Targets aus verschiedenen zellulären Signaltransduktionswegen inhibiert werden. Unter diesem Aspekt bieten Schlüsselproteine wie Histondeacetylasen, p53 sowie das Hitzeschockprotein 90 (HSP90), welche die Funktion vieler Proteine regulieren, einen besonderen Vorteil, da ihre Inhibition die simultane Unterbrechung vieler Signalwege ermöglicht und indirekt eine Multi-Target-Therapie darstellt. Im Folgenden wird die Bedeutung des HSP90-Proteins als molekulares Target für die Radiosensibilisierung hervorgehoben.

1.3. HSP90 als molekulares Target für die Radiosensibilisierung

Das Hitzeschockprotein mit einer molekularen Masse von 90 kDa gehört zur großen Familie der Hitzeschockproteine. Viele der Hitzeschockproteine sind molekulare Chaperone, definiert als Helferproteine, welche die post-translationale Regulation anderer Proteine ermöglichen, ohne dabei ein Teil des Endproduktes zu werden. Zu ihren Funktionen zählen die korrekte Faltung der neusynthetisierten Polypeptidketten zu dreidimensionalen Proteinen, die Aktivierung dieser Proteine, deren Transport durch Membranen sowie deren proteolytischer Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System (Whitesell & Lindquist 2005). Viele Chaperone sind konstitutiv exprimiert und für die Aufrechterhaltung des Proteinhaushalts unter normalen Bedingungen zuständig. Ursprünglich wurden die Hitzeschockproteine im Zusammenhang mit Hitzeschock als Stressfaktor entdeckt, daher der Name. Es ist mittlerweile bekannt, dass

die Expression der Hitzeschockproteine unter zellulären Stressbedingungen als adaptiver Prozess induziert wird, um die Überlebenschancen der Zellen unter proteindenaturierenden Bedingungen zu erhöhen. Hierbei sind Hitzeschockproteine für die Solubilisierung der Proteinaggregate, sowie für die Renaturierung der beschädigten Proteine zuständig (Sarto et al. 2000; Hartl 1996).

Es gibt mehrere Familien von Hitzeschockproteinen, die nach der molekularen Masse klassifiziert werden, darunter die Familie der kleinen Hitzeschockproteine, die Chaperonin-Familie, sowie die HSP40-, HSP70-, HSP90- und HSP110-Familien. Die HSP90-Familie besteht aus vier Mitgliedern, die in unterschiedlichen Zellkompartimenten aktiv sind (Chen et al. 2005), wie in der Tabelle 1.1 ersichtlich ist.

Tabelle 1.1. Mitglieder der HSP90-Familie und ihre zelluläre Lokalisation.

Mitglied	Gen ID laut Entrez Gene	Lokalisation
HSP90AA1; HSP90 α	3320	Zytoplasma
HSP90AB1; HSP90 β	3326	Zytoplasma
GRP94	7184	endoplasmatisches Retikulum
TRAP1	10131	Mitochondrien

Das zytoplasmatische HSP90-Protein ist eines der meist untersuchten Hitzeschockproteine aufgrund der Besonderheiten, die im Folgenden beschrieben werden. Es sind mittlerweile zwei Versionen des zytoplasmatischen HSP90-Proteins bekannt, die in der Literatur als die Isoformen oder Isomeren HSP90 α und HSP90 β bezeichnet werden. Sie sind durch distinkte Gene kodiert (siehe Tabelle 1.1), bestehen aber aus denselben konservierten Domänen. Allerdings weisen Unterschiede in der Aminosäuresequenz der HSP90-Isoformen auf mögliche dafür spezifische Funktionen hin (Sreedhar et al. 2004). Während HSP90 β konstitutiv in den meisten Geweben exprimiert wird, ist HSP90 α als die stressinduzierbare Isoform bekannt (Chaudhury et al. 2006) und scheint bei vielen zellulären Prozessen beteiligt zu sein: Zellzyklusprogression und Zellwachstum (Nakai & Ishikawa 2001; Sreedhar et al. 2004), Apoptose (Panner et al. 2007), Invasion (Eustace & Jay 2004), Angiogenese (Song & Luo 2010) sowie Metastasierung (McCready et al. 2010).

Das HSP90-Monomer hat drei Hauptdomänen: eine C-terminale Domäne, eine mittlere Domäne und eine N-terminale Domäne, die jeweils unterschiedliche Funktionen erfüllen (Abb. 1.5). Die C-terminale Domäne ermöglicht die Bildung eines aktiven HSP90-Chaperon-Komplexes durch die Dimerisierung zweier HSP90-Monomere, wobei Homodimere (zwei

HSP90 α oder zwei HSP90 β) aber auch Heterodimere (HSP90 α und HSP90 β) bekannt sind (Sreedhar et al. 2004). Die C-terminale ATP-Bindungsdomäne scheint notwendig für die Autophosphorylierung und Aktivierung von HSP90 zu sein (Langer et al. 2002). Die mittlere Domäne wird durch einen kurzen, geladenen Linker mit der N-terminalen Domäne verbunden und ist für die Erkennung und die Bindung der Klientenproteine zuständig, und damit der Ort der eigentlichen Chaperonaktivität. Die N-terminale Domäne ist für die Bindung und die Hydrolyse von ATP verantwortlich (Richter et al. 2008; Peterson & Blagg 2009).



N-terminale Domäne	Mittlere Domäne	C-terminale Domäne
Bindung von ATP und Co-Chaperonen	Bindung von Klientenproteinen und Co-Chaperonen	Dimerisierung Autophosphorylierung Bindung von Co-Chaperonen
Bindung von HSP90-Inhibitoren		Bindung von HSP90-Inhibitoren

Abb. 1.5. Struktur und biochemische Funktionen des HSP90-Monomers. Die Hauptdomänen (in blau schematisch dargestellt) sind durch kurze Zwischendomänen (schwarz und grau) verbunden. Die biochemischen Funktionen der Hauptdomänen sowie die Stellen, an denen die HSP90-Inhibitoren binden können, sind angegeben (modifiziert nach Whitesell & Lindquist 2005).

Die Chaperonmaschinerie besteht aus einem HSP90-Dimer als Hauptchaperon und verschiedenen Co-Chaperonen, die die Aktivität von HSP90 unterstützen (zusammengefasst in Peterson & Blagg 2009). Die Auswahl der Co-Chaperone ändert sich im Laufe des Chaperonprozesses je nach ausgeübter Funktion und Klientenprotein (Sreedhar et al. 2004). Manche Co-Chaperone regulieren die ATPase-Funktion von HSP90. Die Co-Chaperone HOP, CDC37 und p23 wirken inhibierend, während AHA1 und Immunophilin die ATPase aktivieren. Die Inhibierung der ATPase-Funktion verursacht das Anhalten des ATPase-Zyklus und ermöglicht die Bindung der Klientenproteine an den HSP90-Komplex. Der ATPase-Zyklus wird durch aktivierende Co-Chaperone wieder in Gang gebracht (Pearl & Prodromou 2006). In einem ATP-abhängigen Chaperonzyklus geht der HSP90-Komplex von der offenen, inaktiven Konformation über intermediäre Strukturen in die geschlossene, aktive Konformation über (Abb. 1.6). Nach der Stabilisierung und Aktivierung des Klientenproteins wird der HSP90-Komplex frei und der Zyklus kann erneut beginnen.

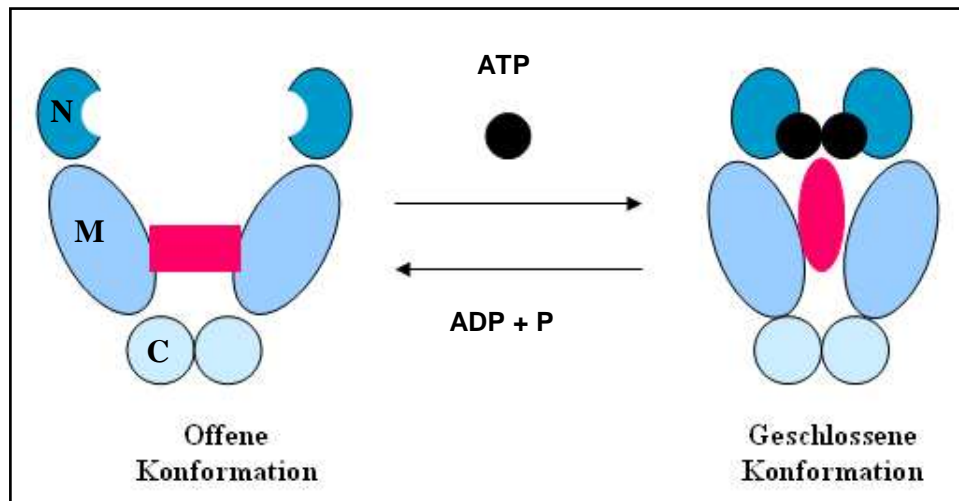


Abb. 1.6. Die ATPase-Aktivität von HSP90, modifiziert nach Terasawa et al. 2005. Die Abbildung zeigt eine vereinfachte Darstellung des HSP90-Chaperons, bestehend aus den drei Hauptdomänen (eine N-terminale, eine Mitteldomäne und eine C-terminale Domäne). Ein ungefaltetes Klientenprotein (als rotes Rechteck dargestellt) bindet an die Mitteldomäne des HSP90-Chaperons, das sich noch in der inaktiven, offenen Konformation befindet. Erst durch die Bindung von ATP (schwarze gefüllte Kreise) an die N-terminalen Domäne geht der HSP90-Komplex in die geschlossene Konformation über und übt dadurch seine Funktion aus. Das gefaltete Klientenprotein ist durch die ovale, rote Form schematisch dargestellt.

In seiner Funktion als molekulares Chaperon ist HSP90 bei der Stabilisierung und Aktivierung seiner Klientenproteine beteiligt, sowie am gezielten Ubiquitin-Proteasom-abhängigen Abbau dieser Proteine involviert (Schneider et al. 1996; Pearl et al. 2008). Allerdings unterscheidet sich HSP90 von anderen Chaperonen wie z. B. HSP70 dadurch, dass es weniger für die Faltung von neusynthetisierten Polypeptiden zuständig ist. Die meisten seiner Klienten sind bereits fast vollständig gefaltet und werden durch eine subtile Konformationsänderung von einer niederaffinen in die aktive Konformation überführt (Pearl & Prodromou 2006; Young et al. 2001).

Einzigartig ist auch die große Anzahl an Klientenproteinen (mittlerweile sind über 200 bekannt), darunter viele regulatorische Bestandteile von zellulären Signalkaskaden wie Steroidhormonrezeptoren, Transkriptionsfaktoren und Kinasen, die bei fast allen zellulären Prozessen beteiligt sind (Zhao et al. 2005). Eine Vielzahl seiner Klientenproteine ist an allen Schlüsselprozessen der Tumorentstehung und Tumorprogression beteiligt (Zhang & Burrows 2004; Peterson & Blagg 2009). Diese sogenannten Onkoproteine sind mit allen sechs Eigenschaften assoziiert, die Tumorzellen charakterisieren (Hanahan & Weinberg 2000): Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren, unkontrollierte Zellteilung, Umgehung von Apoptose, unbegrenztes replikatives Potential, anhaltende Angiogenese und Fähigkeit zur Gewebeinvasion und Metastasierung. Hinzu kommt die Resistenz der Tumorzellen gegenüber der Strahlentherapie, die durch die Radioresistenz-assoziierten Proteine, darunter DNA-Reparaturproteine (Dote et al. 2006), Komponenten der Signaltransduktionswege, die das

Zellüberleben fördern, wie z. B. EGF-Rezeptoren, RAF-1 und AKT (Camphausen & Tofilon 2007; Dote et al. 2005), Regulatoren der Apoptose wie z. B. der Apoptose-Inhibitor Survivin (Fortugno et al. 2003; Reichert et al. 2011), zustande kommt (Abb. 1.7).

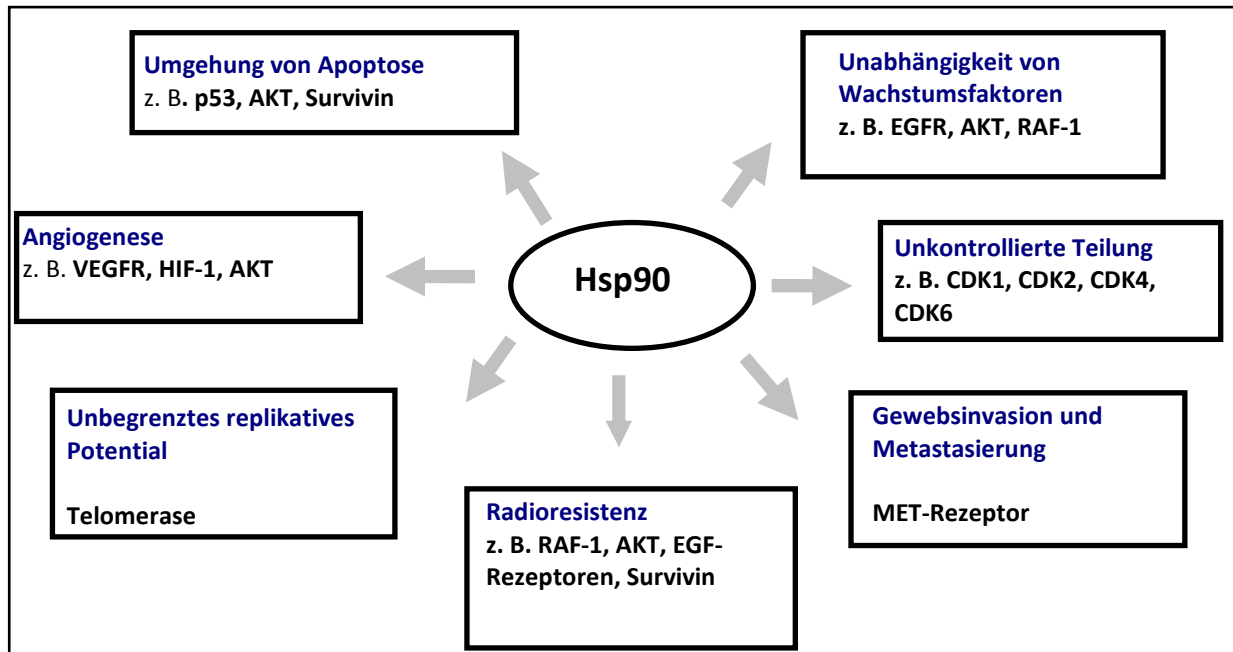


Abb. 1.7. HSP90 als molekulares Target zur Radiosensibilisierung strahlenresistenter Tumoren. Die Klientenproteine von HSP90 (schwarz) sind an allen Prozessen beteiligt, die zur Tumorentstehung und Tumorprogression führen und sind bei der Resistenz vieler Tumoren gegenüber strahlentherapeutisch relevanten Dosen beteiligt (modifiziert nach Zhang & Burrows 2004).

Zusammenfassend bietet die HSP90-Inhibition eine einzigartige Möglichkeit, gleichzeitig multiple onkogene Signaltransduktionswege zu blockieren (Multi-Target-Therapie), und wird als ein vielversprechender Ansatz zur Radiosensibilisierung strahlenresistenter Tumoren angesehen.

Es gibt mittlerweile verschiedene Klassen von HSP90-Inhibitoren mit unterschiedlichen Wirkungsweisen (Whitesell & Lindquist 2005), darunter die C-terminalen und die N-terminalen HSP90-Inhibitoren. Erstere wie z. B. Cisplatin und Novobiocin, blockieren die C-terminale ATPase-Funktion des HSP90-Proteins (Marcu et al. 2000), die für die Autophosphorylierung verantwortlich ist (Langer et al. 2002). Dadurch wird die Interaktion zwischen HSP90-Chaperon und Klientenprotein gestört (Yun et al. 2004), was die Rekrutierung der Ubiquitinligase CHIP und die Ubiquitin-Proteasom-abhängige Degradation der ungefalteten Klientenproteine zur Folge hat (Murata et al. 2001). Die meisten HSP90-Inhibitoren zielen allerdings auf die N-terminale ATP-Bindungsdomäne und blockieren deren ATPase-Funktion. Infolge dessen kann die aktivierende Konformationsänderung nicht

stattfinden und die Chaperonaktivität des HSP90-Komplexes wird inhibiert. Die Akkumulation inhibierter HSP90-Komplexe rekrutiert CHIP, wodurch die Klientenproteine gezielt proteasomal abgebaut werden (Murata et al. 2001).

Die Wirkung der N-terminalen HSP90-Inhibition auf die Strahlenempfindlichkeit humaner Zelllinien wird seit längerem untersucht (Bull et al. 2004; Dote et al. 2005; Machida et al. 2005; Dote et al. 2006; Shintani et al. 2006; Noguchi et al. 2006; Koll et al. 2008; Kabakov et al. 2008; Moran et al. 2008; Fujii et al. 2010). Allerdings zeigten die in diesen Studien verwendeten HSP90-Inhibitoren (Geldanamycin und seine Derivate 17-AAG, 17-DMAG, sowie Radicicol) zahlreiche Limitierungen. Die natürlichen N-terminalen HSP90-Inhibitoren Geldanamycin und Radicicol wiesen anti-proliferative Eigenschaften *in vitro* auf, allerdings behielt nur Geldanamycin seine Aktivität *in vivo* (Duerfeldt & Blagg 2010). Radicicol zeigte, wahrscheinlich aufgrund der metabolischen Inaktivierung, keine Aktivität im Tierversuch (Sharma et al. 1998; Zhang & Burows 2004). Geldanamycin hat sich aufgrund seiner Lebertoxizität als ungeeignet für klinische Anwendungen erwiesen (Chaudhury et al. 2006). Klinische Studien mit 17-AAG und 17-DMAG zeigten Limitierungen dieser Geldanamycin-Derivate auf, darunter schwache Löslichkeit in Wasser und Lebertoxizität (Biamonte et al. 2010; Porter et al. 2010). Da Geldanamycin-Derivate Substrate für die p-Glykoprotein-Effluxpumpe sind, wurde eine Resistenz gegenüber diesen HSP90-Inhibitoren in denjenigen Tumorzellen beobachtet, die das P-Glykoprotein überexprimieren und aufgrund dessen erhöhtes Ausschleusens der HSP90-Inhibitoren aus den Zellen zeigten (Piper & Millson 2011). Ein weiterer Faktor für eine Resistenz gegenüber diesen HSP90-Inhibitoren könnte die genetische Variabilität der Enzyme sein, die für den Metabolismus der Geldanamycin-Derivate verantwortlich sind. Solche Enzyme wie das Cytochrom P450 und die DT-Diaphorase können die Effizienz und/oder Toxizität der HSP90-Inhibitoren beeinflussen (Duerfeld & Blagg 2010; Piper & Millson 2011).

Seit der Aufklärung der Kristallstruktur des HSP90-ATP-Komplexes und der kritischen Rolle der ATP-Bindung für die Chaperonfunktion von HSP90 (zusammengefasst in Pearl & Prodromou 2006), wurden HSP90-Inhibitoren unterschiedlicher chemischer Natur synthetisch hergestellt, darunter Purin-Derivate (BIIB021 und PU-H71), Dihydroindazolone-Derivate (SNX-5422), Resorcinol-Derivate mit zusätzlichem Pyrazolring (STA-9090) oder mit Isoxazolring (NVP-AUY922) sowie Pyrimidin-Derivate (NVP-BEP800). Die Purin- und Pyrazol-basierten HSP90-Inhibitoren sind keine Substrate der Effluxpumpe P-Glykoprotein, so dass auch Geldanamycin-resistente Tumorzellen empfindlich darauf reagieren (Piper & Millson 2011). Die in dieser Arbeit verwendeten neuartigen HSP90-Inhibitoren NVP-

AUY922 und NVP-BEP800 sind wasserlöslich und zeigten anti-proliferative Wirkungen in verschiedenen Tumorzelllinien und Xenograft-Tiermodellen bei gut verträglichen Dosen (Brough et al. 2008; Eccles et al. 2008; Jensen et al. 2008; Stühmer et al. 2009; Stühmer et al. 2008; Bergstrom et al. 2008; Monazzam et al. 2009; Kaiser et al. 2010; Oude Munnink et al. 2010; Nagengast et al. 2010; Gaspar et al. 2010; Massey et al. 2010; Tauchi et al. 2011).

Die HSP90-Inhibitoren binden an alle Mitglieder der HSP90-Familie und deren Isoformen mit unterschiedlicher Affinität. Aufgrund der konservierten ATP-Bindungsstasche, geht man davon aus, dass die spezifische Inhibition einer bestimmten Isoform mittels HSP90-Inhibitoren eher schwierig, wenn nicht sogar unmöglich ist (Sreedhar et al. 2004). Im Moment kann eine spezifische Modulation der HSP90-Isoformen über RNA-Interferenz erreicht werden. Dabei soll das Gen über die siRNA-vermittelte Degradation der mRNA stillgelegt (gene silencing) und die Expression des Proteins herunterreguliert werden (Knock-down). Die siRNA-basierte Technologie wird bereits in klinischen Studien erprobt (Petrocca & Lieberman 2010; Kaufmann et al. 2010) und wird als ein vielversprechender Ansatz für die Entwicklung innovativer Therapien gegen Tumorerkrankungen angesehen (Folini et al. 2009). Der Effekt des siRNA-vermittelten Knock-downs von HSP90 in verschiedenen Tumorzelllinien wurde in anderen Studien untersucht, allerdings nicht in Kombination mit Bestrahlung (Wen & Damania 2010; Li et al. 2011; Chatterjee et al. 2007; Barksdale & Bijur 2009; Schoof et al. 2009).

1.4. Zelluläre Wirkungen der HSP90-Inhibition

Die pharmakologische Inhibition des molekularen HSP90-Chaperons mittels semi-synthetischer Geldanamycin-Derivate wie 17-AAG und 17-DMAG (zusammengefasst in Drysdale et al. 2006) oder mittels synthetischer HSP90-Inhibitoren wie NVP-AUY922 und NVP-BEP800 (Eccles et al. 2008; Jensen et al. 2008; Stühmer et al. 2009; Massey et al. 2010) zeigt anti-proliferative Wirkungen in verschiedenen Tumorzelllinien und Xenograft-Tiermodellen. Die Wirkung der HSP90-Inhibitoren als einziger Therapieansatz sowie in Kombination mit anderen Therapieansätzen wird bereits in klinischen Studien untersucht (zusammengefasst in Porter et al. 2010). In Kombination mit Bestrahlung führte die pharmakologische HSP90-Inhibition zur Erhöhung der Strahlensensibilität diverser Tumorzelllinien (Bisht et al. 2003, Machida et al. 2003, Russell et al. 2003, Bull et al. 2004, Harashima et al. 2005, Dote et al. 2006). Der radiosensibilisierende Effekt von Geldanamycin oder 17-AAG in zwei Zervixkarzinomlinien wurde *in vitro* und *in vivo* gezeigt (Bisht et al. 2003). Plattenepithelkarzinomzellen wurden als Monolayer sowie als auch als 3D-Spheroid-

Modell in Kombination mit 17-AAG bestrahlt und dadurch radiosensibilisiert (Machida et al. 2003). 17-DMAG erhöhte die Strahlenempfindlichkeit humaner Tumorzelllinien unterschiedlicher Entitäten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Bull et al. 2004). Russel und Kollegen zeigten eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit der getesteten Gliom- und Prostatakarzinomlinien nach Behandlung mit 17-AAG, während Fibroblasten nicht radiosensibilisiert wurden (Russell et al. 2003). Auch in anderen Studie wurde entweder eine mildere oder keine radiosensibilisierende Wirkung des Geldanamycin-Derivates 17-AAG in nicht-transformierten Zelllinien beschrieben (Bisht et al. 2003; Noguchi et al. 2006).

Zusätzlich zur Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit induziert die Inhibition der N-terminalen Domäne des HSP90-Proteins die sogenannte Stressantwort, die durch die Hochregulation diverser Hitzeschockproteine charakterisiert ist (Drysdale et al. 2006; Zaarur et al. 2006; Powers & Workman 2007, Powers et al. 2008). Der molekulare Mechanismus der HSP-Überexpression nach HSP90-Inhibition ist noch nicht vollständig geklärt, allerdings scheint die Freisetzung des Transkriptionsfaktors der Stressgene (HSF-1), der normalerweise an zytosolischem HSP90/HSP70-Komplex gebunden und inaktiv ist, eine entscheidende Rolle zu spielen (Abb. 1.8)

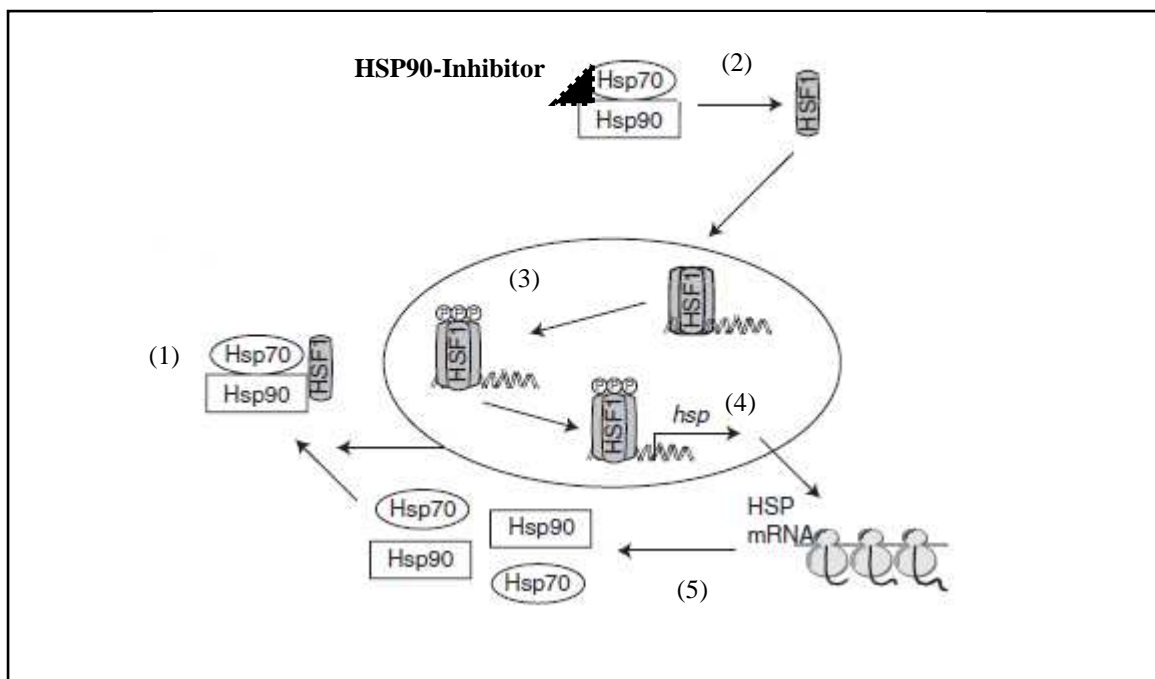


Abb. 1.8. Induktion der Stressantwort nach zellulärem Stress. (1) Unter normalen Bedingungen ist der Transkriptionsfaktor der Hitzeschockgene HSF-1 an HSP90/HSP70-Komplexe gebunden. (2) Die HSP90-Inhibition bewirkt, dass HSF-1 vom HSP90/HSP70-Komplex getrennt wird. (3) Durch Trimerisierung und Phosphorylierung wird der Transkriptionsfaktor aktiviert. (4) Aktiviertes HSF-1-Trimer induziert die Transkription von HSP-Genen. (5) Diverse HSPs, darunter auch HSP90 und HSP70, werden translatiert. HSP90/HSP70-Komplexe binden und inaktivieren HSF-1, wodurch die Stressantwort abgeschwächt wird (modifiziert nach Vabulas et al. 2012).

Eine erhöhte Konzentration denaturierter Proteine verdrängt HSF-1 vom HSP90/HSP70-Komplex, wodurch die Konzentration an freiem HSF-1 zunimmt (Whitesell et al. 2003). Auch die pharmakologische HSP90-Inhibition bewirkt, dass HSF-1 frei wird.

Die Induktion der Stressantwort infolge von zellulärem Stress erlaubt den Zellen, unter ansonsten tödlichen Bedingungen zu überleben (Workman 2004). Die überexprimierten Hitzeschockproteine stellen das Gleichgewicht des Proteinhaushaltes wieder her, indem sie denaturierte Proteine in eine funktionsfähige Konformation überführen. Sie begünstigen Zellüberleben und Zellwachstum, und verhindern die Apoptose, indem sie an verschiedenen Schritten des Apoptosesignalweges angreifen (Beere 2004, Arya et al. 2007). Dadurch beeinflussen die Hitzeschockproteine, darunter HSP90 und HSP70, auch die zelluläre Stressantwort nach der Bestrahlung. Allerdings könnten die anti-apoptotischen Funktionen der Hitzeschockproteine die apoptotische Wirkung der HSP90-Inhibitoren vermindern. Die Aktivierung der Stressantwort stellt also einen unvermeidlichen Nebeneffekt der HSP90-Inhibition dar, welcher durch die Kombination der HSP90-Inhibitoren mit Modulatoren der Stressantwort reduziert werden könnte.

Die Inhibierung der Stressantwort nach pharmakologischer HSP90-Inhibition kann unter anderem über die Benzylidenlaktam-Verbindung KNK437 erfolgen. Diese Substanz soll die Expression der Hitzeschockproteine allgemein über die Inhibition des Transkriptionsfaktors HSF-1 unterdrücken (Yokota et al. 2000). Im Gegensatz zu Quercetin, ein anderer HSF-Inhibitor, verhindert die Behandlung mit KNK437 die Neusynthese der HSP, ohne die Aktivität diverser Kinasen zu beeinflussen (Yokota et al. 2000; Powers & Workman 2007). Dabei könnte die Trimerisierung von HSF-1 sowie dessen Phosphorylierung, die beide für die vollständige Aktivierung des Transkriptionsfaktors notwendig sind, durch KNK437 inhibiert sein (Ohnishi et al. 2004). Während die Expression diverser stressinduzierbarer Hitzeschockproteine wie HSP110, HSP70 und HSP40 mittels KNK437 unterdrückt wird, scheint die Expression von konstitutiv exprimierten HSC70- und HSP90-Proteine nicht beeinflusst zu sein (Powers & Workman, 2007).

Die Behandlung mit KNK437 erhöhte die pro-apoptotischen Wirkungen des HSP90-Inhibitors 17-DMAG in akuten Leukämiezellen (Guo et al. 2005). Außerdem verstärkte die Behandlung mit KNK437 den apoptotischen Effekt der Hyperthermie in Prostatakarzinomlinien (Sahin et al. 2011). In pankreatischen Tumorzellen erhöhte die Behandlung mit KNK437 die zytotoxische Wirkung von Gemcitabin (Taba et al. 2011). In Kombination mit Bestrahlung wurde eine radiosensibilisierende Wirkung von KNK437 in der A549-

Tumorzelllinie beschrieben (Sakurai et al. 2005). Außerdem wurde eine KNK437-vermittelte Radioresistenz in humanen Glioblastom-Tumorzellen beobachtet (Ohnishi et al. 2006).

Allerdings sind KNK437 oder Quercetin unspezifisch, da sie die Transkription der HSP im Allgemeinen inhibieren. Die spezifische Herunterregulation der Stressgene kann mittels siRNA erreicht werden. Getestet wurde unter anderem der Effekt des siRNA-vermittelten Knock-downs von HSF-1 in Kombination mit 17-AAG oder mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 (Zaarur et al. 2006) oder Hitzeschock (Rossi et al. 2006). Zudem wurden der Effekt der stabilen Transfektion mit siRNA gegen HSP70 in Kombination mit 17-AAG (Guo et al. 2005) sowie der Effekt der siRNA gegen HSP90 α in Kombination mit dem alkylierenden Reagenz Temozolomid (Cruickshanks et al. 2010).

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Die Wirkung der HSP90-Inhibition auf die Strahlenempfindlichkeit humaner Zelllinien wird seit längerem untersucht (Bull et al. 2004; Dote et al. 2005; Machida et al. 2005; Dote et al. 2006; Shintani et al. 2006; Noguchi et al. 2006; Koll et al. 2008; Kabakov et al. 2008; Moran et al. 2008; Fujii et al. 2010). Allerdings zeigten die in diesen Studien verwendeten HSP90-Inhibitoren (Geldanamycin und seine Derivate 17-AAG, 17-DMAG, sowie Radicol) zahlreiche Limitierungen in der klinischen Anwendung, darunter schwache Löslichkeit in Wasser sowie Toxizität, vor allem in der Leber (Biamonte et al. 2010; Porter et al. 2010). Im ersten Teil dieser Arbeit soll die Wirkung der neuartigen HSP90-Inhibitoren NVP-AUY922 und NVP-BEP800, im Vergleich zu dem Geldanamycin-Derivat 17-DMAG, untersucht werden. Die neuartigen HSP90-Inhibitoren sind wasserlöslich und zeigten anti-proliferative Wirkungen in verschiedenen Tumorzelllinien und Xenograft-Tiermodellen bei gut verträglichen Dosen (Brough et al. 2008; Eccles et al. 2008; Jensen et al. 2008; Stühmer et al. 2009; Stühmer et al. 2008; Bergstrom et al. 2008; Monazzam et al. 2009; Kaiser et al. 2010; Oude Munnink et al. 2010; Nagengast et al. 2010; Gaspar et al. 2010; Massey et al. 2010a; Tauchi et al. 2011). Der Einfluss dieser HSP90-Inhibitoren alleine und in Kombination mit Bestrahlung soll dabei in vier humanen Tumorzelllinien unterschiedlicher Entitäten untersucht werden, und zwar in der Lungenkarzinomzelllinie A549, der Fibrosarkomzelllinie HT1080, sowie in zwei Glioblastomzelllinien, GaMG und SNB19. Der Einfluss der pharmakologischen HSP90-Inhibition und Bestrahlung auf Zellviabilität, Koloniebildungsfähigkeit, Induktion und Reparatur der DNA-Schäden, Apoptoserate, Zellzyklusverteilung sowie Expression von Apoptose-, Zellzyklus- und DNA-Reparatur-

regulierenden Proteinen soll analysiert werden, um Hinweise über die Mechanismen der Strahlenantwort zu gewinnen.

Im zweiten Teil der Arbeit soll die durch Stress induzierbare α -Isoform von HSP90 mittels siRNA herunterreguliert werden. Der siRNA-vermittelte Knock-down von diversen Targets für die Tumorthherapie (Osteopontin, Survivin, HIF-1 α , Aurora-A, AKT) wurde bereits in der Literatur gezeigt (Hahnel et al. 2010; Rödel et al. 2008; Staab et al. 2011; Tao et al. 2007; Toulany et al. 2008). Der siRNA-vermittelte Knock-down von HSP90 induzierte Apoptose in Myelomazelllinien (Chatterjee et al. 2007) und humanen Gliomen (Panner et al. 2007). Die kombinierte Behandlung mit siRNA gegen HSP90 α und Temozolomid erhöhte die Sensitivität der getesteten Gliomazellen gegenüber diesem Chemotherapeutikum (Cruickshanks et al. 2010). Darüber hinaus wurden bereits klinische Studien basierend auf der siRNA-Technologie als Therapie für Tumorerkrankungen eingeleitet (Kaufmann et al. 2010). Die Wirkung der Transfektion mit siRNA gegen HSP90 α alleine oder in Kombination mit NVP-AUY922 auf die Strahlenantwort der Tumorzelllinien A549 und GaMG soll in dieser Arbeit mittels Zellviabilitäts- und Zellproliferationstest, Kolonietest, sowie über die Expression der Markerproteine HSP90 α , HSP90 β , HSP70, AKT, RAF-1, CDK1, CDK4 und PARP untersucht werden. Die DNA-Schäden und deren Reparatur wurden über die Expression von γ H2AX im FACS gemessen.

Im dritten Teil der Arbeit soll die Expression der stressinduzierbaren Hitzeschockproteine HSP90 und HSP70 mittels KNK437 unterdrückt werden. Diese Benzylidenlaktam-Verbindung inhibiert die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HSF-1, wodurch die Transkription der Hitzeschockgene allgemein, darunter auch die HSP90- und HSP70-Gene, verhindert wird (Yokota et al. 2000). In anderen Studien erhöhte die kombinierte Behandlung mit KNK437 die Zytotoxizität der Hyperthermie (Yokota et al. 2000; Koishi et al. 2001; Sakurai et al. 2005; Sahin et al. 2011), des HSP90-Inhibitors 17-DMAG (Guo et al. 2005) oder des Zytostatikums Gemcitabin (Taba et al. 2011). In Kombination mit Bestrahlung wurde eine radiosensibilisierende Wirkung von KNK437 in der A549-Tumorzelllinie beschrieben (Sakurai et al. 2005). Der Einfluss der simultanen Behandlung mit KNK437 und NVP-AUY922 auf die Strahlenantwort der Tumorzelllinien A549 und GaMG wird in dieser Arbeit untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Zelllinien und Zellkultur

Für die vorliegende Arbeit wurden vier verschiedene adhärente Zelllinien verwendet (Tabelle 2.1). Dabei handelte es sich um die Tumorzelllinien A549, GaMG, HT1080 und SNB19, bezogen von der American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Die Zellen wurden in DMEM-Nährmedium, supplementiert mit 10% FCS und 1 mM L-Glutamin, sowie 100 Units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, unter Standardbedingungen bei 37°C in einer H₂O-gesättigten, 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert.

Tabelle 2.1. Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Genetische Merkmale (laut Catalog of somatic mutations in cancer)
A549	Lungenkarzinom	hypotriploid; Mutationen in p16, KRAS, BRG1/SMARCA4, STK11; WT p53
GaMG	Glioblastom	hypotriploid; Mutationen in p16, SMAD4 und p53
HT1080	Fibrosarkom	beinahe diploid; Mutationen in p16, NRAS und IDH1, WT p53
SNB19	Glioblastom	hypotriploid; Mutationen in PTEN, p16 und p53

p16, p53, PTEN, STK11 sind Tumorsuppressorgene; SMAD4, KRAS und BRG1/SMARCA4 sind Onkogene; IDH = Isocitrat Dehydrogenase

Alle 2 - 3 Tage wurden Subkulturen nach einem Protokoll von Lindl & Bauer (1994) angelegt. Nach dem Absaugen des verbrauchten Nährmediums wurden die Zellen mit sterilem PBS gespült. Danach folgte das Ablösen der Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung im Brutschrank (Einwirkungszeit circa 5 min, je nach Zelllinie sogar weniger, bis sich die Zellen abrunden). Die proteolytische Reaktion wurde mit FCS-enthaltendem DMEM inhibiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 1300 rpm, RT) geerntet. Danach wurden die Zellpellets in frischem DMEM resuspendiert, so dass eine Verdünnung 1:3 für langsam wachsenden Zellen wie GaMG und SNB19, sowie 1:5 für schnell wachsende Zellen wie A549 und HT1080 entstand. Die verdünnte Zellsuspension wurde in sterilen Kulturflaschen mit 10 ml frischem DMEM überführt.

Chemikalien für die Zellkultur:

Dulbecco's MEM (DMEM) Low Glucose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
FCS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dulbecco's PBS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
0.05% Trypsin/0.02% EDTA-Solution 1x	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2.2. Behandlung

Stock- und Arbeitslösungen (Tabelle 2.2) wurden bei -20°C aufbewahrt. Exponentiell wachsende Zellkulturen wurden mit den Testsubstanzen für 24 h inkubiert. Danach wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und frisches Medium ohne Inhibitoren dazugegeben. Die Kontrollen wurden mit entsprechenden Mengen des Lösungsmittels (DMSO) behandelt.

Tabelle 2.2. Testsubstanzen

Testsubstanzen	Lösungsmittel	Stocklösung	Arbeitslösung	Firma
NVP-AUY922	DMSO	10 mM	100 µM	Novartis Biomedical Research, Basel, Schweiz
NVP-BEP800		50 mM		Novartis Biomedical Research, Basel, Schweiz
17-DMAG		1.62 mM		Sigma-Aldrich, Deisenhofen
KNK437		20 mM		Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt

2.3. Röntgenbestrahlung

Die Bestrahlung wurde bei RT mit Hilfe eines 6 MV Siemens Linearbeschleuniger (Siemens Medical Solutions, Concord, USA) mit einer Dosisrate von 2 Gy/min durchgeführt. Für die meisten Versuche wurden die Zellen als Monolayer in adhärentem Zustand in Kulturflaschen

bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen in frischem Medium für bestimmte Zeit (30 min, 24 h oder 48 h) inkubiert und anschließend geerntet. Für den Kolonietest wurden die Zellen in Suspension (20000 Zellen/ml) bestrahlt.

2.4. *In vitro* Zytotoxizitätstest

Zur Ermittlung geeigneter Konzentrationen der Testsubstanzen wurden die Zellen nach Protokoll trypsinisiert und in einer Konzentration von 5000 Zellen pro 100 µl (entspricht 5×10^4 Zellen/ml) in die Vertiefungen der 96-er Mikrotiterplatten für adhärente Zellen pipettiert und anschließend im Brutschrank inkubiert. Für die ATP-Tests wurden dafür spezielle lichtundurchlässige Mikrotiterplatten verwendet. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 100 µl zweifach konzentrierten Lösungen der zu testenden Substanz oder DMSO (in DMEM) behandelt, so dass einfach konzentrierte Lösungen in jeder Vertiefung entstanden. Die Zellviabilität wurde 24 h später mittels Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay oder CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (beide von Promega, Madison, WI, USA) bestimmt. Dafür wurde das verbrauchte Medium entfernt, ohne den Zellrasen zu verletzen, und ein Mal mit PBS gespült. Für den Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay wurde danach pro Vertiefung 100 µl Reagenz (1:10 in DMEM verdünnt) zugegeben. Die Mikrotiterplatten wurden für 30 min bis 1 h im Brutschrank inkubiert, danach für 1 min vorsichtig geschüttelt und anschließend die Absorption bei 492 nm ohne Deckel im ELISA Reader Apollo1 LB911 (Berthold Technologies, Bad Wildbad) gemessen. Für den CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay wurde pro Vertiefung 100 µl CellTiter-Glo Reagenz dazugegeben und 10 min bei RT inkubiert, anschließend die Lumineszenz gemessen.

Für die Bestimmung der Zytotoxizität der siRNAs in Kombination mit NVP-AUY922 und Bestrahlung wurde dieses Protokoll leicht abgewandelt. Sowohl die Transfektion als auch die Behandlung fand in 6-well Platten statt. Die transfizierten und behandelten Tumorzellen wurden trypsinisiert, gezählt, in 96-er Mikrotiterplatten in DMEM ohne Inhibitoren ausgesät und danach 4 h im Brutschrank inkubiert, damit sie adhären können. Anschließend wurden sie mit 8 Gy bestrahlt und danach unter Standardbedingungen inkubiert. Der Zytotoxizitätstest wurde 24 h nach Bestrahlung durchgeführt.

Für die Auswertung des Zytotoxizitätstests wurden die Werte der Triplikate gemittelt und gegen die DMSO behandelten Kontrollen normiert.

2.5. *In vitro* Zellproliferationstest (BrdU-Test)

Für diesen Test wurden die transfizierten und behandelten Tumorzellen in 96-er Mikrotiterplatten ausgesät, danach mit 8 Gy bestrahlt, und weiter unter Standardbedingungen inkubiert. Der Zellproliferationstest wurde 24 h nach Bestrahlung mittels Cell Proliferation ELISA, BrdU Kit (Roche, Großbritannien) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Auswertung des Zellproliferationstests wurden die Werte der Triplikate gemittelt und gegen die DMSO-behandelten Kontrollen normiert.

2.6. Kolonietest

Für den Kolonietest wurden die Tumorzellen wie beschrieben (siehe 2.2) behandelt, danach trypsinisiert, gezählt und als Zellsuspension (2×10^4 Zellen/ml) in sterilen Plastikröhrchen bestrahlt. Für jede Behandlung wurde eine Bestrahlungsreihe von 7 Röhrchen pipettiert, entsprechend der Bestrahlungsdosis 0, 1, 2, 3, 5, 7 und 8 Gy. Nach der Bestrahlung wurden in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis unterschiedliche Mengen an Zellen in vorher vorbereitete Petrischalen mit je 10 ml DMEM wie in Tabelle 2.3 angegeben pipettiert.

Tabelle 2.3. Pipettierschema für den Kolonietest

Dosis (Gy)	Anzahl der ausgesäten Tumorzellen		
	A549/GaMG	SNB19	HT1080
0	500	1000	500
1	500	1000	1000
2	500	1000	1000
3	1000	2500	5000
5	2500	5000	10000
7	5000	10000	15000
8	5000	10000	20000

Chemikalien für den Kolonietest:

Fixierlösung	Methanol (Roth, Karlsruhe) und Essigsäure (AppliChem, Darmstadt) im Verhältnis 3:1
Kristallviolett-Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, 0.6% in Wasser

Für jede Bedingung wurden vier Petrischalen ausgesät und für 10 - 14 Tage im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt, die Kolonien mit eiskalter Methanol-Essigsäure-Mischung fixiert und anschließend mit Kristallviolett (0.6% in Wasser) gefärbt. Das Auszählen der Kolonien erfolgte per Hand, wobei jede Kolonie über 50 Zellen ausgewertet wurde. Der Mittelwert von den jeweils vier Petrischalen mit gleichen Bedingungen wurde ermittelt, um daraus die Überlebensrate klonogener Zellen zu berechnen. Die Überlebensraten der bestrahlten Zellen wurden zu der Plattiereffizienz (PE-Werte) der unbestrahlten Proben normiert und in Abhängigkeit von der verwendeten Bestrahlungsdosis halblogarithmisch aufgetragen. Die entstandenen Zellüberlebenskurven wurden mit Hilfe des linear-quadratischen Modells berechnet. Nach diesem Model wird das Zellüberleben durch die Formel:

$$\ln SF = -\alpha D - \beta D^2$$

beschrieben, wobei $\ln SF$ der natürliche Logarithmus der Überlebensfraktion, D die applizierte Dosis (Einheit Gy), und α (Einheit $1/\text{Gy}$) und β (Einheit $1/\text{Gy}^2$) zellspezifische Konstanten sind. Die Berechnung der Zellüberlebenskurven erfolgte mit dem Programm Microcal Origin 5.0 (Microcal Software Inc, Northhampton, USA).

Wichtige Größen zur Auswertung der Ergebnisse sind der PE-Wert, d. h. das Verhältnis zwischen der Anzahl der gebildeten Kolonien und der Zahl der ausgesäten Zellen, der SF2-Wert, welcher die Überlebensrate nach einer Bestrahlungsdosis von 2 Gy wiedergibt, sowie der D10-Wert, der die Bestrahlungsdosis nennt, bei der 10% der Zellen überleben.

2.7. Proteindetektion mittels SDS-PAGE/Western Blot

Um zeitliche Veränderungen der Proteinexpression nach Behandlung und Bestrahlung detektieren zu können, wurden Zelllysate jeweils 30 min, 24 h und 48 h nach Bestrahlung hergestellt. Dazu wurden die Zellen wie beschrieben geerntet und je nach Pelletgröße in 30 - 50 μl RIPA-Lysepuffer mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren für 30 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (15 min, 13200 rpm, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

Die Proteinmenge wurde mit dem DC Protein Assay Kit 2 (BioRad, München) kolorimetrisch durch die Messung der Absorption im Spectrophotometer bei 750 nm

bestimmt. Mittels einer BSA-Eichgerade wurde der Proteingehalt der Zellysate berechnet. 5 bis 40 µg Protein pro Probe wurden, wie folgt, weiter bearbeitet. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben mit LDS Sample Buffer sowie Sample Reducing Buffer versetzt und 10 min bei 70°C im Wasserbad erhitzt. Anschließend wurden die denaturierten Proben auf SDS-Polyacrylamidgele geladen und elektrophoretisch nach Molekulargewicht aufgetrennt (200 V, 45 - 60 min). Zusätzlich zu den Proben wurde ein Molekulargewichtsstandard geladen und aufgetrennt. Die Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran erfolgte mittels Elektrophorese (30 V, 2 - 3 h) mit dem Tank-Blot-System von BioRad. Zum Nachweis des Proteintransfers wurden die geblotteten Membranen mit dem unspezifischen Farbstoff PonceauS gefärbt und anschließend mit Wasser entfärbt.

Für die Immundetektion der ausgewählten Proteine wurden zuerst die unspezifischen Bindungsstellen mit Blockierpuffer für 1 h bei RT blockiert; danach folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (gegen das zu untersuchende Protein gerichtet), welcher in Blockierpuffer nach Angaben des Herstellers verdünnt wurde. Unspezifische Bindungen wurden durch Waschen mit detergenzhaltigem Puffer wieder entfernt. Nach dem Waschschrift wurden die Membranen mit dem zweiten Peroxidase-gekoppelten Antikörper (HRP), welcher an spezifische Bereiche des ersten Antikörpers bindet, inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift fand die Detektion der verstärkten Chemilumineszenz (ECL) statt. In dieser Arbeit wurden sowohl das ECL Plus Western Blotting Detection Reagenz von Amersham als auch das home made ECL benutzt. Detektiert wurde das Signal mithilfe von Röntgenfilmen, wobei die Belichtungszeit zwischen 10 sec und 2 min variierte. Die verwendeten Antikörper sind unten aufgelistet. Vor der erneuten Proteindetektion wurden die Membranen zwei Mal für 10 min mit stripping buffer, zwei Mal für 10 min mit PBS und zwei Mal für 5 min mit TBST inkubiert.

Material für den Western Blot:

NuPAGE® 4 - 12% Bis-Tris Gel	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE® 3 - 8 Tris acetate Gel	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE® 10% Bis-Tris Gel	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE® MES SDS Running buffer 20x	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running buffer 20x	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE® Transfer buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE® LDS Sample buffer 4x	Invitrogen, Carlsbad, USA

NuPAGE® Sample Reducing Agent 10x	Invitrogen, Carlsbad, USA
Precision Plus All Blue Proteinmarker	BioRad, München
Nitrocellulose Membranen, Filterpapier (0.2 µm)	Invitrogen, Carlsbad, USA
PonceauS 0.2%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
ECL Plus Western Blotting Detection Reagens	Amersham, Freiburg
Röntgenfilme Hyperfilm ECL	Amersham, Freiburg
Röntgenkassette Hypercassette™	Amersham, Freiburg

Lösungen für den Western Blot:

RIPA-Lysepuffer	150 mM Tris-HCl, pH 7.4 1% NP-40 0.25% Na-Deoxycholat 150 mM NaCl 1 mM EDTA Proteaseinhibitoren: 1 mM PMSF, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin A Die Proteaseinhibitoren wurden unmittelbar vor Gebrauch zugegeben.
Blockierpuffer	4% Milch in 0.1% Tween-20/PBS
Waschpuffer	0.1% Tween-20/PBS
Stripping buffer	1.5% Glycin 0.1% SDS 1% Tween-20, pH 2.2
TBST	25 mM Tris base 150 mM NaCl 2 mM KCl 0.05% Tween-20, pH 7.4

home made ECL 0.25 g/l Luminol in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.6 (Lösung A);
 1.1 mg/ml p-Hydroxycoumarinsäure in DMSO (Lösung B)
 H₂O₂ 30% in Wasser (Lösung C). Vor Gebrauch 4 ml Lösung A, 400 µl
 Lösung B und 1.2 µl Lösung C pro Membran mischen

Antikörper für den Western Blot:

Primärantikörper

HSP90/HSP90 α	mouse monoclonal	BD Pharmingen, Heidelberg, D
HSP90 β	mouse monoclonal	Stressgen, Cat. No. SPA-840
HSP70	mouse monoclonal	BD Pharmingen, Heidelberg, D
AKT	rabbit polyclonal	Cell Signaling, Denvers, MA, USA
pAKT	mouse monoclonal	Cell Signaling, Denvers, MA, USA
RAF-1	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
CDK1/CDC-2	mouse monoclonal	Cell Signaling, Denvers, MA, USA
CDK2	rabbit polyclonal	Millipore, Temecula, CA, USA
CDK4	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
pRB	rabbit polyclonal	Cell Signaling, Denvers, MA, USA
PARP	rabbit polyclonal	Cell Signaling, Denvers, MA, USA
cleaved Caspase 3	rabbit polyclonal	Cell Signaling, Denvers, MA, USA
Survivin	rabbit polyclonal	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
p53	mouse monoclonal	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, D
DNA-PK	rabbit polyclonal	Cell Signaling, Denvers, MA, USA
KU70	rabbit polyclonal	Cell Signaling, Denvers, MA, USA
KU80	rabbit polyclonal	Cell Signaling, Denvers, MA, USA
ERK2	rabbit polyclonal	Cell Signaling, Denvers, MA, USA
β -Aktin	mouse monoclonal	Sigma, Deisenhofen,

Sekundärantikörper

anti-mouse	goat polyclonal, HRP-conjugated	DAKO, Hamburg
anti-rabbit	goat polyclonal, HRP-conjugated	DAKO, Hamburg

Geräte:

Spectrophotometer SmartSpec™ Plus	BioRad, München
High Current Supplier PowerPac™ HC	BioRad, München
Western Blot Kammer XCell SureLock™	Invitrogen, Carlsbad, USA
Filmentwicklungsmaschine ECOMAX™	Protec Medical Systems, Oberstenfeld

Die Proteinbanden wurden als invertierte, 8 bit TIFF-Dateien mittels ImageJ (Wane Rasband, NIH) densitometrisch quantifiziert. Für jede Bande wurde die integrale Dichte, definiert als Produkt zwischen Fläche und mittlere Graustufe, bestimmt. Anschließend wurden die Werte gegen die Ladekontrolle β -Aktin normiert.

2.8. Durchflusszytometrie

Um zeitliche Veränderungen im Zellzyklus bzw. Veränderungen in der Histon- γ H2AX-Expression nach Behandlung und Bestrahlung detektieren zu können, wurden FACS-Proben jeweils 30 min, 24 h und 48 h nach Bestrahlung hergestellt. Dazu wurden die Tumorzellen in Zellkulturflaschen mit den Testsubstanzen behandelt, mit 8 Gy bestrahlt und danach trypsinisiert. Die Zellpellets wurden in 500 μ l PBS resuspendiert, mit eiskaltem 70%igem Ethanol fixiert und bei 4°C aufbewahrt.

Für die FACS-Analysen wurden die fixierten Zellen zentrifugiert (5 min, 1300 rpm, 4°C), zwei Mal mit PBS gewaschen und anschließend je nach Pelletgröße in 50 - 200 μ l PBS resuspendiert. Für die immunhistologische Detektion von Histon- γ H2AX wurden 60 μ l Zellsuspension entnommen und mit 140 μ l anti- γ H2AX-FITC-gekoppelter Antikörper-Lösung (0.6 μ g/ml in Block 9-Puffer) für 2 h im Dunkeln bei RT unter Schütteln angefärbt. Für die Zellzyklus-Analysen wurden die Zellen mit PI (10 μ g/ml), 0.05% Saponin und RNase (50 μ g/ml) in PBS gelöst für 30 min bei 37°C inkubiert.

Die durchflusszytometrischen Analysen der grünen (Histon- γ H2AX) bzw. roten (DNA/PI) Fluoreszenz erfolgten am Analysegerät FACS Calibur® (BD Biosciences, Heidelberg) über die Software CELLQuest 3.1 (Becton Dickinson, Heidelberg). Hierbei wurden die Fluoreszenzfarbstoffe mit einem Argon-Laser der Wellenlänge 488 nm angeregt; für FITC wurde das Emissionslicht bei einer Wellenlänge von 530/30 nm und für PI bei 585/42 nm detektiert. Die Detektion der Fluoreszenzintensitäten von mindestens 15000 Zellen wurden entweder im linearen (Zellzyklusmessungen) oder logarithmischen Modus (Histon- γ H2AX, subG1-Fraktion) analysiert.

Antikörper für die immunohistochemische Detektion von Histon γ H2AX:

mouse monoclonal anti-phospho-histone H2AX, FITC-conjugated (Millipore, Temecula, CA, USA)

Chemikalien für die Durchflusszytometrie:

Ethanol	Roth, Karlsruhe
PI (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RNase A (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Blockierpuffer (Block 9)	0.1 g BSA 8 ml Mausserum (Sigma, Deisenhofen) 0.01 g RNase 10 mM NaF 1 mM NaVO ₃ 0.025 g DNA von Herringsperma (Sigma) 0.1% TritonX-100 5 mM EDTA 0.05% NaN ₃ 10 ml PBS 10x Auf 100 ml mit bidest. Wasser auffüllen

Die Daten wurden mithilfe der Software ModFit LT[®] (Verity Software House) ausgewertet und anschließend mittels WinMDI 2.9 (J. Trotter, The Scripps Research Institute) oder Origin 5.0 (Microcal, Northampton, MA, USA) dargestellt.

2.9. Alkaliner Comet Assay

Die Zellen wurden wie beschrieben behandelt (siehe 2.2). Jeweils 4×10^6 Zellen pro Behandlung wurden 1:10 mit 37°C warmer low melting point Agarose (0.6% in PBS) verdünnt. Aus dieser Zellsuspension wurden jeweils 45 μ l auf Superfrost Plus[®] Objektträger (Menzel, Braunschweig), die vorher mit high melting point Agarose (0.9% in PBS) beschichtet wurden, aufgeteilt und mit Deckgläschen bedeckt. Die vorbereiteten Objektträger wurden auf Eis mit 8 Gy bestrahlt, danach sofort oder nach folgenden Zeiten (10 min, 20 min und 30 min nach Bestrahlung) in kaltem Lysepuffer bei 4°C für 45 min inkubiert. Die Objektträger wurden dann in kaltem Elektrophoresepuffer für 20 min inkubiert zur

weiteren DNA-Entwindung. Anschließend wurden die Objektträger in eine horizontale Elektrophorese-kammer von Stratagene/Agilent, USA gelegt und mit kaltem Elektrophoresepuffer bedeckt. Die Elektrophorese wurde bei 25 V und 300 mA für 20 min auf Eis durchgeführt. Die Objektträger wurden danach drei Mal mit Neutralisationspuffer gespült. Anschließend wurden sie mit PI-Lösung gefärbt, mit Deckgläschen abgedeckt und in einer Feuchtekammer bei 4°C aufbewahrt, bis sie innerhalb von 24 h analysiert wurden.

Chemikalien und Lösungen für den alkalinen Comet Assay:

Low melting point agarose	Roth, Karlsruhe
High melting point agarose	Roth, Karlsruhe
PI	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Lysepuffer	2.5 M NaCl 100 mM EDTA 10 mM Tris 1% Natriumlaurylsarcosinat, pH 10 Vor Gebrauch 10% DMSO und 1% TritonX-100 zugeben
Elektrophoresepuffer	300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 10
Neutralisationspuffer	0.4 M Tris, pH 7.5
PI-Lösung	10 µg/ml in PBS

Es wurden jeweils 150 Zellkerne/Bedingung aus zwei unabhängigen Versuchen, mithilfe des Epifluoreszenzmikroskops Leica® DMLB (Leica Mikroskopie GmbH, Wetzlar) woran die Kamera Olympus® ColorView 12 (Olympus Biosystems, Hamburg) angeschlossen wurde, analysiert. Die DNA-Fragmentierung wurde mit der Software Komet 5.5 (Kinetik Imaging Ltd, Liverpool, UK) bestimmt und über den TM-Wert (tail moment, in a. u. angegeben), definiert als Produkt aus DNA im Kometenschweif (in %) und Schweiflänge, quantifiziert.

2.10. siRNA Transfektion

Die Zellen wurden in einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen/Vertiefung in 6-well Platten oder 1×10^6 Zellen pro Petrischale mit 10 cm Durchmesser ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und frisches DMEM ohne Serum

und Antibiotika zugegeben. Die siRNA-Lösungen wurden frisch vor Gebrauch aus 20 µM Stocklösungen hergestellt und in der Konzentration von 10 - 100 nM in DMEM eingesetzt. Die siRNA-Lösungen wurden mit dem Transfektionsreagenz HiPerfekt vorsichtig gemischt, 5 - 10 min bei RT inkubiert, dann tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 4 h Inkubation wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und frisches DMEM zugegeben. Die Transfektionseffizienz wurde mittels fluoreszenzmarkierten non-silencing siRNAs (AllStras Negative Control siRNA, Alexa Fluor 488) überprüft.

siRNAs	Sequenz 5' → 3'
AllStras Neg. Control siRNA	geheim gehalten
Mm/Hs_MAPK1/ERK2 control siRNA	UGC UGA CUC CAA AGC UCU GTT
siRNA gegen HSP90α 1, Hs_HSP90AA1_1	AAC CCU GAC CAU UCC AUU AUU
siRNA gegen HSP90α 2, Hs_HSP90AA1_2	UGC ACU GUA AGA CGU AUG UAA
siRNA gegen HSP90α 4, Hs_HSPCA_4	AUG GCA UGA CAA CUA CUU UAA
siRNA gegen HSP90α 5, Hs_HSPCA_5	CAG AAU GAA GGA GAA CCA GAA

Alle siRNAs sowie das Transfektionsreagenz wurden von Qiagen, Hilden erworben.

2.11. Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Die Gesamt-RNA wurde mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und in 30 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Die Qualität der RNA wurde auf Basis der ribosomalen Untereinheiten 18S und 28S rRNA nach Auftrennung mittels Agarosegelelektrophorese bestimmt.

Die Proben wurden für 30 min bei 37°C mit DNaseI verdaut, gefolgt von der Hitzeinaktivierung des Enzyms. Die Quantifizierung der Gesamt-RNA erfolgte über die Absorbtion bei 260 nm im Spectrophotometer SmartSpec™ Plus (BioRad, München), wobei eine Absorbtion von 1 einer Konzentration von 40 µg/ml RNA entspricht. Dafür wurden die Proben 1:50 in RNase-freiem Wasser verdünnt und in sterile UV-Küvetten (trUView™ Cuvette, BioRad, München) überführt.

Für die cDNA Synthese mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) wurden 50 ng RNA mit 4 µl RT Puffer, 1 µl RNase-Inhibitoren, 2 µl Deoxinukleosid-Mix (dNTP), 2 µl RT-Polymerase, 1 µl random-hexamer Primer pipettiert und mit RNase-freies Wasser auf 20 µl Endvolumen aufgefüllt. Die Amplifikation erfolgte in dem C100

Thermal Cycler von BioRad nach dem folgenden Programm: [5 min 25°C, 60 min 37°C, 5 min 70°C ENDE].

1/10 der cDNA Synthese (2 µl) konnte ohne weitere Reinigung für die PCR eingesetzt werden. Die PCR wurde mittels Phusion High-Fidelity PCR Kit (Finnzymes/New England Biolabs, Frankfurt) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dafür wurden pro Probe 4 µl Phusion Puffer, 0.4 µl dNTPs, 0.2 µl Phusion Polymerase, 1 µl forward Primer, 1 µl reverse primer pipettiert und auf 20 µl Nuklease-freies Wasser aufgefüllt. Die Amplifikation erfolgte in dem C100 Thermal Cycler von BioRad nach dem folgenden Programm: [30 sec 98°C (Denaturierung), (10 sec 98°C (Denaturierung), 15 sec 58°C (Annealing), 30 sec 72°C (Elongation)) x25 Zyklen, gefolgt von 10 min 72°C (finale Elongation), 4°C ENDE].

Die Auftrennung der PCR-Produkte in Abhängigkeit ihrer Größe erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Dafür wurden die Proben (je 5 µl) mit Ladepuffer (1 µl) gemischt und in einem 1%iges Agarosegel in TAE-Puffer und 0.2 µg/ml Ethidiumbromid für 30 min bei 100 V in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer (G. Kisker GbR, Steinfurt) aufgetrennt. Die Gele wurden mit dem Geldokumentationssystem Gel iX Imager von Intas, Göttingen fotografiert. Die Größe der Amplifikate wurde anhand des aufgetragenen DNA-Markers bestimmt. Die Banden wurden mit dem Programm ImageJ (Wane Rasband, NIH) ausgewertet.

Chemikalien und Materialien für die RT-PCR:

Agarose	Roth, Karlsruhe
DNA Loading Dye 6x	Fermentas, St. Leon-Rot
DNase I, RNase-free	Fermentas, St. Leon-Rot
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase	BioRad, München
Quick load 100 bp DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt
RNase freies Wasser	Qiagen, Hilden
TAE Electrophoresis Buffer 50x	Fermentas, St. Leon-Rot

PCR-Primer:

Hsp90α forward	5' CAAGACCAACCGATGGAGG 3'
Hsp90α reverse	5' ACCAGCCTGCAAAGCTTCC 3'
GAPDH forward	5' CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG 3'
GAPDH reverse	5' GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG 3'

Für die PCR-Primer wurden Arbeitslösungen (10 pmol/ μ l) in nukleasefreiem Wasser aus den Stocklösungen (100 pmol/ μ l) hergestellt, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.12. Sonstige Chemikalien

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), BD Pharmingen (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) im Reinheitsgrad pro analysis bezogen.

2.13. Plastik- und Glasmaterial

Das Plastik und Glasmaterial wurde von den Firmen Greiner (Frickenhausen), Eppendorf (Hamburg), Nunc (Langenselbold), Merk (Darmstadt) und BD Biosciences (Heidelberg) bezogen.

2.14. Statistik

Pro Versuch wurden mindestens zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Daten werden als arithmetische Mittelwerte (MW) mit ihren Standardabweichungen (STABW) oder Standardfehlern (SF) angegeben. Die erhaltenen Mittelwerte wurden mit Hilfe des one-way ANOVA-Tests verglichen. Der Grenzwert der statistischen Signifikanz wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Origin 5.0 (Microcal, Northampton, MA, USA).

3. Ergebnisse

3.1. Modulation der Strahlenempfindlichkeit humaner Tumorzelllinien mittels der neuartigen HSP90-Inhibitoren NVP-AUY922 und NVP-BEP800

3.1.1. Bestimmung der Zellviabilität nach HSP90-Inhibition und Bestrahlung

Um die optimale Konzentration der HSP90-Inhibitoren zu bestimmen wurde zuerst die Zytotoxizität dieser Substanzen in allen getesteten Tumorzelllinien bestimmt. Dafür wurden die Tumorzellen mit verschiedenen Konzentrationen von NVP-AUY922, NVP-BEP800 oder 17-DMAG (0.01 - 5 μ M) für 24 h behandelt und anschließend ihre Viabilität (siehe 2.4) gemessen. Hierbei diente die metabolische Aktivität als Maß für die Lebensfähigkeit der Tumorzellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an HSP90-Inhibitoren. Für die Auswertung wurde die Zellviabilität der unbehandelten Kontrollzellen auf 100% gesetzt und die restlichen Messdaten darauf normiert. Die relative Viabilität in Abhängigkeit der Konzentration der HSP90-Inhibitoren ist in Abb. 3.1.1 für alle untersuchten Tumorzelllinien dargestellt.

Wie in Abb. 3.1.1. zu sehen, reduzierte die Behandlung mit HSP90-Inhibitoren die Viabilität der getesteten Tumorzelllinien in Abhängigkeit der Konzentration und des Zelltyps. Im nanomolaren Bereich (50 – 1000 nM) war die Zellviabilität der meisten Tumorzelllinien bis auf 65% reduziert, während SNB19-Tumorzellen 85% Zellviabilität aufwiesen. In dem mikromolaren Bereich (1 - 5 μ M) wurde eine Reduktion der Zellviabilität bis auf 10 - 20% in den Tumorzelllinien HT1080 und GaMG beobachtet; die Tumorzelllinie A549 zeigte eine Reduktion der Zellviabilität bis auf 45%, die Tumorzelllinie SNB19 eine Reduktion der Zellviabilität bis auf 65%. Damit waren die Tumorzelllinien A549 und SNB19 weniger empfindlich gegenüber erhöhten Konzentrationen von HSP90-Inhibitoren als die Tumorzelllinien GaMG und HT1080, wobei die SNB19-Tumorzelllinie am wenigsten empfindlich reagierte.

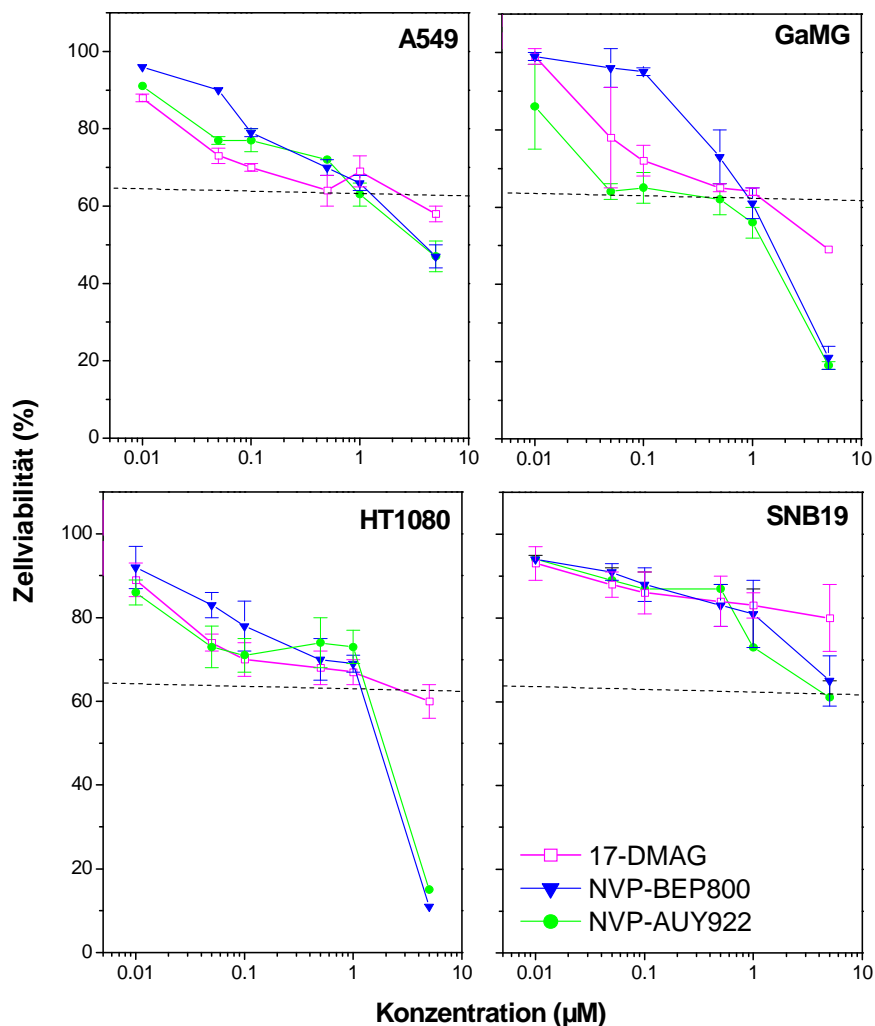


Abb. 3.1.1. Zellviabilität humaner Tumorzelllinien nach Behandlung mit HSP90-Inhibitoren. Die Tumorzellen wurden für 24 h mit einer Verdünnungsreihe von 0, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1 und 5 µM NVP-AUY922 (grün), NVP-BEP800 (blau), 17-DMAG (magenta) behandelt. Jeder Messpunkt stellt die relative Viabilität der Tumorzellen nach jeweiliger Behandlung im Vergleich zu DMSO behandelten Kontrollen dar (MW ± STABW). Die punktierte Linie zeigt die 65%ige Viabilität der Tumorzellen (modifiziert nach Stingl et al. 2010 und reproduziert mit freundlicher Genehmigung vom Verlag Nature Publishing Group).

Für weitere Untersuchungen wurde die Konzentration von 200 nM für alle HSP90-Inhibitoren ausgewählt, bei der alle Tumorzelllinien eine Zellviabilität von mindestens 65% aufwiesen. Dies lag nahe bei der in der Literatur verwendeten Konzentration für 17-DMAG von 100 nM (Robles et al. 2006; Koll et al. 2008).

3.1.2. Einfluss von HSP90-Inhibition und Bestrahlung auf die Koloniebildungsfähigkeit

Um den Effekt der neuartigen HSP90-Inhibitoren auf die Strahlenantwort der Tumorzelllinien zu bestimmen, wurden Kolonietests durchgeführt. Wie in der Abb. 3.1.2 gezeigt, verliefen die Zellüberlebenskurven nach Kombination der Bestrahlung mit HSP90-Inhibitoren im Vergleich zu den Kontrollen viel steiler, was auf den radiosensibilisierenden Effekt der HSP90-Inhibitoren hinweist.

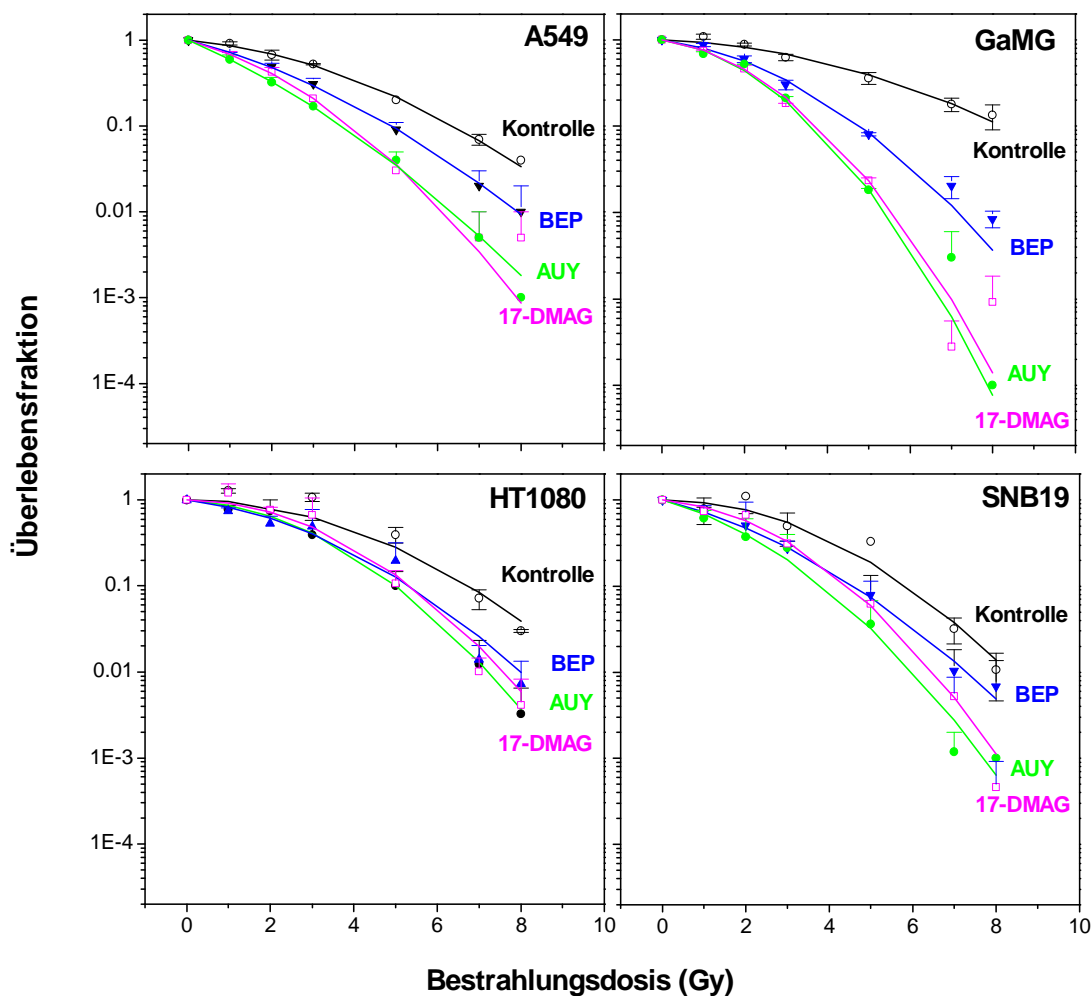


Abb. 3.1.2. Koloniebildungsfähigkeit humaner Tumorzelllinien nach Behandlung mit HSP90-Inhibitoren und Bestrahlung. Die Abbildung zeigt die Dosis-Überlebenskurven verschiedener Tumorzelllinien nach Behandlung mit NVP-AUY922 (grün), NVP-BEP800 (blau), 17-DMAG (magenta) oder DMSO als Kontrolle (schwarz) in Abhängigkeit von der Strahlendosis (0 bis 8 Gy), ermittelt nach dem linear-quadratischen Modell. Jeder Datenpunkt stellt die Überlebensfraktion klonogener Tumorzellen im Vergleich zu den unbestrahlten Proben dar und ist ein Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen mit den entsprechenden Standardfehlern (modifiziert nach Stingl et al. 2010 und reproduziert mit freundlicher Genehmigung vom Verlag Nature Publishing Group).

Die Tabelle 3.1.1 fasst die Überlebensfraktion der unbestrahlten Tumorzellen (PE-Werte) sowie die strahlenbiologischen Parameter SF2 und D10 nach HSP90-Inhibition und Bestrahlung als Mittelwerte aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit dazugehörigen Standardfehlern zusammen. Die SF2-Werte geben die Überlebensfraktion nach Bestrahlung mit der klinisch relevanten Dosis 2 Gy an. Die D10-Werte geben die Bestrahlungsdosen an, die benötigt werden, damit 90% der Tumorzellen die Koloniebildungsfähigkeit verlieren.

Tabelle 3.1.1. Plattiereffizienz sowie strahlenbiologische Parameter SF2 und D10 nach Kombination der Bestrahlung mit HSP90-Inhibitoren in humanen Tumorzelllinien (MW \pm SF).

Tumorzelllinie	PE	SF2	D₁₀ (Gy)
A549-DMSO	0.8 \pm 0.1	0.70 \pm 0.05	7
+AUY	0.5 \pm 0.01	0.33 \pm 0.06	4
+BEP	0.8 \pm 0.1	0.52 \pm 0.1	5
+17-DMAG	0.7 \pm 0.1	0.41 \pm 0.08	4
GAMG-DMSO	0.3 \pm 0.1	0.84 \pm 0.01	8
+AUY	0.1 \pm 0.0	0.46 \pm 0.04	4
+BEP	0.3 \pm 0.1	0.57 \pm 0.08	5
+17-DMAG	0.1 \pm 0.05	0.44 \pm 0.02	4
HT1080-DMSO	0.1 \pm 0.04	0.81 \pm 0.0	7
+AUY	0.02 \pm 0.03	0.63 \pm 0.2	5
+BEP	0.1 \pm 0.03	0.59 \pm 0.2	6
+17-DMAG	0.03 \pm 0.01	0.70 \pm 0.1	6
SNB19-DMSO	0.3 \pm 0.1	0.53 \pm 0.3	6
+AUY	0.2 \pm 0.1	0.40 \pm 0.3	4
+BEP	0.2 \pm 0.1	0.45 \pm 0.2	5
+17-DMAG	0.1 \pm 0.1	0.53 \pm 0.2	5

Wie in Tabelle 3.1.1 ersichtlich, reduzierte die alleinige Behandlung mit NVP-AUY922 und 17-DMAG die Überlebensfraktion der Tumorzellen. In der A549-Tumorzelllinie war die Plattiereffizienz nach alleiniger Behandlung mit NVP-AUY922 um den Faktor 1.6 und nach Behandlung mit 17-DMAG um den Faktor 1.2 reduziert im Vergleich zur Plattiereffizienz der Kontrollen. In der GaMG-Tumorzelllinie war die Plattiereffizienz nach alleiniger Behandlung

mit NVP-AUY922 oder 17-DMAG um ein Drittel reduziert im Vergleich zu den Kontrollen. In der HT1080-Tumorzelllinie war die Plattiereffizienz nach alleiniger Behandlung mit NVP-AUY922 oder 17-DMAG um den Faktor 5 im Vergleich zur 10%igen Plattiereffizienz der Kontrollen reduziert. In der Tumorzelllinie SNB19 war die Plattiereffizienz nach alleiniger Behandlung mit NVP-AUY922 um den Faktor 1.5 und nach alleiniger Behandlung mit 17-DMAG auf ein Drittel reduziert im Vergleich zur 30%igen Plattiereffizienz der Kontrollen. Nach alleiniger Behandlung mit NVP-BEP800 waren die PE-Werte der Tumorzelllinien A549, GaMG und HT1080 nicht beeinflusst, während die mit NVP-BEP800 behandelten SNB19-Tumorzellen eine verminderte Koloniebildungsfähigkeit um einen Faktor von 1.5 im Vergleich zu den Kontrollzellen aufwiesen.

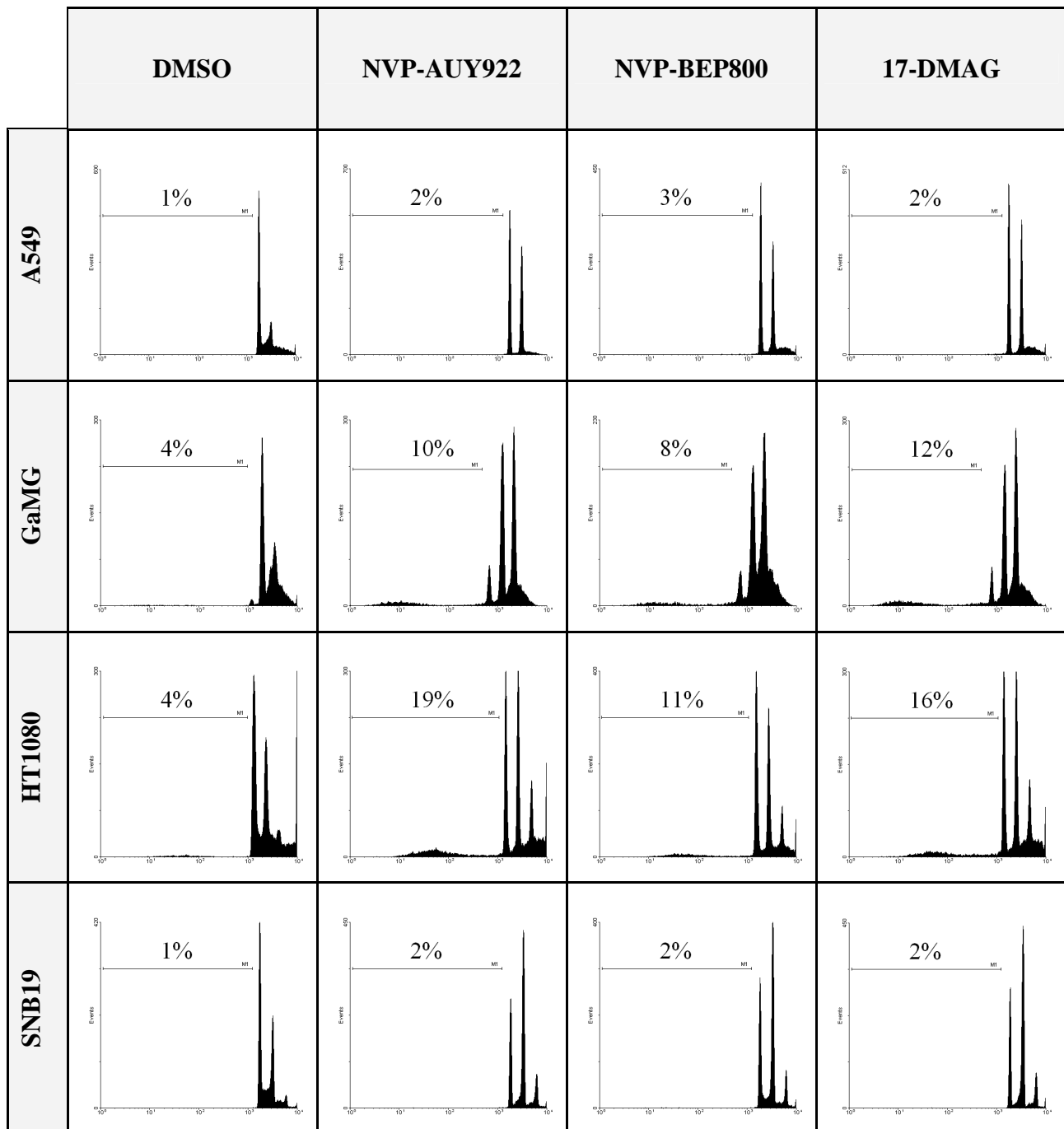
Nach Kombination der Bestrahlung mit HSP90-Inhibitoren wurden geringere SF2- und D10-Werte nach als nach alleiniger Bestrahlung erreicht. Dabei hatte NVP-AUY922 meistens eine stärkere radiosensibilisierende Wirkung als NVP-BEP800. Wie in der Tabelle 3.1.1 ersichtlich, zeigte die A549-Tumorzelllinie eine Reduktion der SF2-Werte um den Faktor 2 nach Behandlung mit NVP-AUY922, um den Faktor 1.7 nach Behandlung mit 17-DMAG und um den Faktor 1.3 nach Behandlung mit NVP-BEP800 im Vergleich zu alleiniger Bestrahlung. Dazu wurden die D10-Werte um einen Faktor von 1.8 nach Behandlung mit NVP-AUY922 und 17-DMAG und um den Faktor 1.4 nach Behandlung mit NVP-BEP800 im Vergleich zu alleiniger Bestrahlung reduziert. In der GaMG-Tumorzelllinie waren die SF2-Werte um Faktor 1.8 nach Behandlung mit NVP-AUY922 und 17-DMAG und um Faktor 1.5 nach Behandlung mit NVP-BEP800 im Vergleich zu alleiniger Bestrahlung reduziert. Die D10-Werte waren um einen Faktor von 2 nach Behandlung mit NVP-AUY922 und 17-DMAG und um den Faktor 1.6 nach Behandlung mit NVP-BEP800, im Vergleich zu alleiniger Bestrahlung, reduziert. Die Tumorzelllinie HT1080 zeigte eine Reduktion der SF2-Werte um den Faktor 1.3 nach Behandlung mit NVP-AUY922 oder 17-DMAG und um den Faktor 1.2 nach Behandlung mit NVP-BEP800 im Vergleich zu alleiniger Bestrahlung. Dazu wurden die D10-Werte um den Faktor 1.4 nach Behandlung mit NVP-AUY922 und um den Faktor 1.2 nach Behandlung mit NVP-BEP800 oder 17-DMAG, im Vergleich zu alleiniger Bestrahlung, reduziert. In der SNB19-Tumorzelllinie waren die SF2-Werte um den Faktor 1.2 nach Behandlung mit NVP-AUY922 und NVP-BEP800 reduziert, während nach Behandlung mit 17-DMAG keine Reduktion der SF2-Werte gemessen wurde. Die D10-Werte waren um den Faktor 1.5 nach Behandlung mit NVP-AUY922 und um den Faktor 1.2 nach Behandlung mit NVP-BEP800 oder 17-DMAG, im Vergleich zu alleiniger Bestrahlung, reduziert.

In weiteren Experimenten, die in den folgenden Kapiteln beschrieben werden, wurden mögliche zelluläre Antworten (Zellzyklusarrest, Reparatur der DNA-Schäden, Zelltod) untersucht, um den Mechanismus der beobachteten Radiosensibilisierung nach HSP90-Inhibition mittels NVP-AUY922 und NVP-BEP800 in den getesteten Tumorzelllinien zu erklären.

3.1.3. Messung der subG1-Fraktion nach HSP90-Inhibition und Bestrahlung

Um das Ausmaß des zellulären Absterbens nach HSP90-Inhibition und Bestrahlung zu bestimmen, wurde der prozentuale Anteil an Tumorzellen mit hypodiploidem DNA-Gehalt sowie Zelltrümmern (subG1-Fraktion) in jede Population mittels Durchflusszytometrie wie bereits beschrieben (Djuzenova & Flentje 2002) analysiert. Damit können Anzeichen von Spätapoptose detektiert werden. Nach Behandlung mit HSP90-Inhibitoren (200 nM, 24 h), wurden sowohl die adhärenenten als auch die abgelösten Tumorzellen gesammelt, fixiert und mit PI gefärbt. Die Detektion der Fluoreszenzintensität von PI wurde durchflusszytometrisch im logarithmischen Modus analysiert.

Repräsentative FACS-Analysen der subG1-Fraktion humaner Tumorzellen nach alleiniger Behandlung mit HSP90-Inhibitoren sind in der Abb. 3.1.3 gezeigt. Die Abb. 3.1.4 fasst die gemittelten Ergebnisse der FACS-Analysen mit ihren Standardfehlern aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen für alle getesteten Tumorzelllinien zusammen.



PI/DNA-Gehalt, a. u.

Abb. 3.1.3. SubG1-Fraktion nach alleiniger Behandlung humaner Tumorzelllinien mit HSP90-Inhibitoren. Für die FACS-Analysen wurden adhärenente und abgelöste Zellen gerntet, fixiert und mit PI in Anwesenheit von RNase gefärbt, dann durchfluszytometrisch im logarithmischen Modus analysiert. Die Abbildung stellt repräsentative FACS-Analysen dar, wobei die angegebenen Zahlen den prozentualen Anteil der subG1-Fraktion angeben.

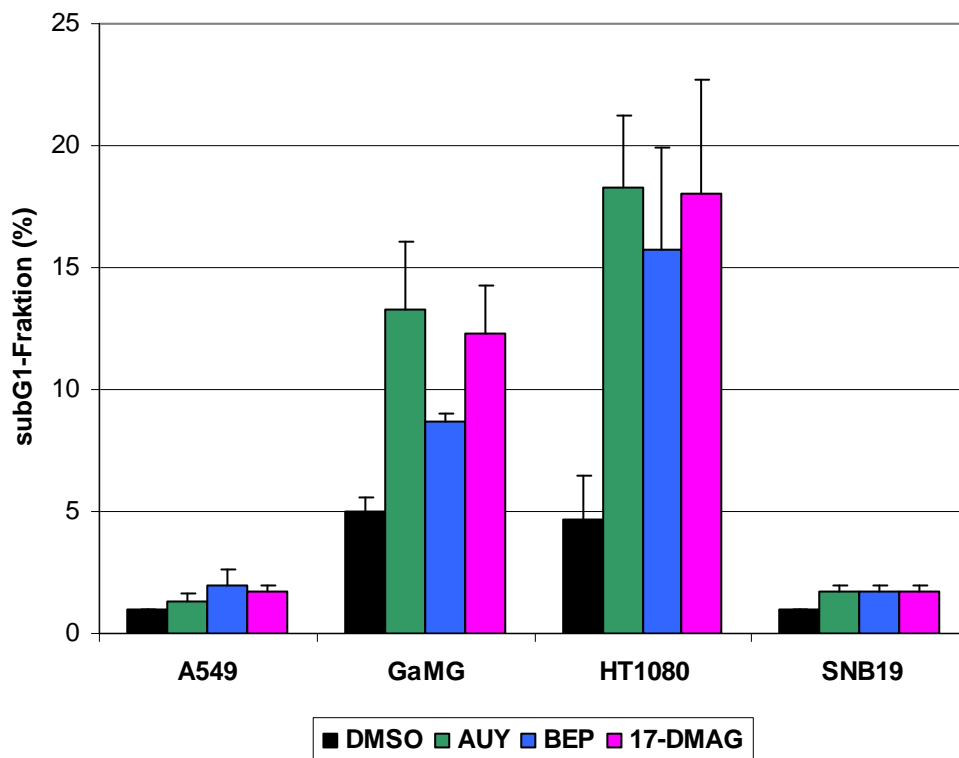


Abb. 3.1.4. SubG1-Fraktion nach alleiniger Behandlung humaner Tumorzelllinien mit den HSP90-Inhibitoren NVP-AUY922, NVP-BEP800 oder 17-DMAG. Die Abbildung fasst die gemittelten Ergebnisse der FACS-Analysen mit den entsprechenden Standardfehlern aus drei unabhängigen Versuchen für alle getesteten Tumorzelllinien zusammen und ergänzt Abb. 3.1.3.

Wie in Abb. 3.1.3 und Abb. 3.1.4 ersichtlich, betrug der Anteil der subG1-Fraktion in den Kontrollproben circa 5% für die Tumorzelllinien HT1080 und GaMG und unter 5% für die Tumorzelllinien A549 und SNB19. Die subG1-Fraktion der GaMG-Tumorzellen stieg beinahe um das 3-fache nach Behandlung mit NVP-AUY922 oder 17-DMAG und um das 2-fache nach Behandlung mit NVP-BEP800 im Vergleich zur Kontrolle. In der Tumorzelllinie HT1080 wurde ein Anstieg der subG1-Fraktion um das 4-fache nach Behandlung mit NVP-AUY922 oder 17-DMAG und um das 3-fache nach Behandlung mit NVP-BEP800 im Vergleich zur Kontrolle erreicht. Dagegen konnte keine signifikante Veränderung bezüglich der subG1-Fraktion nach Behandlung mit HSP90-Inhibitoren in den Tumorzelllinien A549 und SNB19 verzeichnet werden.

Weiterhin wurden subG1-Analysen nach Kombination der HSP90-Inhibition mit Bestrahlung durchgeführt. Dafür wurden die Tumorzellen mit HSP90-Inhibitoren (200 nM, 24 h) behandelt und danach mit 8 Gy bestrahlt. Repräsentative FACS-Analysen der subG1-Fraktion humaner Tumorzellen, die mit HSP90-Inhibitoren behandelt wurden, 24 h und 48 h nach der Bestrahlung (post-IR), sind in Abb. 3.1.5A-D dargestellt.

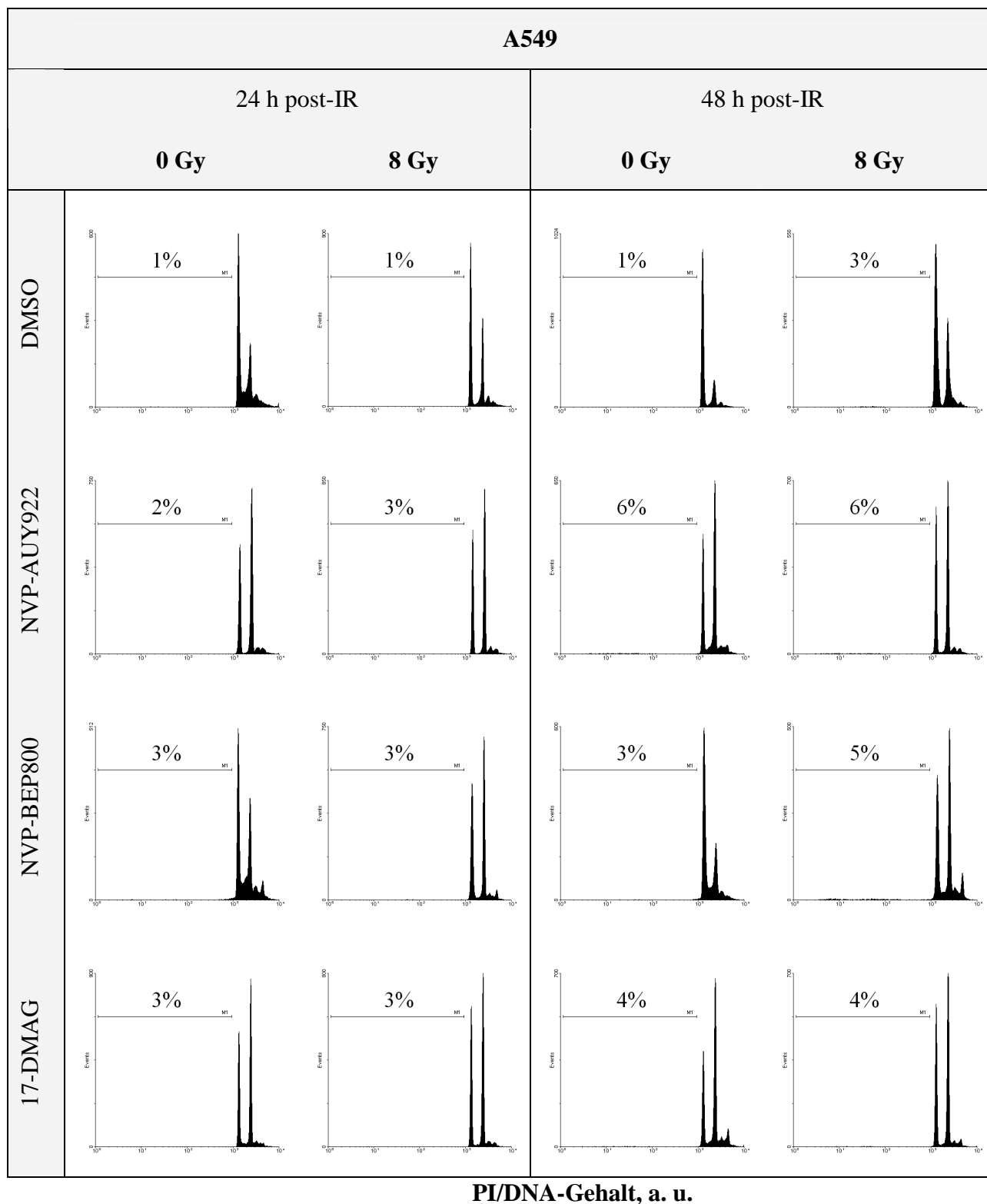


Abb.3.1.5A. SubG1-Fraktion in der A549-Tumorzelllinie nach HSP90-Inhibition und IR. Die Tumorzellen wurden mit verschiedenen HSP90-Inhibitoren behandelt, dann mit 8 Gy bestrahlt und anschließend in frischem DMEM bis zu Analyse inkubiert. Die Abbildung zeigt repräsentative FACS-Analysen 24 h und 48 h nach der Bestrahlung. Die angegebenen Zahlen stellen den prozentualen Anteil der subG1-Fraktion aus jeder Tumorzellpopulation dar (reproduziert aus Stingl et al. 2010 mit freundlicher Genehmigung vom Verlag Nature Publishing Group).

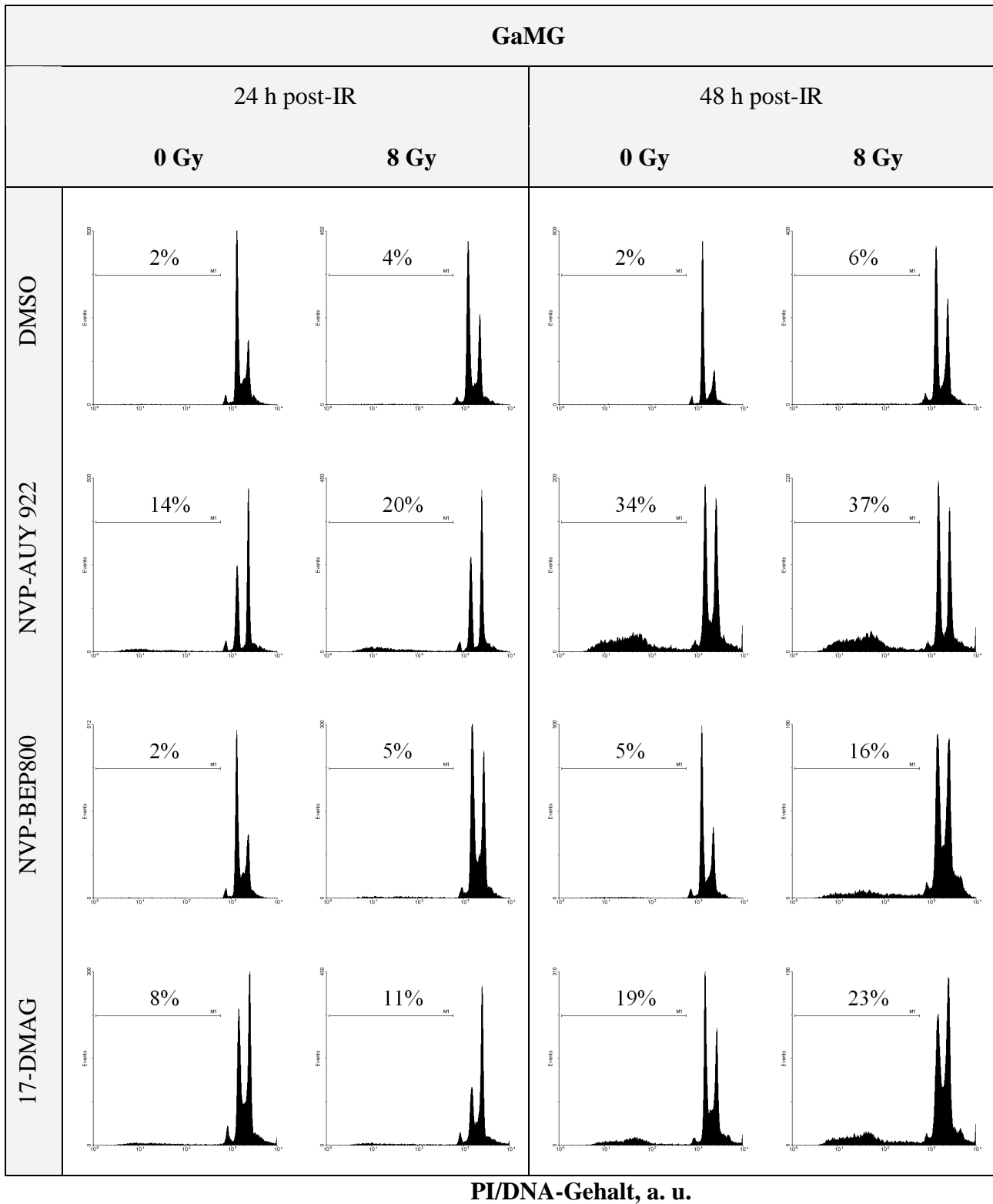
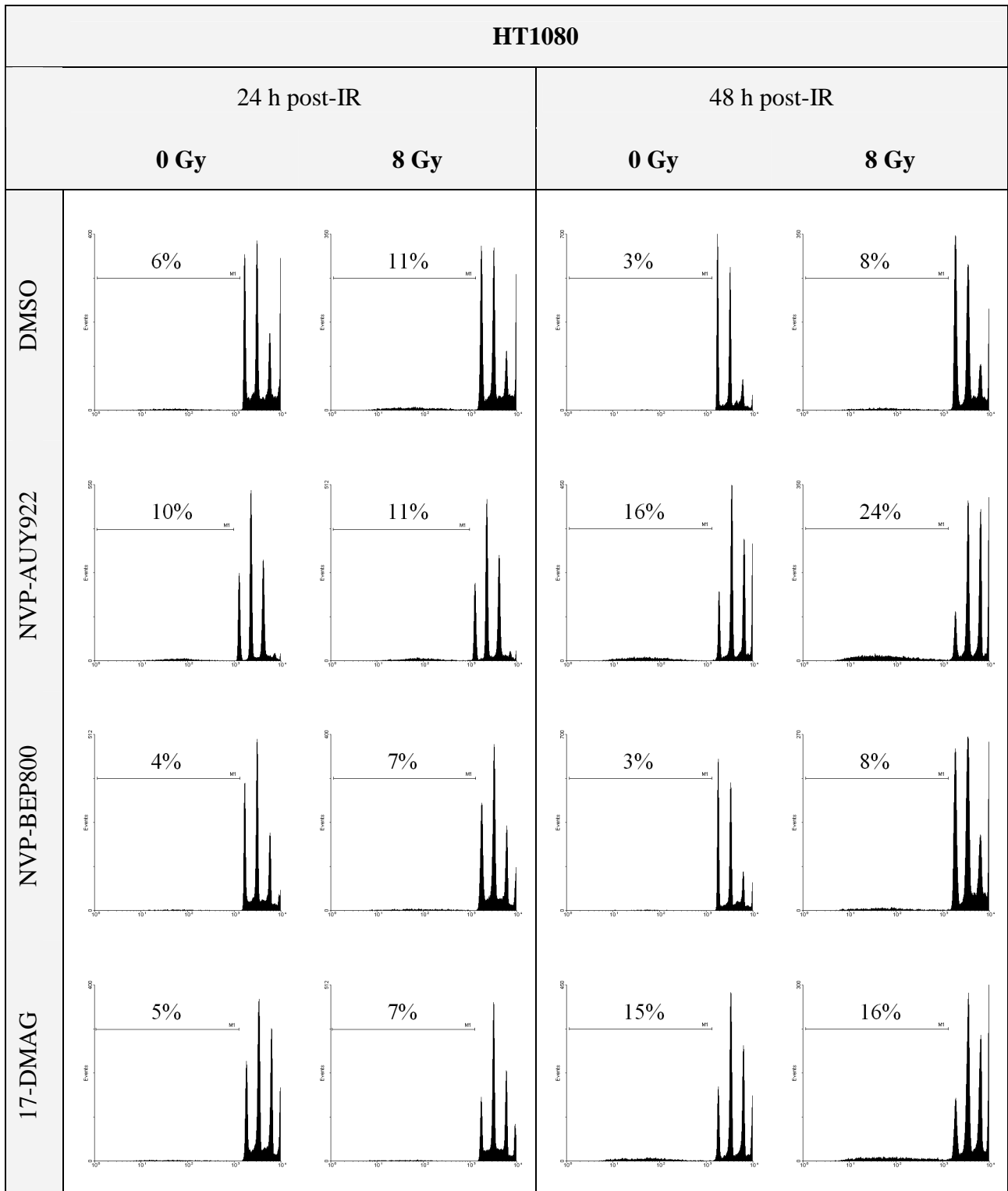
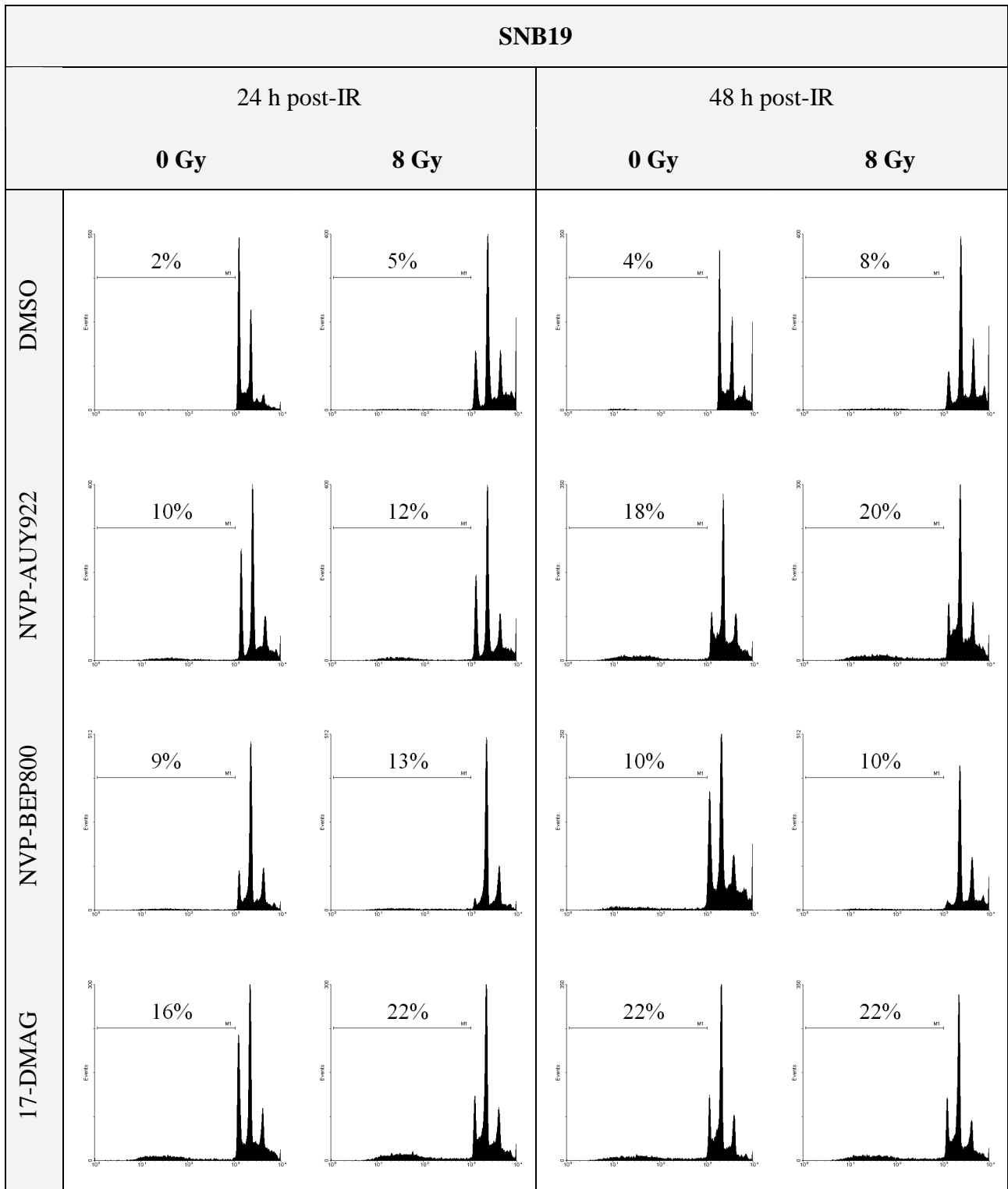


Abb.3.1.5B. SubG1-Fraktion in der GaMG-Tumorzelllinie nach HSP90-Inhibition und IR. Für Legende siehe Abb. 3.1.5A.



PI/DNA-Gehalt, a. u.

Abb.3.1.5C. SubG1-Fraktion in der HT1080-Tumorzelllinie nach HSP90-Inhibition und IR. Für Legende siehe Abb. 3.1.5A.



PI/DNA-Gehalt, a. u.

Abb.3.1.5D. SubG1-Fraktion in der SNB19-Tumorzelllinie nach HSP90-Inhibition und IR. Für Legende siehe Abb. 3.1.5A.

Die Abb. 3.1.6 stellt die gemittelten Ergebnisse der subG1-Messungen mit ihren Standardfehlern aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen für alle getesteten Tumorzelllinien dar.

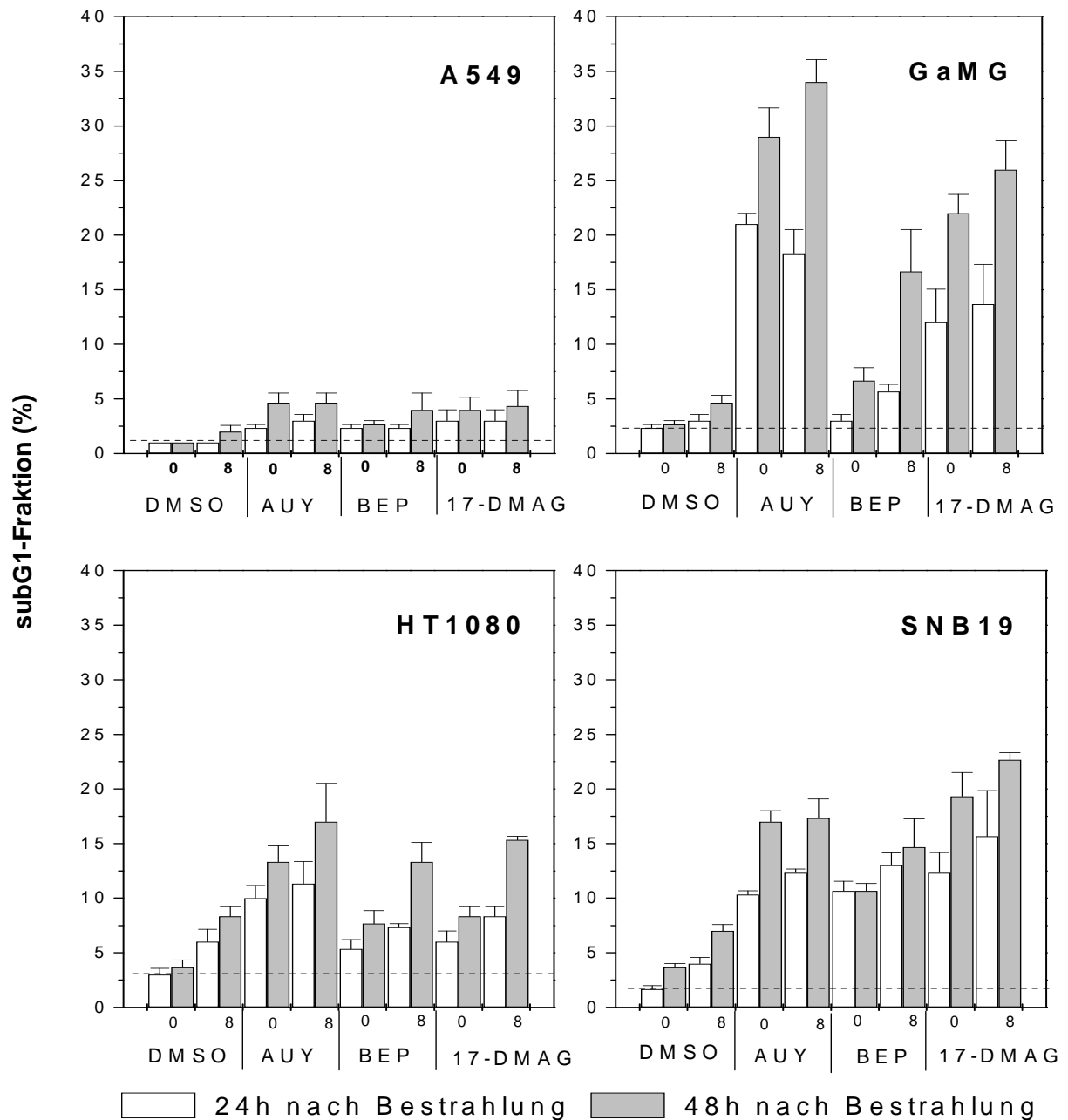


Abb. 3.1.6. subG1-Analyse in humanen Tumorzelllinien nach HSP90-Inhibition und Bestrahlung. Die Abbildung fasst die gemittelten Ergebnisse der subG1-Messungen mit ihren Standardfehlern aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen für alle getesteten Tumorzelllinien zusammen und ergänzt Abb. 3.1.5. Die gestrichelte Linie verdeutlicht den prozentualen Anteil der subG1-Fraktion in der Kontrolle (DMSO, 0 Gy).

Wie in Abb. 3.1.6 ersichtlich, blieben die Werte der subG1-Fraktion in der A549-Tumorzelllinie unter 5%, unabhängig von der Behandlung und Bestrahlung. In den anderen untersuchten Tumorzelllinien wurde ein deutlicher Anstieg der subG1-Fraktion nach einer Behandlung mit HSP90-Inhibitoren im Vergleich zu den Kontrollen detektiert. Dabei betrug die subG1-Fraktion der GaMG-Tumorzelllinie circa 30% nach alleiniger Behandlung mit NVP-AUY922 und circa 20% nach alleiniger Behandlung mit 17-DMAG. In der HT1080-Tumorzelllinie war die subG1-Fraktion auf circa 15% nach alleiniger Behandlung mit NVP-AUY922 angestiegen, während die mit NVP-BEP800 oder 17-DMAG behandelten Tumorzellen eine subG1-Fraktion unter 10% zeigten (48 h-Werte). Die subG1-Fraktion der SNB19-Tumorzelllinie betrug etwa 15% nach alleiniger Behandlung mit HSP90-Inhibitoren (48 h-Werte).

Nach Kombination der Bestrahlung mit HSP90-Inhibitoren stieg die subG1-Fraktion um maximal 5% im Vergleich zur alleinigen HSP90-Inhibition, außer nach der Behandlung der GaMG-Tumorzelllinie mit NVP-BEP800, wo ein Anstieg der subG1-Fraktion um etwa 10% im Vergleich zur alleinigen HSP90-Inhibition gemessen wurde.

3.1.4. Einfluss von HSP90-Inhibition und Bestrahlung auf die Expression von Apoptose-regulierenden Proteinen

In weiterführenden Versuchen wurde das Ausmaß der Apoptose mittels Western Blot untersucht. Dazu wurde die Expression diverser Proteine, welche den Apoptose-Signaltransduktionsweg direkt oder indirekt regulieren, darunter HSP90, HSP70, RAF-1, AKT, pAKT, Survivin, p53, sowie die Expression aktivierter Caspase-3 als Apoptosemarker bestimmt. Es ist anzumerken, dass RAF-1, AKT, pAKT, Survivin und p53 Klientenproteine von HSP90 sind. Die Tumorzellen wurden mit HSP90-Inhibitoren behandelt und mit 8 Gy bestrahlt. Dreißig Minuten und 24 h nach der Bestrahlung wurden Zellextrakte hergestellt und anschließend Western-Blot-Analysen durchgeführt.

Repräsentative Western-Blot-Analysen der mit HSP90-Inhibitoren behandelten Tumorzellen 30 min nach der Bestrahlung sind in der Abb. 3.1.7 dargestellt.

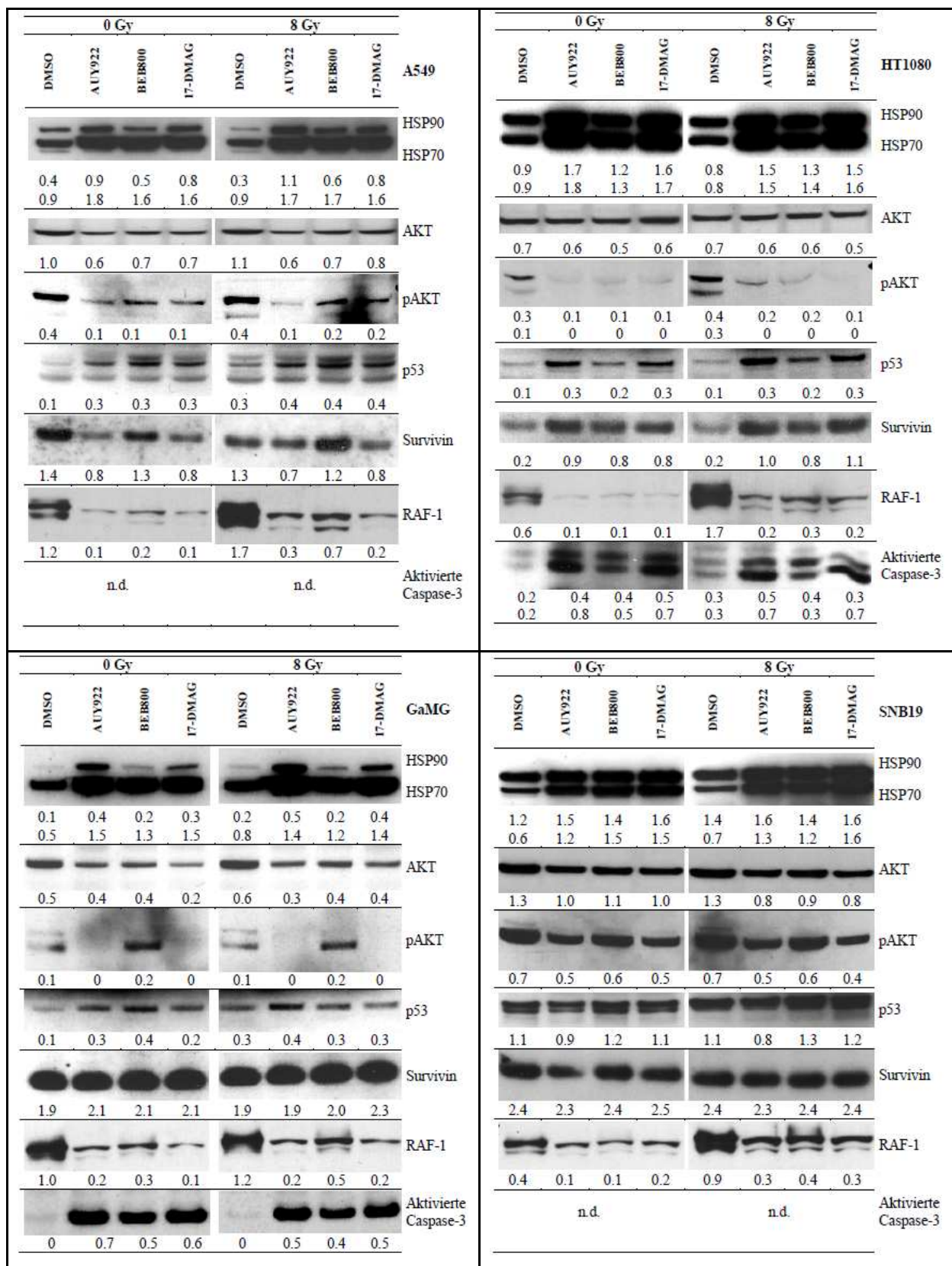


Abb. 3.1.7. Expression diverser Proteine in den Tumorzelllinien A549, HT1080, GaMG und SNB19 nach HSP90-Inhibition, 30 min nach Bestrahlung. Die Expression der Chaperone HSP90 und HSP70, der HSP90-Klientenproteine RAF-1, AKT, pAKT, Survivin und p53 sowie der aktivierten Caspase-3 als Apoptosemarker wurde mittels Western Blot analysiert. Das Verhältnis der integralen Dichte der Proteinbanden zu den β -Aktin Banden als Ladekontrolle ist durch die Zahlen angegeben. N.d., nicht detektierbar. (modifiziert nach Stingl et al. 2010 und reproduziert mit freundlicher Genehmigung vom Verlag Nature Publishing Group).

Wie in der Abb. 3.1.7 gezeigt, konnte eine gesteigerte Expression von HSP90 und HSP70 nach alleiniger Behandlung mit HSP90-Inhibitoren (0 Gy Spalte) in allen Tumorzelllinien beobachtet werden.

Die Expression der anti-apoptotischen HSP90-Klientenproteine AKT und dessen aktivierte Form, pAKT, wurde nach HSP90-Inhibition in allen getesteten Tumorzelllinien reduziert. Hierbei wurde infolge der HSP90-Inhibition eine starke Reduktion des pAKT-Proteins bis unter die Nachweisgrenze erreicht, bei einer Reduktion des AKT-Proteins auf 60 bis 80%, je nach Tumorzelllinie.

In den Tumorzelllinien A549 und HT1080 konnte nach HSP90-Inhibition eine gesteigerte Expression des p53-Proteins, eines anderen HSP90-Klientenproteins, gezeigt werden. Während GaMG-Tumorzellen eine erhöhte Expression von p53 nach HSP90-Inhibition aufwiesen, blieb die Expression des p53-Proteins in SNB19-Tumorzellen unverändert.

Die Expression von Survivin, ein weiteres HSP90-Klientenprotein, zeigte ein zelltypabhängiges Muster nach HSP90-Inhibition. Während in der A549-Tumorzelllinie eine Reduktion von Survivin nach Behandlung mit NVP-AUY922 oder 17-DMAG verzeichnet wurde, konnte eine gesteigerte Expression dieses Proteins nach Behandlung der HT1080-Tumorzelllinie mit HSP90-Inhibitoren beobachtet werden. Dagegen blieb die Expression von Survivin nach Behandlung der Tumorzelllinien GaMG und SNB19 mit HSP90-Inhibitoren unverändert im Vergleich zu den Kontrollen.

Die Expression des anti-apoptotischen HSP90-Klientenproteins RAF-1 war infolge der HSP90-Inhibition in allen getesteten Tumorzelllinien reduziert.

Nach Behandlung der HT1080- und GaMG-Tumorzellen mit HSP90-Inhibitoren konnte außerdem die aktivierte Caspase-3 als Apoptosemarker detektiert werden, während in den Tumorzelllinien A549 und SNB19 kein Signal festgestellt werden konnte.

Die Bestrahlung allein hatte keinen Einfluss auf die Expression der meisten untersuchten Proteine (8 Gy Spalte). Dagegen zeigte RAF-1 eine deutliche Überexpression infolge der Bestrahlung im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollproben in allen untersuchten Tumorzelllinien, außer GaMG.

Die Expression der untersuchten Proteine nach Kombination der HSP90-Inhibition mit Bestrahlung war ähnlich wie nach alleiniger Behandlung mit HSP90-Inhibitoren.

Repräsentative Western-Blot-Analysen 24 h nach der Bestrahlung sind in der Abb. 3.1.8 für alle getesteten Tumorzelllinien zusammengefasst.

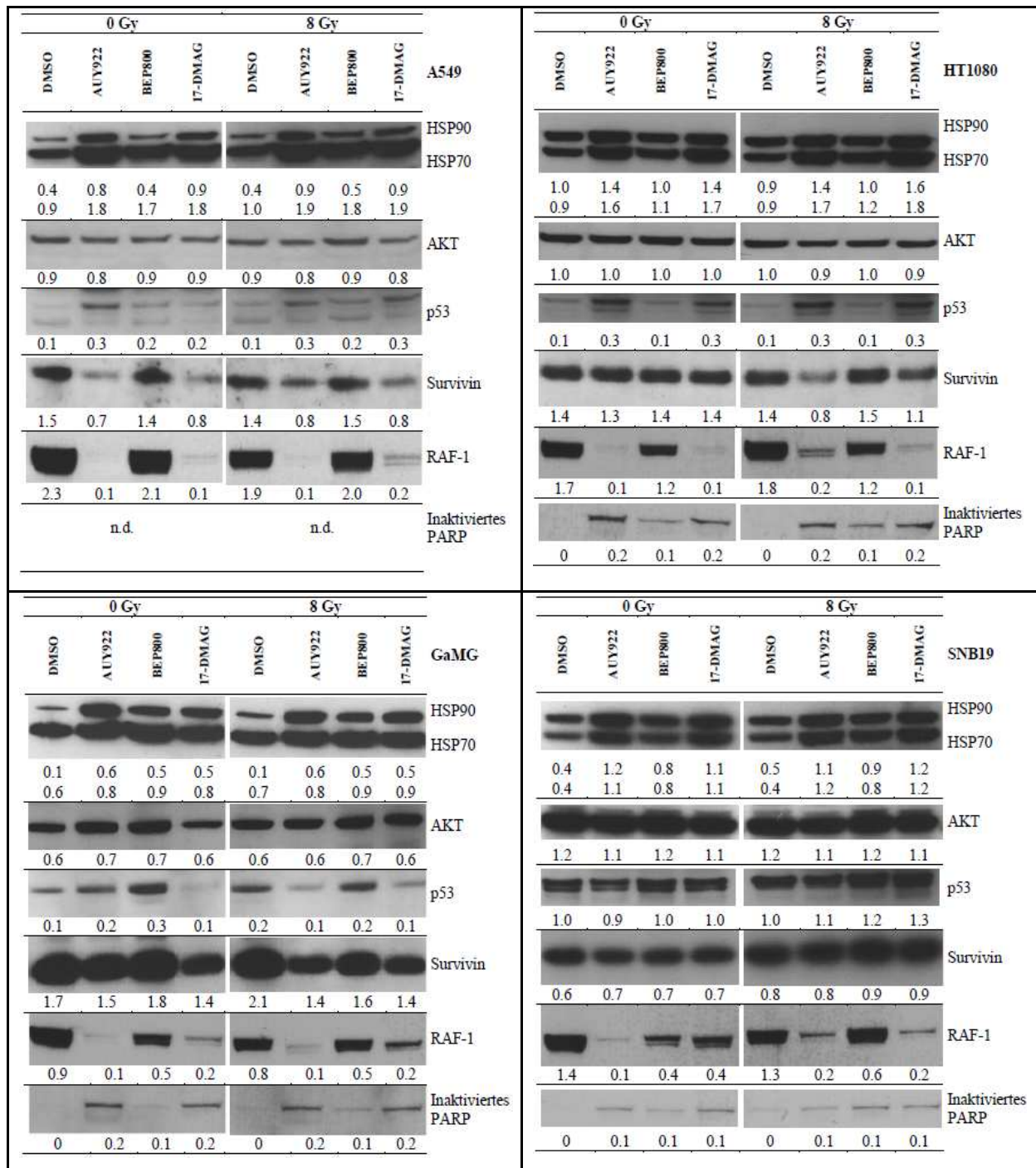


Abb. 3.1.8. Expression diverser Proteine in den Tumorzelllinien A549, HT1080, GaMG und SNB19 nach HSP90-Inhibition, 24 h nach der Bestrahlung. Eine repräsentative Western-Blot-Analyse der Chaperone HSP90 und HSP70, der HSP90-Klientenproteine RAF-1, AKT, pAKT, Survivin sowie des inaktivierten PARP-Proteins als Apoptosemarker ist gezeigt. Das Verhältnis der integralen Dichte der Proteinbanden zur den β -Aktin Banden als Ladekontrolle ist durch die Zahlen angegeben. N.d., nicht detektierbar.

Wie in der Abb. 3.1.8 ersichtlich, war die Expression von HSP90 und HSP70 nach Behandlung mit HSP90-Inhibitoren 24 h nach dem Auswaschen der Testsubstanzen immer noch hochreguliert, unabhängig von der Bestrahlung.

Dagegen konnte keine Depletion des AKT-Proteins 24 h nach dem Auswaschen der Testsubstanzen aus dem Kulturmedium detektiert werden, unabhängig von den verwendeten HSP90-Inhibitoren und Bestrahlung.

In der Tumorzelllinie A549 wurde eine gesteigerte Expression von p53 nach Behandlung mit HSP90-Inhibitoren detektiert, unabhängig von der Bestrahlung. In der Tumorzelllinie HT1080 stieg die Menge des p53-Proteins nach Behandlung mit NVP-AUY922 oder 17-DMAG. In der GaMG-Tumorzelllinie wurde eine erhöhte Expression von p53 nach Behandlung mit NVP-AUY922 und NVP-BEP800 detektiert; nach Kombination der Bestrahlung mit NVP-AUY922 oder 17-DMAG wurde eine Reduktion dieses Proteins erreicht.

Die Menge an Survivin war in den mit NVP-AUY922- oder 17-DMAG behandelten Tumorzelllinien A549 und GaMG reduziert. Dagegen blieb die Expression von Survivin nach alleiniger Behandlung mit HSP90-Inhibitoren in den SNB19- und HT1080-Tumorzelllinien unverändert. In den meisten Tumorzelllinien blieb die Expression von Survivin nach Kombination der HSP90-Inhibition mit Bestrahlung ähnlich wie ohne Bestrahlung. Außerdem wurde eine Reduktion der Survivin-Proteinmenge in den mit NVP-AUY922 oder 17-DMAG behandelten und bestrahlten HT1080-Tumorzellen detektiert.

Die Menge an RAF-1-Protein in den mit NVP-AUY-922 oder 17-DMAG behandelten Tumorzellen war im Vergleich zur Kontrolle reduziert. In den A549-Tumorzellen, die mit NVP-BEP800 behandelt wurden, war die Menge an RAF-1-Protein 24 h nach dem Auswaschen der Testsubstanzen ähnlich wie in den Kontrollzellen. In den mit NVP-BEP800 behandelten Tumorzelllinien HT1080, GaMG und SNB19 war die Expression von RAF-1 geringer als in den Kontrollen, aber höher als in den mit NVP-AUY922 oder 17-DMAG behandelten Proben, unabhängig von der Bestrahlung.

Inaktiviertes PARP als Apoptosemarker wurde nach Behandlung mit HSP90-Inhibitoren in den meisten Tumorzelllinien, außer in der A549-Tumorzelllinie, nachgewiesen.

Zusammengefasst zeigten die Western-Blot-Analysen der Proteine, die Apoptose regulieren, dass die neuartigen HSP90-Inhibitoren sowohl pro-apoptotische (Depletion von AKT und RAF-1, Caspase-3-Aktivierung, PARP-Inaktivierung) als auch anti-apoptotische Effekte (Hochregulation von HSP90 und HSP70) in den bestrahlten Tumorzellen induzieren. Daher kann die Apoptoseinduktion nur teilweise die Radiosensibilisierung nach HSP90-Inhibition erklären.

3.1.5. Messung der DNA-Fragmentierung nach HSP90-Inhibition und Bestrahlung

Um einen weiteren möglichen Grund für die Radiosensibilisierung nach HSP90-Inhibition zu untersuchen, wurde das Ausmaß an DNA-Fragmentierung nach Behandlung mit verschiedenen HSP90-Inhibitoren und Bestrahlung mit 8 Gy in den getesteten Tumorzelllinien mittels Comet Assay ermittelt. Die DNA-Fragmentierung wurde über den TM-Wert, definiert als Produkt aus DNA im Kometenschweif (in %) und Schweiflänge quantifiziert. Die TM-Werte wurden unmittelbar nach der Bestrahlung, sowie 10 min, 20 min und 30 min danach gemessen. Die DNA-Schäden unmittelbar nach der Bestrahlung sowie der Verlauf deren Reparatur innerhalb von 30 min sind in der Abb. 3.1.9 für die getesteten Tumorzelllinien dargestellt.

Wie in der Abb. 3.1.9 ersichtlich, waren die initialen TM-Werte der mit HSP90-Inhibitoren-behandelten und bestrahlten Proben niedriger als diejenigen der bestrahlten, unbehandelten Proben (zu 100% gesetzt): zwischen 35% und 65% in den Tumorzelllinien A549 und HT1080, sowie zwischen 75% und 90% in den Tumorzelllinien GaMG und SNB19.

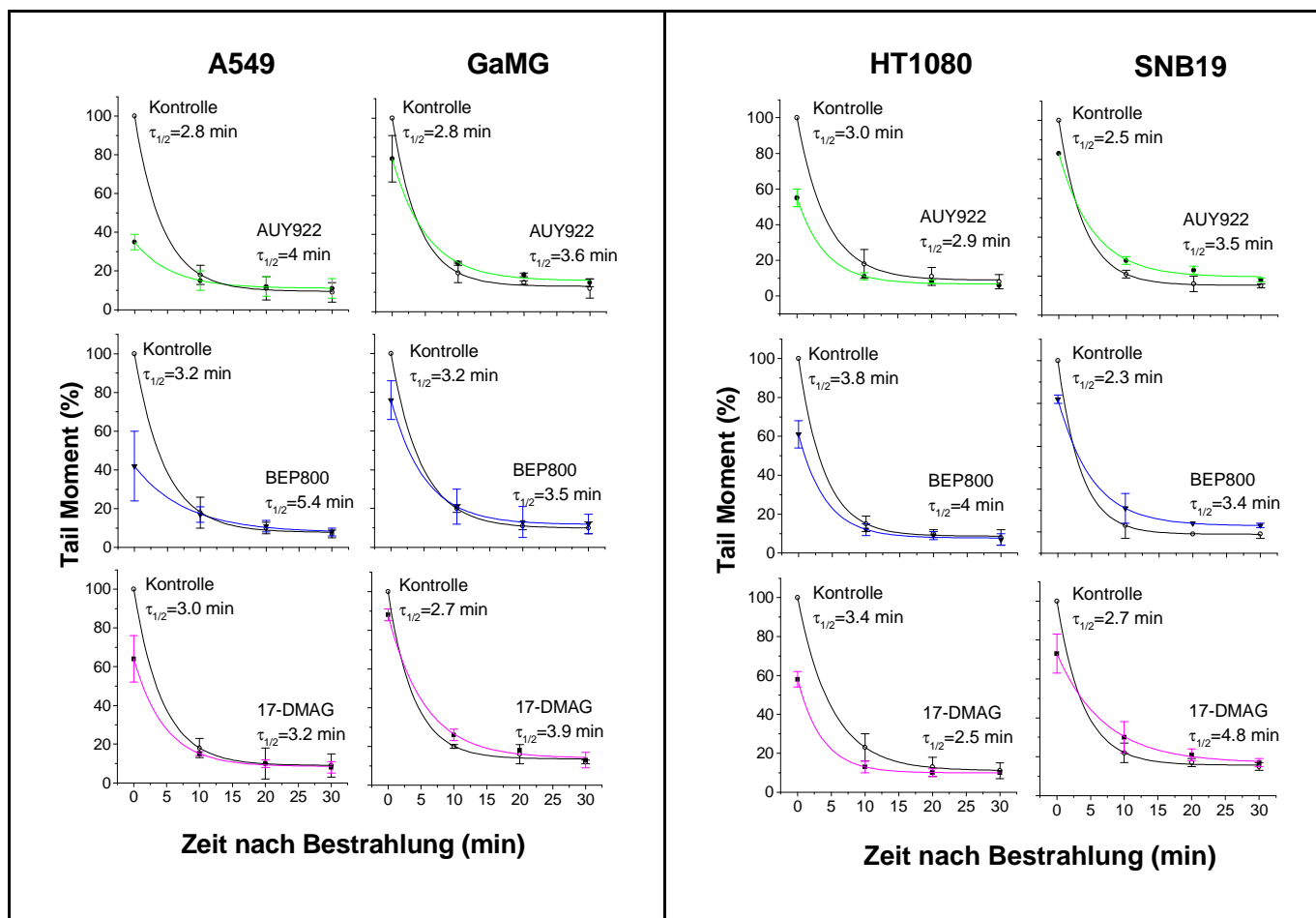


Abb. 3.1.9. DNA-Fragmentierung in humanen Tumorzelllinien nach HSP90-Inhibition und Bestrahlung. Die Tumorzellen wurden mit NVP-AUY922 (grün), NVP-BEP800 (blau), 17-DMAG (magenta) oder DMSO (schwarz) behandelt und mit 8 Gy bestrahlt. Die Abbildung zeigt den Abbau der initialen DNA-Schäden (0 min nach Bestrahlung) in Abhängigkeit von der Zeit. Jeder Punkt stellt den TM-Mittelwert aus 150 Kernen pro Bedingung aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit ihren dazugehörigen Standardabweichungen dar, normiert auf die DMSO behandelten, bestrahlten Proben (zu 100% gesetzt). Die Kurven zeigen eine Trendlinie der experimentellen Daten, ermittelt mit der exponentiellen Funktion. Die Zahlen geben die Halbwertszeit ($\tau_{1/2}$) der DNA-Reparatur nach jeder Behandlung an (modifiziert nach Stingl et al. 2010 und reproduziert mit freundlicher Genehmigung vom Verlag Nature Publishing Group).

Die TM-Mittelwerte aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit ihren Standardabweichungen, sowie die ermittelten Halbwertszeiten der DNA-Reparatur ($\tau_{1/2}$) und das Verhältnis der Halbwertszeit der DNA-Reparatur nach HSP90-Inhibition und Bestrahlung zu den entsprechenden DMSO behandelten, bestrahlten Proben sind in Tabelle 3.1.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.1.2. DNA-Fragmentierung mittels Comet Assay in vier Tumorzelllinien nach HSP90-Inhibition und Bestrahlung.

Zelllinie	Behandlung	TM.	TM. 8 Gy (a. u.)		$\tau_{1/2}$ (min)	$\tau_{1/2}^{+Inhibitor}/$ $\tau_{1/2}^{DMSO}$
		0 Gy (a. u.)	0 min	30 min		
A549	DMSO	0.8±0.1	8.5±2.7	0.9±0.6	2.8	1.4
	+AUY	0.9±0.2	3.8±0.2	1.0±0.7	4	
	DMSO	0.8±0.4	12.8±8.8	1.0±0.8	3.2	1.6
	+BEP	0.8±0.1	4.8±1.1	0.9±0.4	5.4	
	DMSO	0.7±0.3	9.1±0.8	1.4±1.4	3	1
+17-DMAG	0.9±0.2	6.7±0.6	1.4±1.2	3.2		
GaMG	DMSO	0.9±0.1	7.5±0.7	0.9±0.3	2.8	1.3
	+AUY	1.0±0.01	6.0±1.5	1.2±0.1	3.6	
	DMSO	1.1±0.2	12.6±3.0	1.3±0.1	3.2	1
	+BEP	1.1±0.1	9.3±0.2	1.4±0.3	3.5	
	DMSO	1.1±0.1	8.8±2.4	1.1±0.4	2.7	1.4
+17-DMAG	1.0±0.1	7.8±2.3	1.2±0.6	3.9		
HT1080	DMSO	1.5±1.0	20.9±4.2	1.6±1.1	3	1
	+AUY	0.8±0.1	11.5±3.2	1.3±0.1	2.9	
	DMSO	1.4±0.8	17.1±1.1	1.3±0.5	3.8	1.1
	+BEP	1.2±0.4	10.5±1.8	1.2±0.4	4	
	DMSO	2.1±1.1	15.7±4.7	1.8±1.1	3.4	0.7
+17-DMAG	1.2±0.3	9.1±2.1	1.5±0.5	2.5		
SNB19	DMSO	1.0±0.01	7.1±0.1	1.1±0.1	2.5	1.3
	+AUY	1.0±0.1	5.9±0.1	1.3±0.1	3.5	
	DMSO	1.2±0.4	7.7±3.3	1.4±0.4	2.3	1.4
	+BEP	0.9±0.01	6.3±2.5	1.8±0.8	3.4	
	DMSO	1.2±0.1	9.4±0.8	1.4±0.1	2.7	1.8
+17-DMAG	0.8±0.1	6.9±1.6	1.6±0.1	4.8		

Die Tabelle enthält die TM-Mittelwerte (arbitrary units, a. u.) aus jeweils 150 Kernen pro Bedingung aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit ihren dazugehörigen Standardabweichungen, sowie die Halbwertszeiten der DNA-Reparatur ($\tau_{1/2}$) und das Verhältnis der Halbwertszeit der DNA-Reparatur nach HSP90-Inhibition und Bestrahlung zu den entsprechenden DMSO behandelten, bestrahlten Proben.

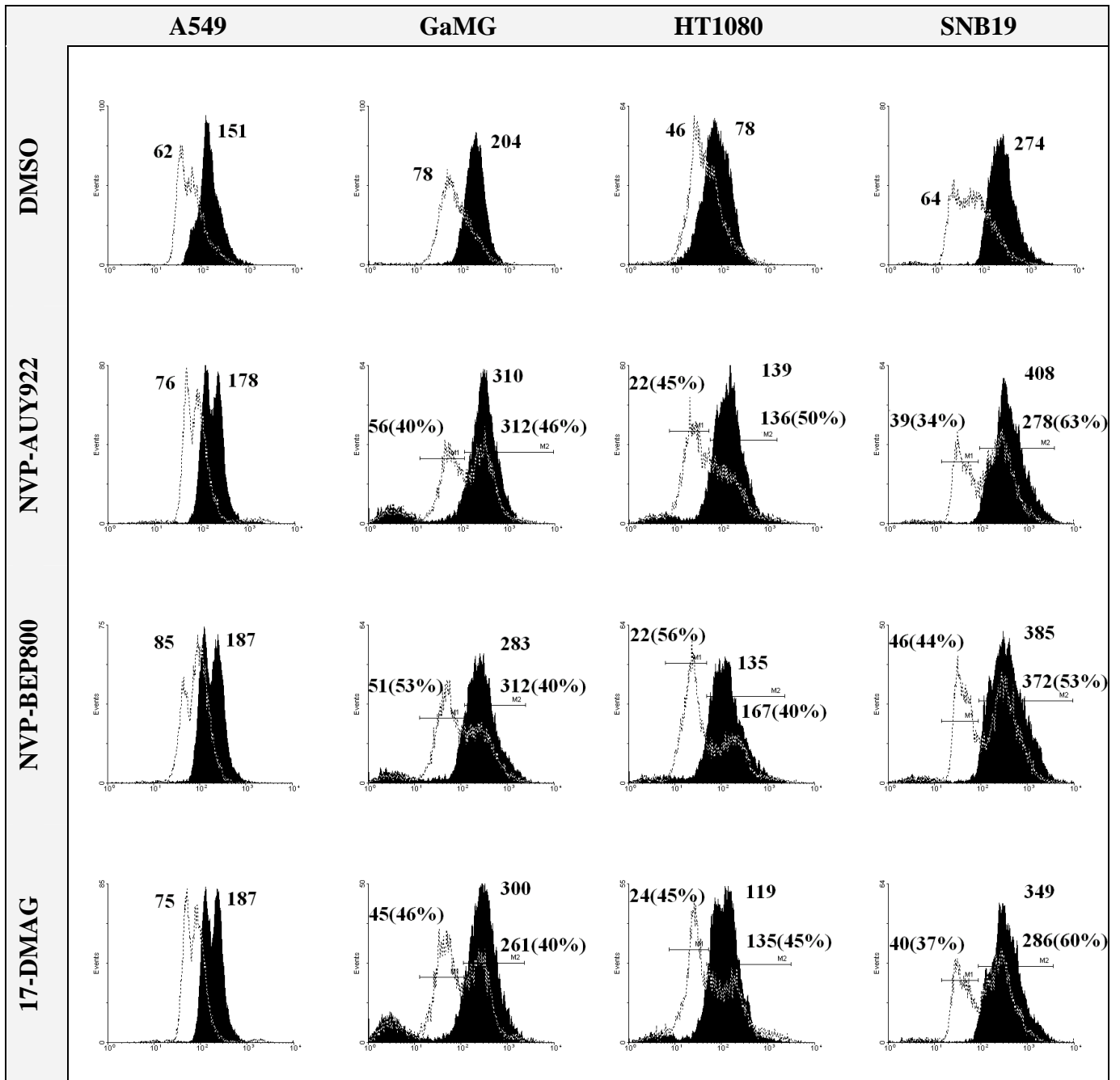
Wie in Tabelle 3.1.2 gezeigt, war die Halbwertszeit, die zum Abbau der DNA-Fragmentierung in den meisten mit HSP90-Inhibitoren behandelten und zusätzlich bestrahlten Tumorzellen (außer HT1080) benötigt wurde, größer als nach alleiniger Bestrahlung (um einen Faktor zwischen 1.3 und 1.6). Diese Ergebnisse legen eine langsamere Abbaukinetik der strahleninduzierten DNA-Fragmentierung nach HSP90-Inhibition nahe, trotz geringerer DNA-Fragmentierung als in den Kontrollproben.

3.1.6. Messung der DNA-Schäden nach HSP90-Inhibition und Bestrahlung

Um die beobachtete Radiosensibilisierung zu erklären (Abb. 3.1.2), wurde weiterhin die Auswirkung der HSP90-Inhibition in Kombination mit Bestrahlung auf die Induktion und Reparatur der DNA-Schäden ermittelt. Dies erfolgte über die Messung der Expression des phosphorylierten Histons H2AX (γ H2AX) als spezifischen Nachweis der DNA-Doppelstrangbrüche (Rogakou et al 1998). Dazu wurden die Tumorzellen mit HSP90-Inhibitoren behandelt, mit 8 Gy bestrahlt und anschließend 30 min, 24 h und 48 h nach der Bestrahlung im FACS analysiert. Der γ H2AX-Gehalt wurde durchflusszytometrisch über FITC-markierten Antikörpern gegen γ H2AX bestimmt.

Repräsentative FACS-Analysen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in der Abb. 3.1.10 gezeigt. Der Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der unbestrahlten Kontrollproben (DMSO, ungefüllte Histogramme, erste Reihe) verdeutlicht, dass die endogene Expression von γ H2AX je nach Tumorzelllinie variieren kann. Dabei zeigte die Tumorzelllinie HT1080 die niedrigste (46 a. u.) und die Tumorzelllinie GaMG die höchste Fluoreszenzintensität (78 a. u.), während die Tumorzelllinien A549 und SNB19 ähnliche Hintergrundfluoreszenz um 60 a. u. aufwiesen.

Die alleinige Behandlung mit HSP90-Inhibitoren (Abb. 3.1.10, ungefüllte Histogramme, 2., 3. und 4. Reihe) führte zu signifikanten Veränderungen der Expression von γ H2AX im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (erste Reihe). Dabei zeigten die Histogramme der meisten Tumorzelllinien nach Behandlung mit HSP90-Inhibitoren eine bimodale Verteilung, bestehend aus Subpopulationen mit unterschiedlichen Expressionen von γ H2AX: eine Subpopulation mit niedrigerem γ H2AX-Gehalt und eine Subpopulation mit höheren γ H2AX-Gehalt.



γ H2AX, a. u.

Abb. 3.1.10. Expression von γ H2AX nach Behandlung humaner Tumorzelllinien mit HSP90-Inhibitoren 30 min nach der Bestrahlung. Die Tumorzellen wurden mit HSP90-Inhibitoren behandelt, mit 8 Gy bestrahlt, dann fixiert, mit anti- γ H2AX FITC-gekoppelten Antikörpern gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch im logarithmischen Modus analysiert. Die Abbildung stellt repräsentative FACS-Analysen der unbestrahlten (ungefüllte Histogramme) und bestrahlten (gefüllte Histogramme) Tumorzellen dar. Die mittlere Intensität der grünen Fluoreszenz, die dem Gehalt an γ H2AX in den Tumorzellen entspricht, ist durch Zahlen angegeben (modifiziert nach Stingl et al. 2010 und reproduziert mit freundlicher Genehmigung vom Verlag Nature Publishing Group).

Dreißig Minuten nach der Bestrahlung (Abb. 3.1.10, gefüllte Histogramme) konnte eine gesteigerte Expression von γ H2AX um einen Faktor von 2 bis 4, je nach Tumorzelllinie, im Vergleich zu den unbestrahlten Proben gemessen werden.

Nach Kombination der Bestrahlung mit HSP90-Inhibitoren wurde eine erhöhte Expression von γ H2AX im Vergleich zu alleiniger Bestrahlung detektiert. Dabei stieg die Expression von γ H2AX in der A549-Tumorzelllinie nach Kombination der Bestrahlung mit HSP90-Inhibitoren um etwa 20% im Vergleich zu alleiniger Bestrahlung. In den bestrahlten GaMG-Tumorzellen stieg die Expression von γ H2AX um etwa 50% nach Behandlung mit NVP-AUY922 oder 17-DMAG, sowie um etwa 40% nach Behandlung mit NVP-BEP800 im Vergleich zu alleiniger Bestrahlung. In den bestrahlten HT1080-Tumorzellen stieg die Expression von γ H2AX um etwa 80% nach Behandlung mit NVP-AUY922, um etwa 70% nach Behandlung mit NVP-BEP800 und um 50% nach Behandlung mit 17-DMAG im Vergleich zu alleiniger Bestrahlung. Außerdem zeigten die Histogramme der meisten mit HSP90-Inhibitoren behandelten und zusätzlich bestrahlten Tumorzelllinien (außer der A549-Tumorzelllinie) eine unimodale Verteilung der Fluoreszenzintensität, im Vergleich zu der bimodalen Verteilung, die nach alleiniger HSP90-Inhibition beobachtet wurde. Die mit HSP90-Inhibitoren behandelten und zusätzlich bestrahlten A549-Tumorzellen zeigten weiterhin eine bimodale Verteilung der γ H2AX-Expression.

Um den Einfluss der HSP90-Inhibition und Bestrahlung auf die Reparatur der induzierten DNA-Schäden zu bestimmen, wurde die Expression des Histons γ H2AX nach 24 h und 48 h Reparaturzeit gemessen. Repräsentative FACS-Analysen sind in der Abb. 3.1.11 dargestellt.

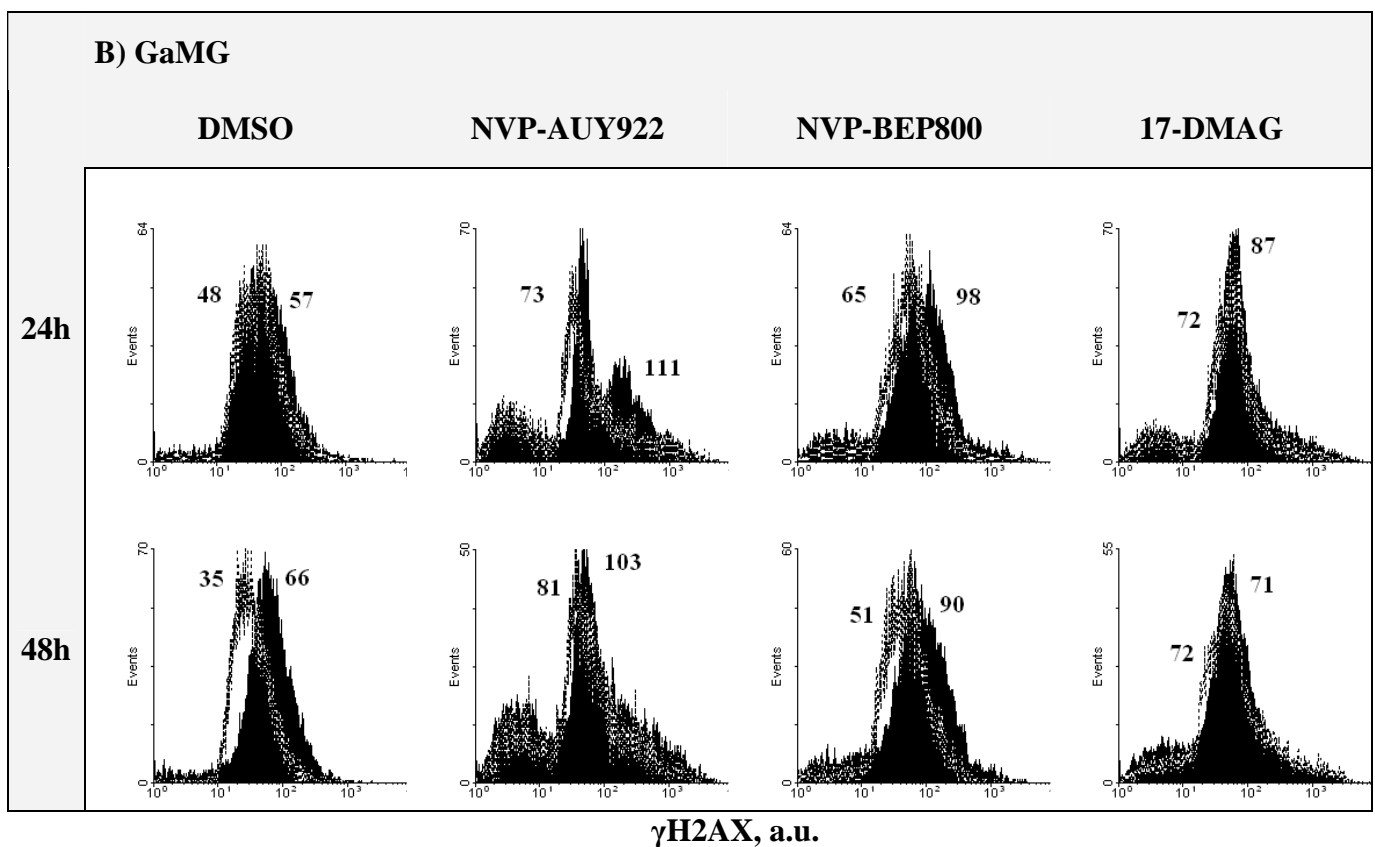
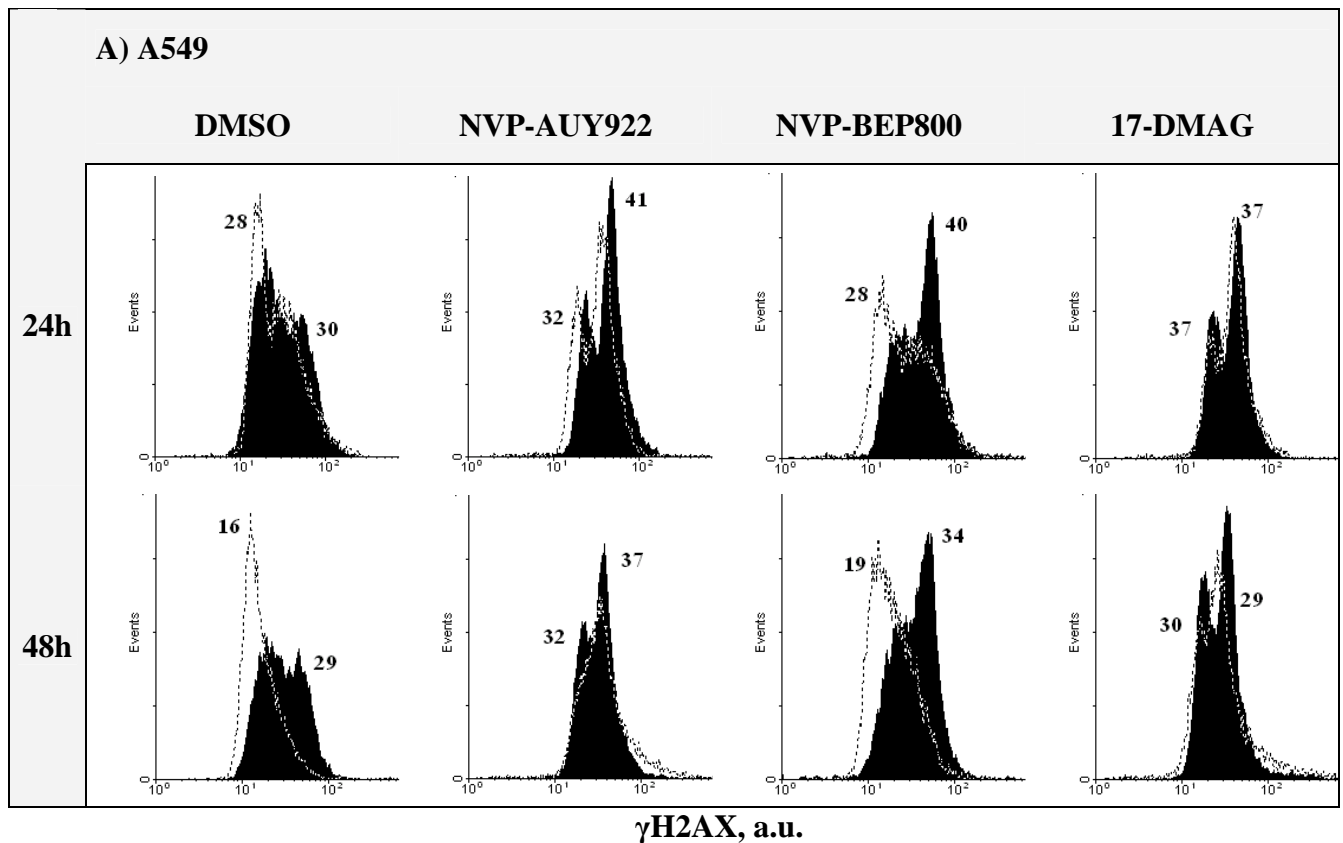


Abb. 3.1.11A und B. Expression von γ H2AX in den Tumorzelllinien A549 und GaMG nach Behandlung mit HSP90-Inhibitoren, 24 h und 48 h nach der Bestrahlung. Die Abbildung stellt repräsentative FACS-Analysen der unbestrahlten (ungefüllte Histogramme) und bestrahlten (gefüllte Histogramme) Tumorzellen dar. Die mittlere Intensität der grünen Fluoreszenz von γ H2AX ist durch die Zahlen angegeben (modifiziert nach Stingl et al. 2010 und reproduziert mit freundlicher Genehmigung vom Verlag Nature Publishing Group).

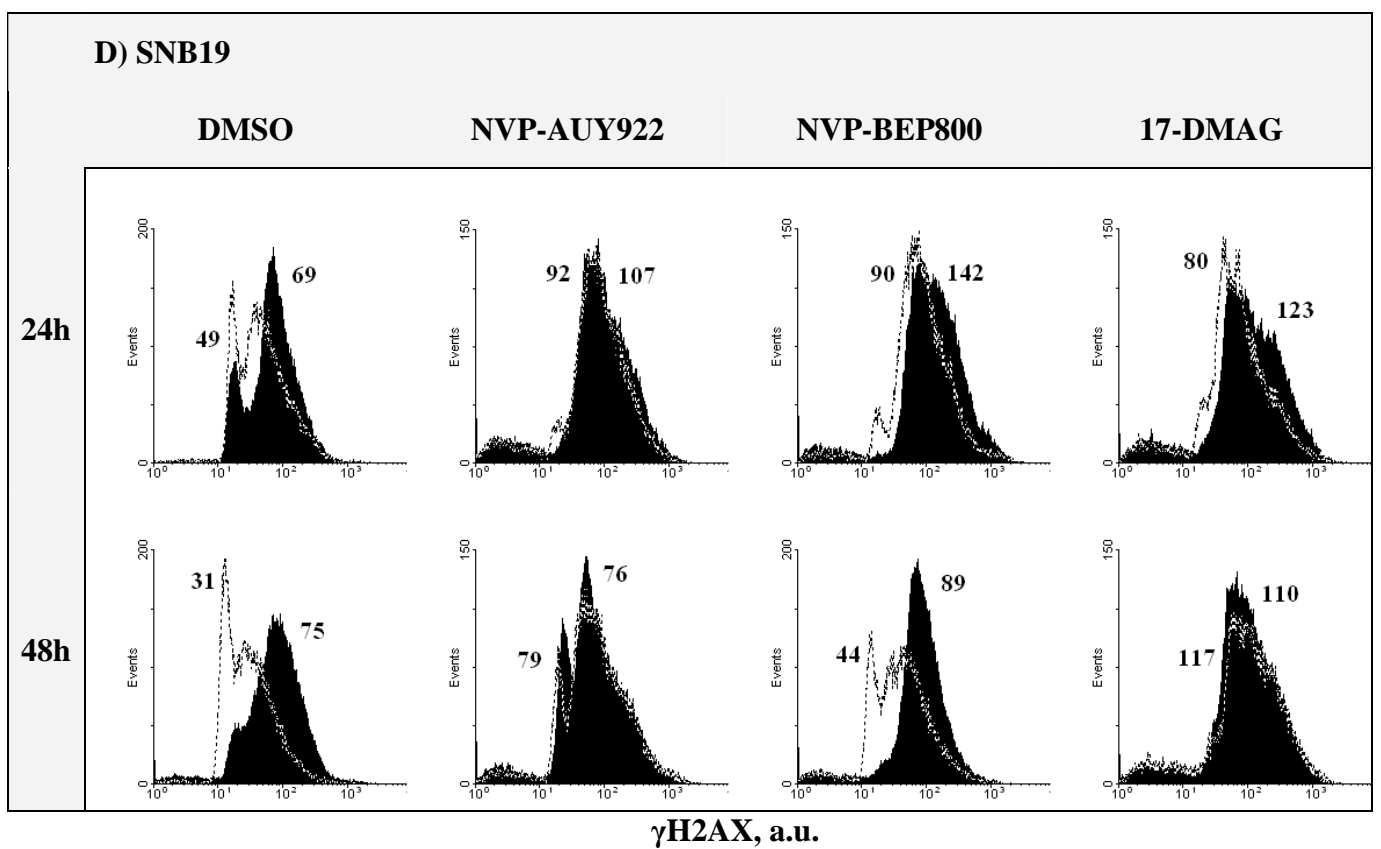
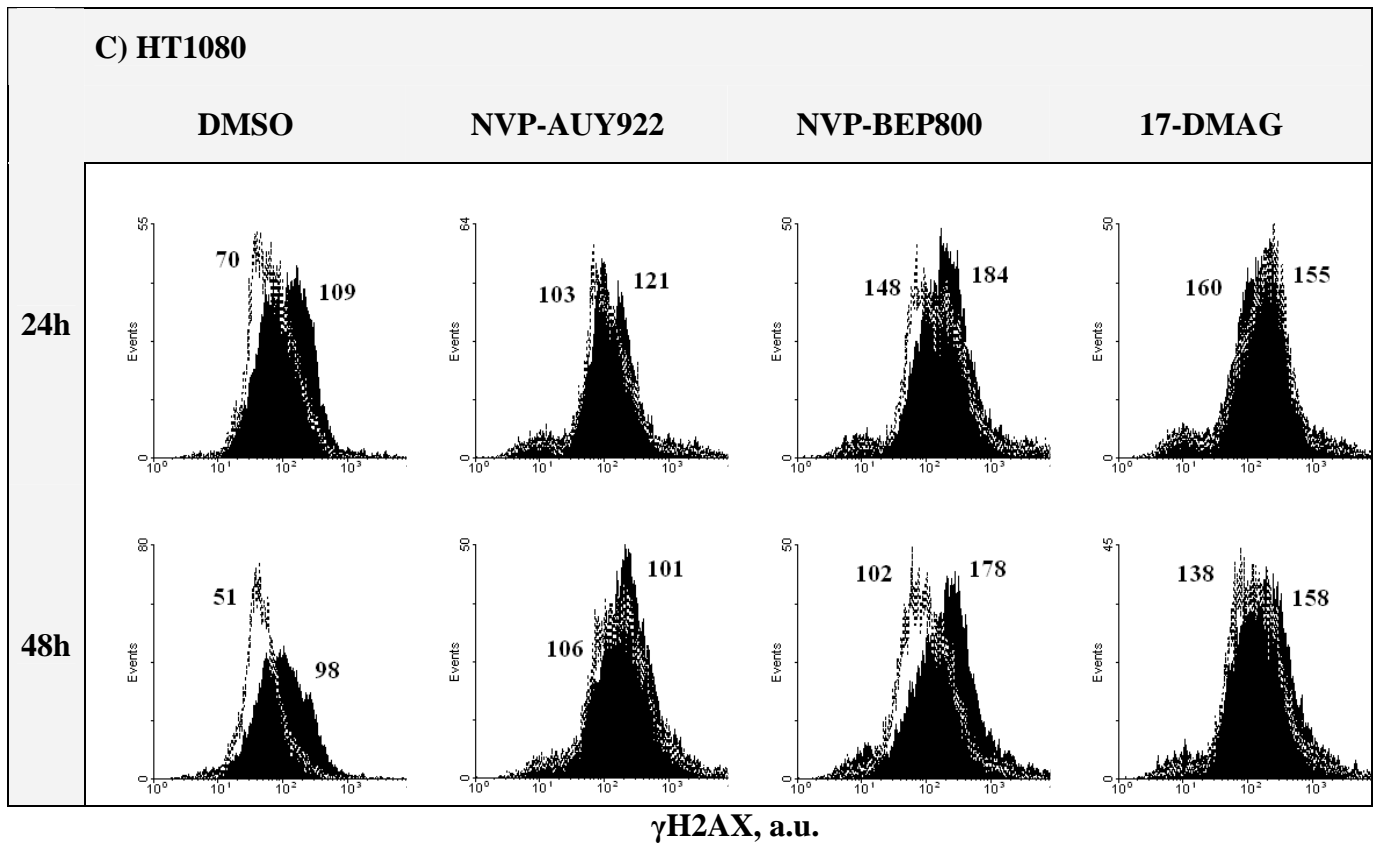


Abb. 3.1.11C und D. Expression von γ H2AX in den Tumorzelllinien HT1080 und SNB19 nach Behandlung mit HSP90-Inhibitoren, 24 h und 48 h nach der Bestrahlung. Für Legende siehe Abb. 3.1.11A.

Wie in der Abb. 3.1.11A bis D (ungefüllte Histogramme) ersichtlich, zeigten die mit NVP-AUY922 oder 17-DMAG behandelten Tumorzelllinien bis zu 48 h nach der HSP90-Inhibition einen höheren γ H2AX-Gehalt im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, was auf unreparierte DNA-Schäden hinweist. Hierbei kam es zu einer gesteigerten γ H2AX-Expression um den Faktor 2 in den Tumorzelllinien A549 und GaMG im Vergleich zur Hintergrundexpression des Histons γ H2AX der unbehandelten Kontrollen (48 h-Werte). In der Tumorzelllinie HT1080 kam es zu einer gesteigerten γ H2AX-Expression um den Faktor 2 nach Behandlung mit NVP-AUY922 und um den Faktor 3 nach Behandlung mit 17-DMAG (48 h -Werte). In der Tumorzelllinie SNB19 kam es zu einer gesteigerten γ H2AX-Expression um den Faktor 2.5 nach Behandlung mit NVP-AUY922 und um den Faktor 4 nach Behandlung mit 17-DMAG (48 h-Werte). Nach Behandlung mit NVP-BEP800 wurde eine geringere γ H2AX-Expression bis zu 48 h danach beobachtet und damit weniger unreparierte DNA-Schäden im Vergleich zur NVP-AUY922 oder 17-DMAG-Behandlung in den meisten Tumorzelllinien (außer HT1080). Dabei zeigten die mit NVP-BEP800 behandelten A549-Tumorzellen 48 h danach gleiche γ H2AX-Expression wie die unbehandelten Kontrollen. Die mit NVP-BEP800 behandelten GaMG- und SNB19-Tumorzellen hatten eine um den Faktor 1.4 erhöhte γ H2AX-Expression im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. In der Tumorzelllinie HT1080 war die γ H2AX-Expression nach der Behandlung mit NVP-BEP800 um den Faktor 2 erhöht, ähnlich wie nach einer Behandlung mit NVP-AUY922.

Nach Kombination der HSP90-Inhibition mit Bestrahlung (Abb. 3.1.11, gefüllte Histogramme) wurde bis zu 48 h nach der Bestrahlung in den meisten Tumorzelllinien ein höherer γ H2AX-Gehalt im Vergleich zu den bestrahlten Proben gemessen, was auf einen Einfluss der HSP90-Inhibitoren mit der Reparatur der strahleninduzierten DNA-Schäden hinweist. Dies zeigt sich durch eine gesteigerte γ H2AX-Expression nach Behandlung der A549-Tumorzelllinie mit NVP-AUY922 (um circa 30%), nach Behandlung der GaMG-Tumorzellen mit NVP-AUY922 (um circa 60%) oder NVP-BEP800 (um circa 40%), nach Behandlung der HT1080-Tumorzellen mit NVP-BEP800 (um circa 80%) oder 17-DMAG (um circa 60%) sowie nach Behandlung der SNB19-Tumorzellen mit NVP-BEP800 (um circa 20%) oder 17-DMAG (um circa 50%) im Vergleich zur γ H2AX-Expression nach alleiniger Bestrahlung (Werte nach 48 h post-IR).

3.1.7. Einfluss von HSP90-Inhibition und Bestrahlung auf die Expression von DNA-Reparaturproteinen

Da ein erhöhter γ H2AX-Gehalt bis zu 48 h nach HSP90-Inhibition alleine oder in Kombination mit Bestrahlung auf eine verzögerte DNA-Reparatur hinweist, wurde die Expression der DNA-Reparaturproteine KU70, KU80, RAD50 und DNA-PK (NHEJ) sowie von RAD51 und BRCA2 (HR) in allen getesteten Tumorzelllinien mittels Western Blot analysiert. Dafür wurden die Tumorzellen mit HSP90-Inhibitoren behandelt und mit 8 Gy bestrahlt. Die Expression der erwähnten Proteine 30 min nach der Bestrahlung sind in den Abb. 3.1.12A und B dargestellt.

Wie in der Abb. 3.1.12A und B gezeigt, war eine deutliche Reduktion der Menge an KU70 in den mit HSP90-Inhibitoren behandelten Tumorzellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen erkennbar. Die Expression von KU80 wurde in den Tumorzelllinien A549 und SNB19 unabhängig vom verwendeten HSP90-Inhibitor reduziert. In der HT1080-Tumorzelllinie war die Menge des KU80-Proteins nur nach Behandlung mit NVP-AUY922 vermindert, während die Expression dieses Proteins in der GaMG-Tumorzelllinie unbeeinflusst blieb unabhängig vom verwendeten HSP90-Inhibitor.

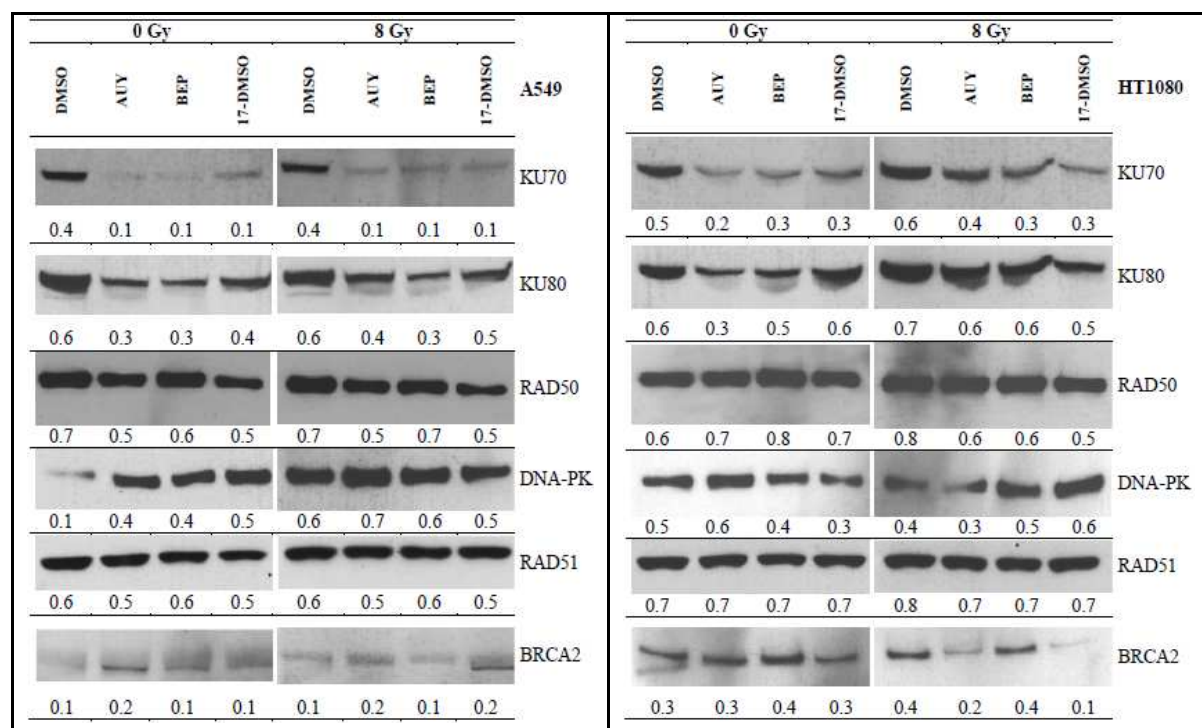


Abb. 3.1.12A. Expression von DNA-Reparaturproteinen in den Tumorzelllinien A549 und HT1080 nach HSP90-Inhibition, 30 min nach der Bestrahlung. Die Abbildung zeigt repräsentative Ergebnisse für die Expression der DNA-Reparaturproteine KU70, KU80, RAD50, DNA-PK, RAD51 und BRCA2. Das Verhältnis der integralen Dichte der Proteinbanden zu den β -Aktin Banden als Ladekontrolle ist durch die Zahlen angegeben.

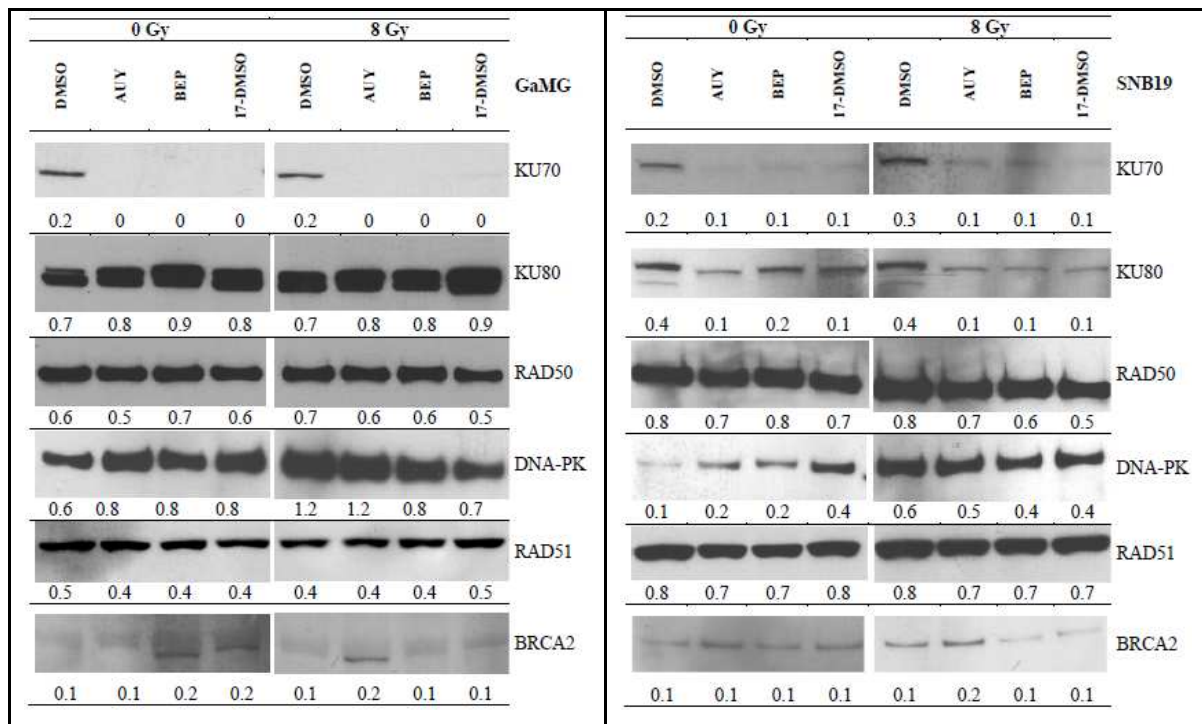
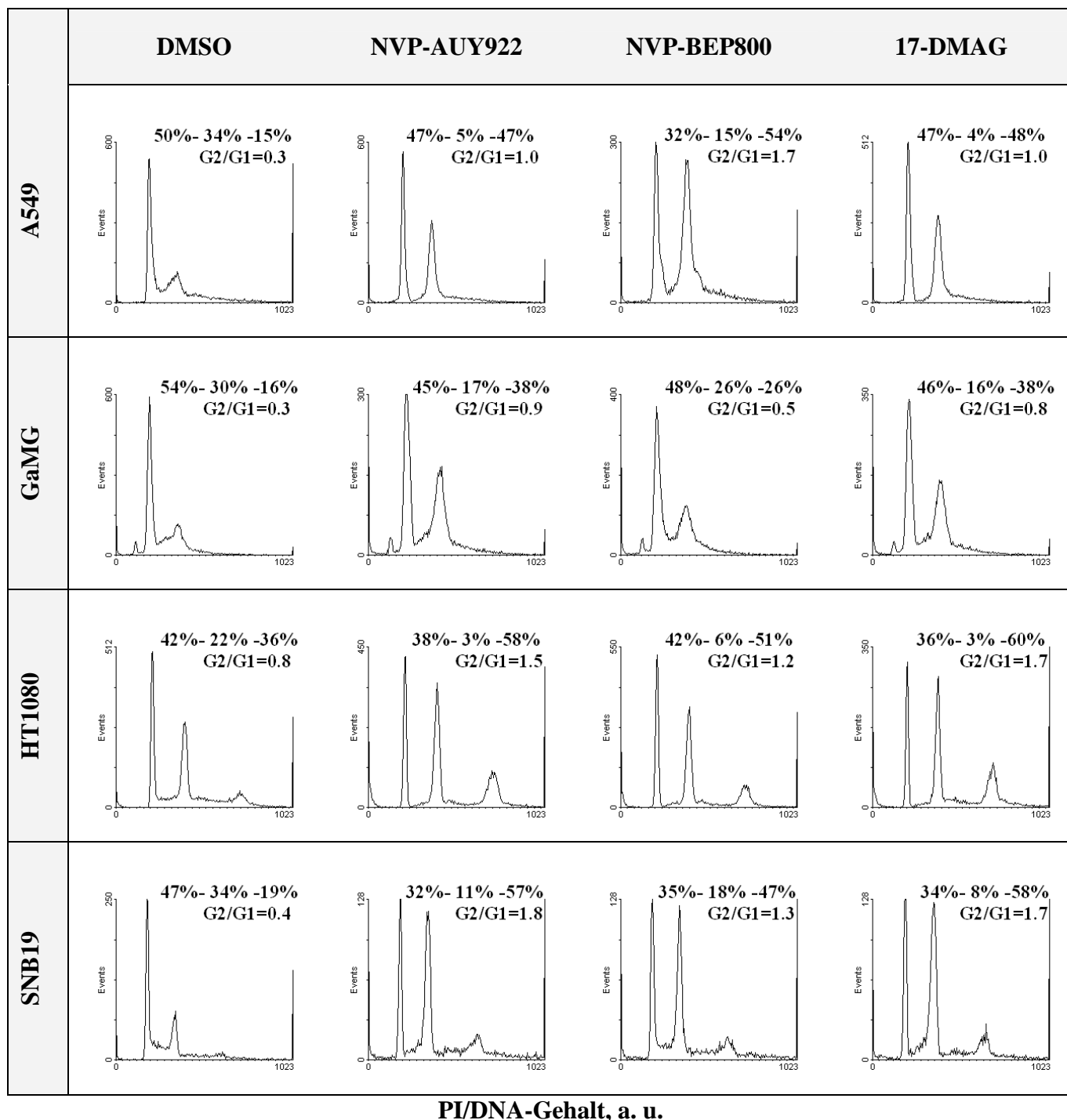


Abb. 3.1.12B. Expression von DNA-Reparaturproteinen in den Tumorzelllinien GaMG und SNB19 nach HSP90-Inhibition, 30 min nach der Bestrahlung. Für Legende siehe Abb. 3.3.12A.

Die Expression von RAD50 blieb in allen Tumorzelllinien unverändert. Weiterhin konnte eine gesteigerte Expression von DNA-PK in den Tumorzelllinien A549-, GaMG- und SNB19 nach Behandlung mit HSP90-Inhibitoren beobachtet werden. In Kombination mit der Bestrahlung zeigten die meisten Tumorzellen (außer GaMG) ähnliche Expression von DNA-PK im Vergleich zu den bestrahlten Proben. Dagegen blieb die Expression der DNA-Reparaturproteine RAD51 und BRCA-2 nach Behandlung mit HSP90-Inhibitoren unverändert, unabhängig von der Bestrahlung.

3.1.8. Einfluss von HSP90-Inhibition und Bestrahlung auf den Zellzyklus

Ein weiterer Faktor für die im Kolonietest beobachtete Radiosensibilisierung nach HSP90-Inhibition können Zellzyklusstörungen sein. Für die Zellzyklus-Analysen wurden die Tumorzelllinien mit HSP90-Inhibitoren behandelt, danach fixiert und mit PI gefärbt, anschließend der DNA-Gehalt durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 3.1.13).



PI/DNA-Gehalt, a. u.

Abb. 3.1.13. Zellzyklusverteilung humaner Tumorzelllinien nach alleiniger Behandlung mit HSP90-Inhibitoren. Die Tumorzellen wurden mit HSP90-Inhibitoren behandelt, danach fixiert, permeabilisiert und mit PI gefärbt. Die Analyse des DNA-Gehalts wurde anschließend durchflusszytometrisch im linearen Modus durchgeführt. Die Abbildung zeigt repräsentative DNA-Histogramme, wobei die Zahlen den prozentualen Anteil der Tumorzellen in den G1-, S- und G2-Phasen, woraus der G2/G1-Faktor berechnet wurde, angeben.

Dabei zeigten die mit Lösungsmittel behandelten Kontrollen (DMSO in Abb. 3.1.13) einen hohen Anteil an Tumorzellen, die sich in der S- und G2-Phase befanden, woran sich erkennen lässt, dass sich diese zu Beginn der Versuche in der exponentiellen Teilungsphase befanden.

Nach Behandlung mit HSP90-Inhibitoren konnte ein Anstieg des G2/M-Anteils (G2/M-Arrest) in allen Tumorzelllinien detektiert werden. In der A549-Tumorzelllinie stieg der G2/M-Anteil auf circa 50% im Vergleich zu 15% in den Kontrollzellen. In der GaMG-Tumorzelllinie war der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase etwa 40% nach Behandlung mit NVP-AUY922 oder 17-DMAG und 26% nach Behandlung mit NVP-BEP800 gegenüber 16% in den Kontrollzellen. In der HT1080-Tumorzelllinie betrug der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase etwa 60% nach Behandlung mit NVP-AUY922 oder 17-DMAG und 50% nach Behandlung mit NVP-BEP800 gegenüber 36% in den Kontrollzellen. Die SNB19-Tumorzelllinie hatten einen Anteil der Zellen, die sich in der G2/M-Phase befanden, von etwa 60% nach Behandlung mit NVP-AUY922 oder 17-DMAG und von etwa 50% nach Behandlung mit NVP-BEP800 gegenüber 19% in den Kontrollzellen.

Die mit NVP-AUY922 oder 17-DMAG behandelten Tumorzellen zeigten zusätzlich eine starke Reduktion der Zellen in der S-Phase: auf circa 5% gegenüber 34% in unbehandelten A549-Kontrollzellen, auf circa 17% in der GaMG-Tumorzelllinie gegenüber 30% in den Kontrollzellen, auf 3% in der HT1080-Tumorzelllinie gegenüber 22% in den Kontrollzellen sowie auf 8 - 11% gegenüber 34% in den SNB19-Kontrollzellen. Im Vergleich dazu war die Reduktion des Anteils an Zellen in der S-Phase nach Behandlung mit NVP-BEP800 schwächer (außer in der Tumorzelllinie HT1080). Hierbei betrug der Anteil der Zellen in der S-Phase 15% in der A549-Tumorzelllinie, 26% in der GaMG-Tumorzelllinie und 18% in der SNB19-Tumorzelllinie, dagegen fiel die Anzahl der S-Phase-Zellen bis auf 6% in der HT1080-Tumorzelllinie.

Die Tabelle 3.1.3 fasst die Ergebnisse der Zellzyklusanalysen der getesteten Tumorzelllinien nach Behandlung mit HSP90-Inhibitoren aus mindestens drei unabhängigen Versuchen zusammen.

Tabelle 3.1.3. Zellzyklusverteilung humaner Tumorzelllinien nach HSP90-Inhibition.

Tumorzelllinie	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	G2/G1
A549-DMSO	53±3	36±2	11±4	0.2
NVP-AUY922	53±5	4±1	43±4	0.8
NVP-BEP800	39±12	11±5	51±8	1.3
17-DMAG	53±7	3±1	43±6	0.8
GaMG-DMSO	52±3	34±6	14±3	0.3
NVP-AUY922	38±6	9±7	53±8	1.4
NVP-BEP800	36±4	17±6	47±6	1.3
17-DMAG	39±8	14±3	47±9	1.2
HT1080-DMSO	43±1	22±1	35±2	0.8
NVP-AUY922	42±6	4±2	54±6	1.3
NVP-BEP800	44±3	7±1	49±3	1.1
17-DMAG	41±8	5±2	53±8	1.3
SNB19-DMSO	41±6	36±3	22±3	0.5
NVP-AUY922	32±0	11±1	57±1	1.8
NVP-BEP800	34±4	17±3	50±3	1.5
17-DMAG	33±1	10±2	57±1	1.7

Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der Tumorzellen in G1-, S- und G2-Phasen, woraus der G2/G1-Faktor berechnet wurde (MW ± STABW).

Um den Einfluss der Kombination der HSP90-Inhibition mit Bestrahlung auf den Zellzyklus zu untersuchen, wurden die Tumorzellen mit HSP90-Inhibitoren behandelt, mit 8 Gy bestrahlt und danach in frischem DMEM bis zur Analyse inkubiert. Repräsentative Zellzyklus-Analysen 24 h und 48 h nach der Bestrahlung aus drei unabhängigen Versuchen sind in Abb. 3.1.14 dargestellt.

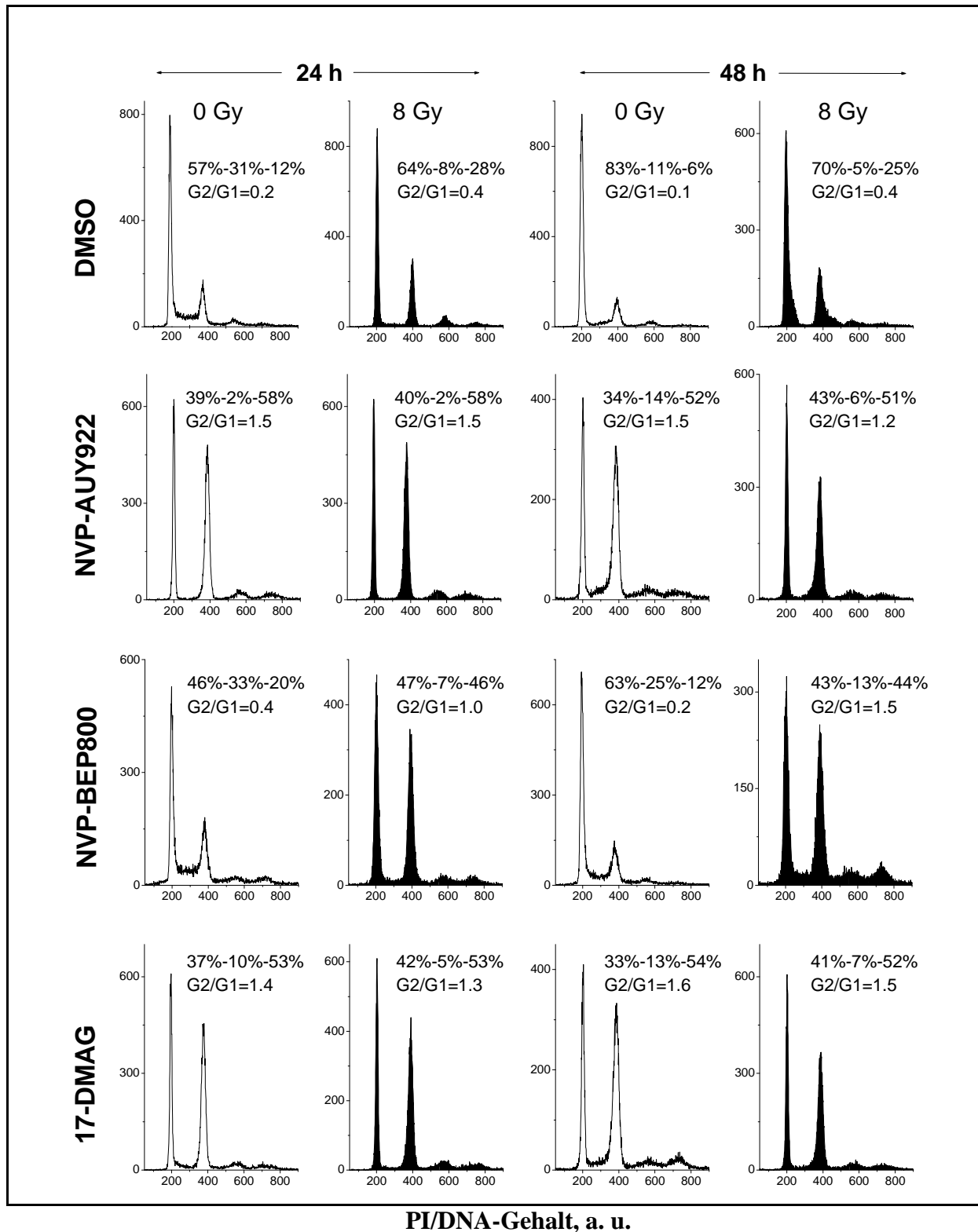
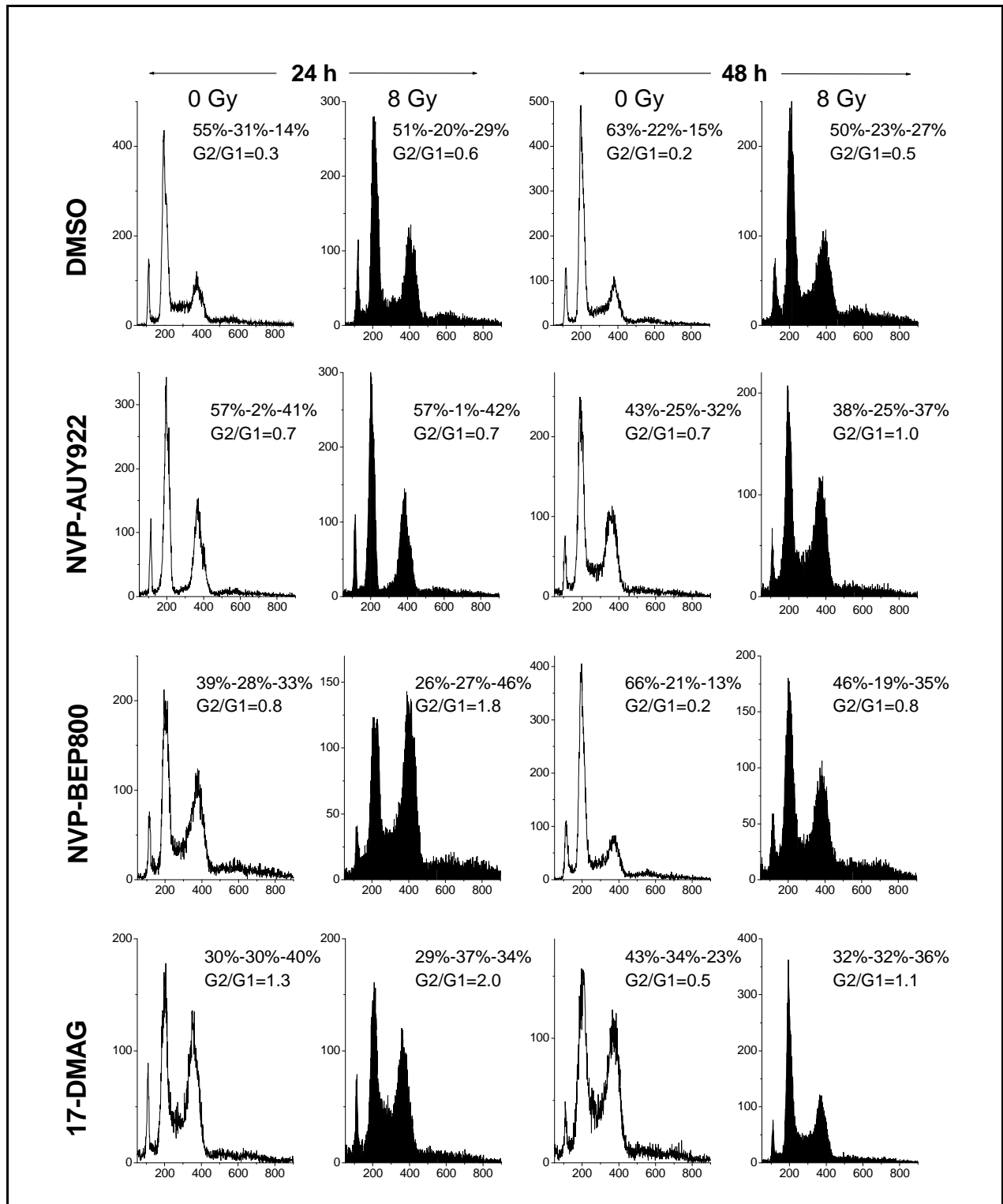
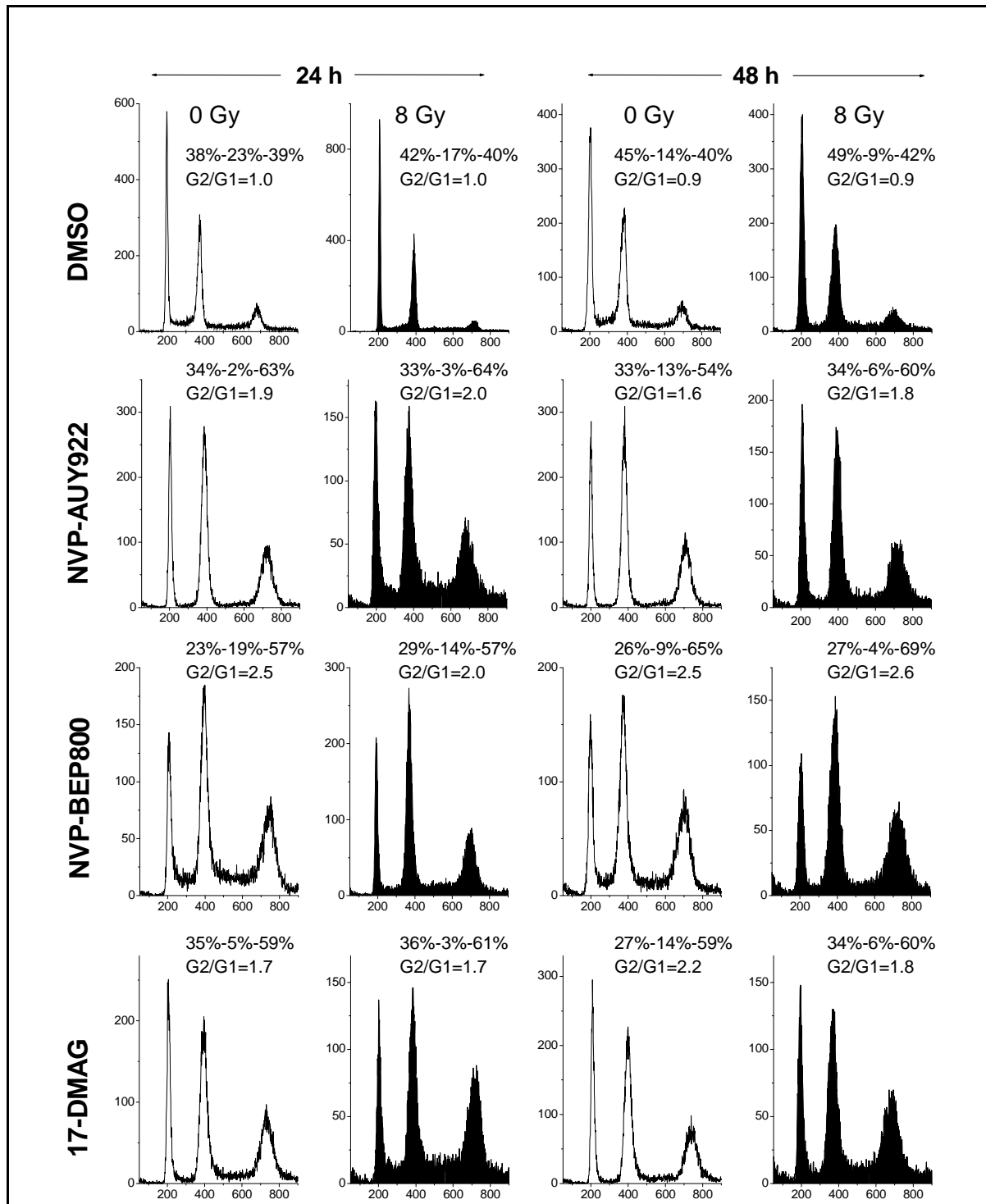


Abb. 3.1.14A. Zellzyklusverteilung der Tumorzelllinie A549 nach Behandlung mit HSP90-Inhibitoren und Bestrahlung. Die Tumorzellen wurden behandelt und bestrahlt, danach fixiert und mit PI gefärbt. Die Analyse des DNA-Gehalts wurde anschließend durchflusszytometrisch im linearen Modus durchgeführt. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Zellzyklus-Analyse der unbestrahlten (ungefüllte Histogramme) und bestrahlten (gefüllte Histogramme) Tumorzellen. Die Prozentzahlen entsprechen dem Anteil an Tumorzellen in den G1-, S- und G2-Phasen, woraus der G2/G1-Faktor berechnet wurde (reproduziert aus Stingl et al. 2010 mit freundlicher Genehmigung vom Verlag Nature Publishing Group).



PI/DNA-Gehalt, a. u.

Abb. 3.1.14B. Zellzyklusverteilung der Tumorzelllinie GaMG nach Behandlung mit HSP90-Inhibitoren und Bestrahlung. Legende wie in Abb. 3.1.14A



PI/DNA-Gehalt, a. u.

Abb. 3.1.14C. Repräsentative Zellzyklusverteilung der Tumorzelllinie HT1080 nach Behandlung mit HSP90-Inhibitoren und Bestrahlung. Legende wie in Abb. 3.1.14A

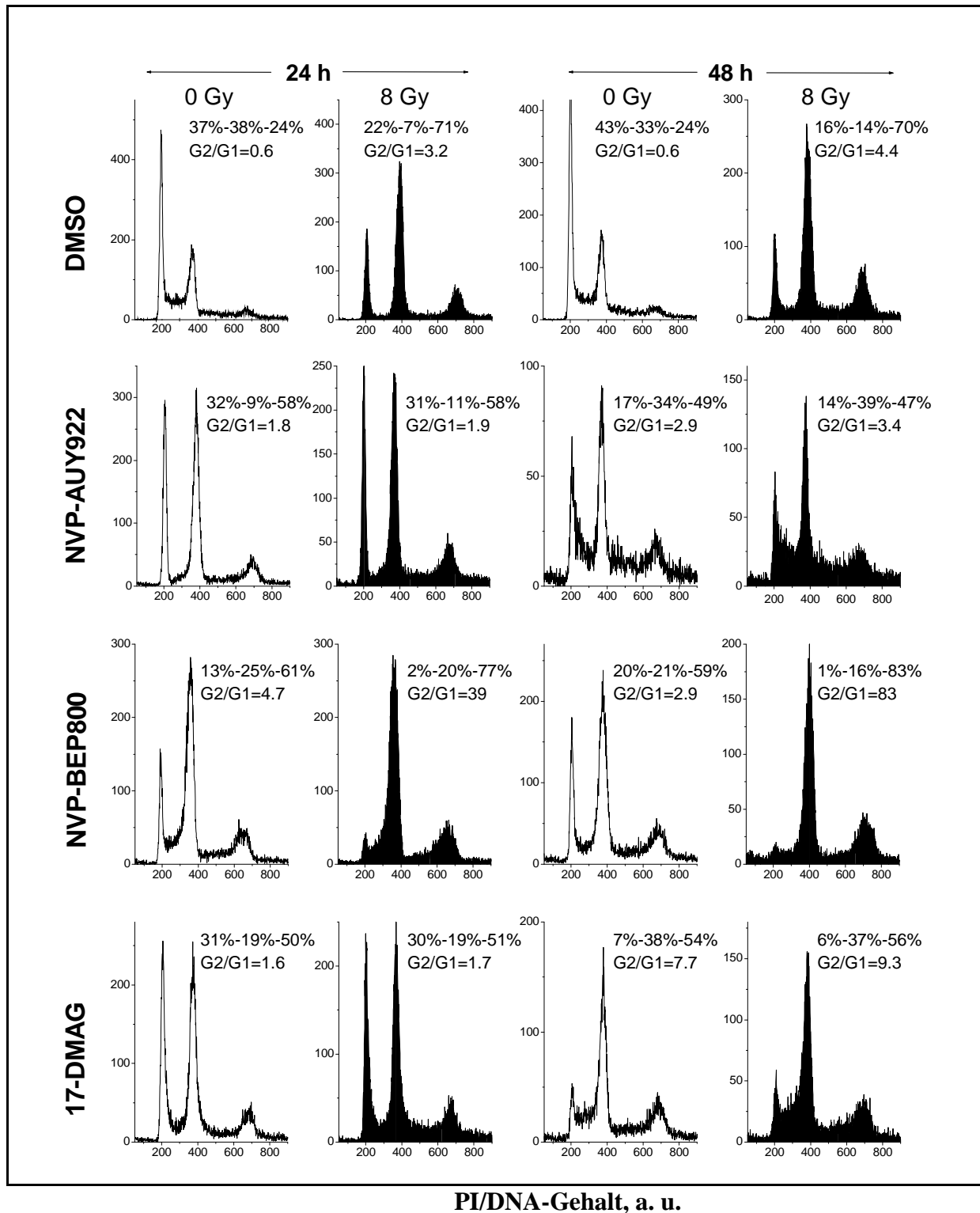


Abb. 3.1.14D. Zellyklusverteilung der Tumorzelllinie SNB19 nach Behandlung mit HSP90-Inhibitoren und Bestrahlung. Legende wie in Abb. 3.1.14A

Wie in Abb. 3.1.14A-D (ungefüllte Histogramme) ersichtlich, induzierte die alleinige Behandlung mit NVP-AUY922 oder 17-DMAG in allen Tumorzelllinien einen starken G2/M-Arrest, der bis zu 48 h nach dem Auswaschen der HSP90-Inhibitoren anhält.

Nach alleiniger Behandlung mit NVP-AUY922 wurde zusätzlich eine starke S-Phase Depletion beobachtet, die bis zu 24 h nach dem Auswaschen des HSP90-Inhibitors anhielt: 2 - 3% Zellen in der S-Phase in den Tumorzelllinien A549, GaMG und HT1080 im Vergleich zu 20 - 30% in den Kontrollzellen oder 9 bis 11% Zellen in der S-Phase in der Tumorzelllinie SNB19 im Vergleich zu circa 40% in den Kontrollzellen. Allerdings stieg der Anteil an Tumorzellen, die sich in der S-Phase befanden, nach weiteren 24 h wieder an (Abb. 3.1.14 A-D, ungefüllte 48 h-Histogramme) und erreichte die Werte der Kontrollen. Eine Normalisierung der S-Phase fand in der mit 17-DMAG behandelten GaMG-Tumorzelllinie bereits 24 h nach dem Auswaschen des HSP90-Inhibitors statt (Abb. 3.1.14B, ungefüllte Histogramme). In den mit NVP-BEP800 behandelten Tumorzellen wurde 24 h nach dem Auswaschen des HSP90-Inhibitors keine S-Phase Depletion aber ein G2/M-Arrest gemessen (Abb. 3.1.14, ungefüllte 24 h-Histogramme). Nach alleiniger Behandlung mit NVP-BEP800 wurden 48 h nach dem Auswaschen des HSP90-Inhibitors aus dem Kulturmedium keine Zellzyklusstörungen in den unbestrahlten A549- und GaMG-Tumorzellen detektiert, während die HT1080- und SNB19-Tumorzellen einen G2/M-Arrest aufwiesen (Abb. 3.1.14, ungefüllte 48 h-Histogramme). In der SNB19-Tumorzelllinie wurde nach Behandlung mit NVP-BEP800 ein hoher G2/M-Arrest (60% der Zellen in der G2/M-Phase) beobachtet.

Wie in der Abb. 3.1.14A-D (gefüllte Histogramme) gezeigt, führte die alleinige Bestrahlung zu einem bis zu 48 h anhaltendem G2/M-Arrest in allen Tumorzelllinien. Die Kombination der Bestrahlung mit NVP-AUY922 führte zu keinen zusätzlichen Zellzyklusstörungen im Vergleich zu alleiniger HSP90-Inhibition. Die Bestrahlung erhöhte den NVP-BEP800-vermittelten G2/M-Arrest in den meisten (außer HT1080) Tumorzelllinien bereits 24 h nach der Bestrahlung. Hierbei zeigten die mit NVP-BEP800 behandelten und zusätzlich bestrahlten Tumorzellen eine Erhöhung des Anteils an Zellen in der G2/M-Phase: um circa 30% in der A549-Tumorzelllinie, um circa 20% in der GaMG-Tumorzelllinie und um circa 20% in der SNB19-Tumorzelllinie im Vergleich zu den Proben, die nur mit NVP-BEP800 behandelt wurden (48 h-Werte). Dagegen zeigten die NVP-BEP800 behandelten und zusätzlich bestrahlten HT1080-Tumorzellen eine ähnliche Zellzyklusverteilung wie nach alleiniger HSP90-Inhibition.

Die Tabelle 3.1.4 fasst die Ergebnisse der Zellzyklusmessungen nach HSP90-Inhibition, 24 h und 48 h nach der Bestrahlung aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten zusammen.

Tabelle 3.1.4. Zellzyklusverteilung nach HSP90-Inhibition, 24 h und 48 h nach der Bestrahlung.

Zelllinie	Dosis (Gy)	24 h nach der Bestrahlung				48 h nach der Bestrahlung			
		G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	G2/G1	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	G2/G1
A549-DMSO	0	59±3	30±2	11±1	0.2	82±4	10±3	8±2	0.1
	8	64±3	8±1	29±2	0.5	68±2	5±4	27±4	0.4
NVP-AUY922	0	42±5	3±1	54±5	1.3	35±4	15±5	50±4	1.4
	8	43±5	3±1	55±6	1.3	44±2	6±1	50±2	1.1
NVP-BEP800	0	49±3	32±2	18±3	0.4	68±6	21±4	11±3	0.2
	8	46±5	6±1	48±5	1.0	46±3	11±2	44±3	1.0
17-DMAG	0	39±4	11±2	50±4	1.3	33±1	14±3	53±2	1.6
	8	43±3	5±1	52±3	1.2	42±2	8±1	50±3	1.2
GaMG-DMSO	0	52±3	31±1	17±3	0.3	62±3	23±4	16±3	0.3
	8	49±5	23±5	28±1	0.6	42±6	29±8	29±5	0.7
NVP-AUY922	0	48±13	3±1	50±13	1.0	47±7	27±5	26±4	0.6
	8	48±12	3±1	49±12	1.0	40±9	21±8	39±11	1.0
NVP-BEP800	0	38±3	34±5	28±3	0.7	56±7	28±5	16±3	0.3
	8	28±5	25±6	47±4	1.7	38±7	26±5	36±5	1.0
17-DMAG	0	33±4	35±4	32±8	1.0	40±4	35±2	25±5	0.6
	8	25±5	38±2	37±5	1.5	29±4	31±5	40±4	1.4
HT1080-DMSO	0	39±9	24±9	37±15	0.9	41±8	11±3	48±10	1.2
	8	49±16	12±5	39±11	0.8	48±8	8±1	48±8	1.0
NVP-AUY922	0	35±5	11±15	54±11	1.5	32±8	12±1	56±9	1.8
	8	41±9	6±5	53±14	1.3	32±11	7±2	61±10	1.9
NVP-BEP800	0	31±11	23±3	46±13	1.5	33±8	13±4	54±12	1.6
	8	38±11	14±2	48±10	1.3	33±7	7±3	60±9	1.8
17-DMAG	0	41±6	11±8	47±13	1.1	26±2	15±3	59±4	2.3
	8	45±11	5±3	49±14	1.1	31±7	9±4	59±5	1.9
SNB19-DMSO	0	43±7	33±7	24±1	0.6	45±4	30±9	26±6	0.6
	8	35±11	7±4	58±13	1.7	22±5	18±5	60±8	2.7
NVP-AUY922	0	32±1	8±1	59±2	1.8	16±1	30±4	54±5	3.4
	8	33±2	9±2	57±1	1.7	11±3	28±12	60±15	5.5
NVP-BEP800	0	12±3	24±5	64±8	5.3	21±5	24±6	55±11	2.6
	8	3±2	21±4	76±5	25.0	3±3	14±6	82±9	27.0
17-DMAG	0	32±1	17±4	51±5	1.6	10±5	29±11	60±11	6.0
	8	31±2	17±4	52±6	1.7	10±4	28±9	62±8	6.2

Die Zahlen geben den prozentualen Anteil an Tumorzellen in den G1-, S- und G2-Phasen an, woraus der G2/G1-Faktor berechnet wurde (MW ± STABW).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die neuartigen HSP90-Inhibitoren im Allgemeinen einen G2/M-Arrest induzieren. In Kombination mit Bestrahlung konnte der NVP-BEP800 induzierte G2/M-Arrest erhöht werden. NVP-AUY922 induzierte außerdem eine temporäre Depletion der S-Phase.

3.1.9. Einfluss von HSP90-Inhibition und Bestrahlung auf die Expression von Zellzyklus-assoziierten Proteinen

Um den Einfluss der HSP90-Inhibition mit und ohne Bestrahlung auf den Zellzyklus zu erklären, wurde die Expression einiger Zellzyklus-assoziiierter Proteine in den getesteten Tumorzelllinien analysiert. Dafür wurden die Tumorzellen mit HSP90-Inhibitoren behandelt und 24 h danach mit 8 Gy bestrahlt. Anschließend wurden 30 min und 24 h nach der Bestrahlung Zellextrakte hergestellt und die Expression von CDK1, CDK2, CDK4 und pRB mittels Western Blot analysiert.

Repräsentative Western-Blot-Analysen sind in der Abb. 3.1.15A und B für die getesteten Tumorzelllinien 30 min nach der Bestrahlung dargestellt.

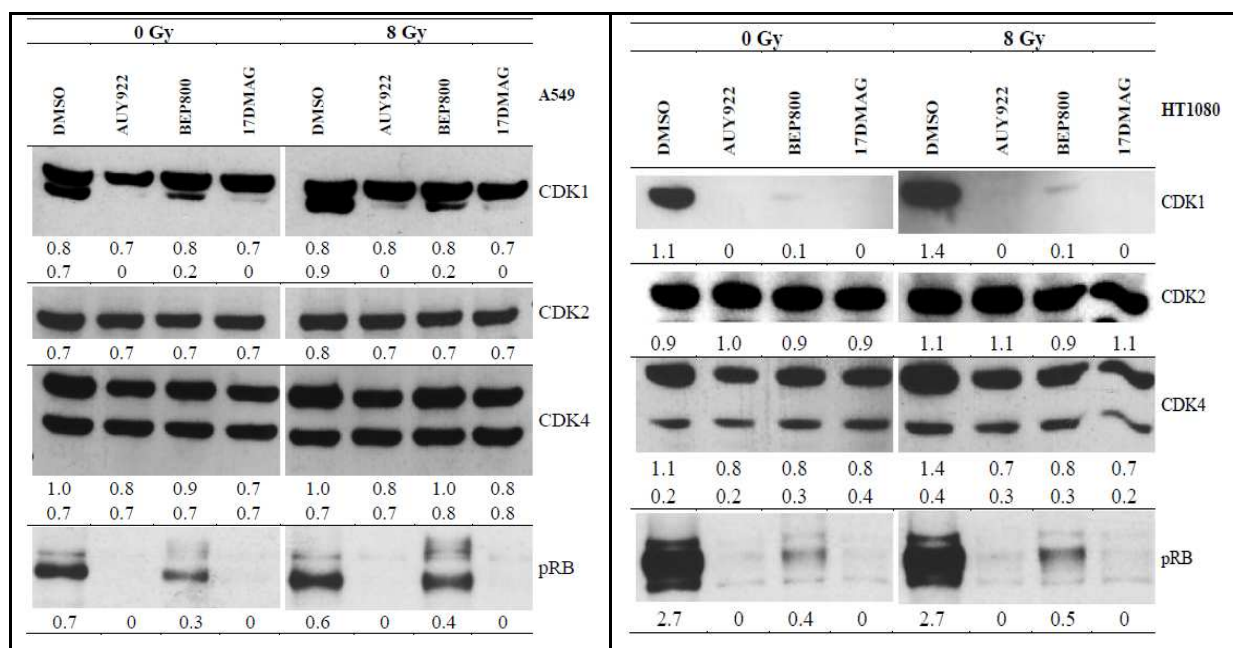


Abb. 3.1.15A. Expression von Zellzyklus-assoziierten Proteinen in den Tumorzelllinien A549 und HT1080 nach HSP90-Inhibition, 30 min nach der Bestrahlung. Die Abbildung zeigt jeweils eine repräsentative Western-Blot-Analyse der Expression von CDK1, CDK2, CDK4 und pRB. Das Verhältnis der integralen Dichte der Proteinbanden zu den β -Aktin Banden als Ladekontrolle ist durch die Zahlen angegeben. (Modifiziert nach Stingl et al. 2010 und reproduziert mit freundlicher Genehmigung vom Verlag Nature Publishing Group).

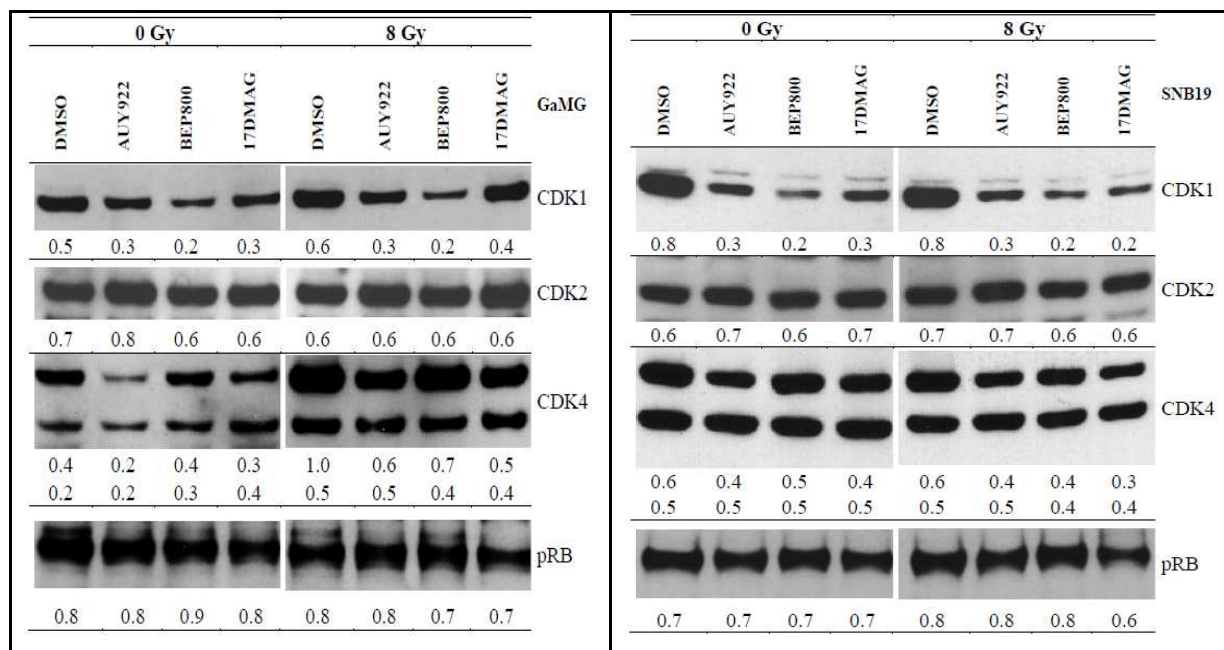


Abb. 3.1.15B. Expression von Zellzyklus-assoziierten Proteinen in den Tumorzelllinien GaMG und SNB19 nach HSP90-Inhibition, 30 min nach der Bestrahlung. Für Legende siehe Abb. 3.1.15A.

Wie in Abb. 3.1.15 gezeigt, war das Expressionsmuster von CDK1 unterschiedlich je nach Tumorzelllinie. Es ergab Einzelbanden in den Tumorzelllinien HT1080 und GaMG sowie Doppelbanden in den Tumorzelllinien A549 und SNB19. Infolge der alleinigen HSP90-Inhibition (0 Gy-Spalte) wurde eine Reduktion des CDK1-Proteins in allen getesteten Tumorzelllinien beobachtet. Bei den Tumorzelllinien, deren CDK1-Expression Doppelbanden aufwies, war die untere CDK1-Proteinbande reduziert, während die obere CDK1-Proteinbande unabhängig von der Behandlung mit HSP90-Inhibitoren unverändert blieb. Die Expression von CDK2 wurde durch die Behandlung mit HSP90-Inhibitoren nicht beeinflusst. Weiterhin wurde infolge der HSP90-Inhibition eine Reduktion des CDK4-Proteins in den getesteten Tumorzelllinien in unterschiedlichem Ausmaß beobachtet. In den Tumorzelllinien A549 und HT1080 konnte außerdem die Depletion des pRB-Proteins detektiert werden, während die Menge an pRB in den Tumorzelllinien GaMG und SNB19 unverändert blieb.

Dreißig Minuten nach der Bestrahlung (8 Gy-Spalte) war die Expression der Zellzyklus-assoziierten Proteine ähnlich wie nach alleiniger HSP90-Inhibition.

Repräsentative Western-Blot-Analysen sind in der Abb. 3.1.16 für die getesteten Tumorzelllinien 24 h nach der Bestrahlung dargestellt.

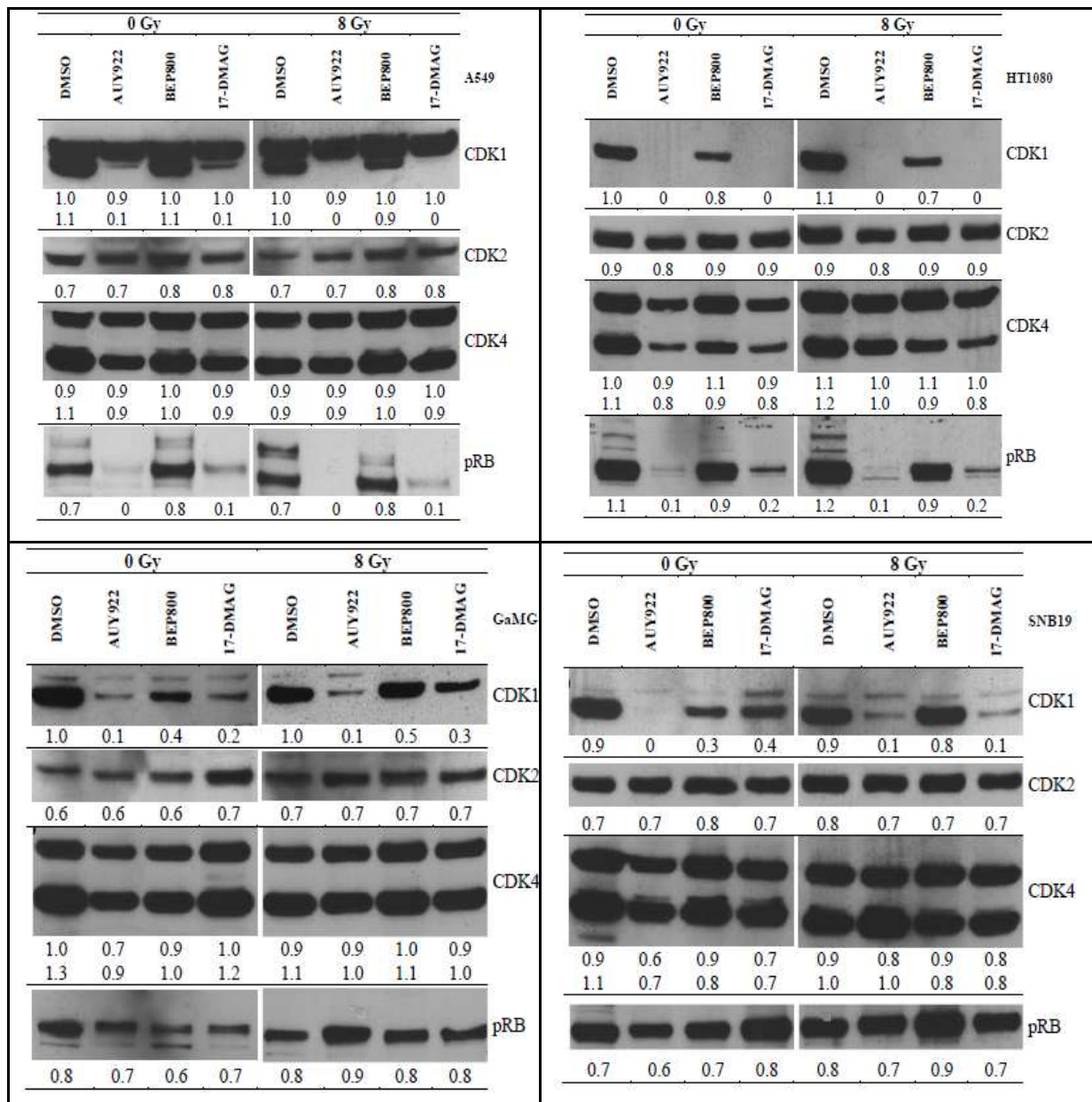


Abb. 3.1.16. Expression von Zellzyklus-assoziierten Proteinen in den Tumorzelllinien A549, HT1080, GaMG und SNB19 nach HSP90-Inhibition und Bestrahlung. Die Tumorzellen wurden mit HSP90-Inhibitoren behandelt, dann mit 8 Gy bestrahlt. Nach Bestrahlung wurden sie bis zur Analyse in frischem DMEM ohne Inhibitoren inkubiert. Die Abbildung zeigt die Expression von CDK1, CDK2, CDK4 und pRB 24 h nach der Bestrahlung. Das Verhältnis der integralen Dichte der Proteinbanden zu den β -Aktin Banden als Ladekontrolle ist durch die Zahlen angegeben.

Wie in der Abb. 3.1.16 gezeigt, konnte die Reduktion der Proteinmengen von CDK1 und pRB, die bereits unmittelbar nach der Behandlung mit HSP90-Inhibitoren detektiert wurde, bis zu 24 h nach dem Auswaschen der Substanzen nachgewiesen werden. Eine moderate Reduktion von CDK4 konnte nach Behandlung mit NVP-AUY922 oder 17-DMAG festgestellt werden.

Die Kombination der HSP90-Inhibition mit der Bestrahlung führte 24 h post-IR zu keiner Veränderung der Expression der getesteten Proteine im Vergleich zu alleiniger HSP90-Inhibition.

Die Ergebnisse aus diesem Kapitel haben gezeigt, dass die Behandlung mit den neuartigen HSP90-Inhibitoren das Überleben der Tumorzellen nach Bestrahlung reduzierte, aufgrund von Zellzyklusstörungen, erhöhten DNA-Schäden und verlangsamter DNA-Reparatur (nachgewiesen in allen getesteten Tumorzelllinien) sowie Induktion der Apoptose (in allen Tumorzelllinien außer A549). Gleichzeitig induzierte die pharmakologische HSP90-Inhibition in allen getesteten Tumorzelllinien die Expression der Hitzeschockproteine HSP90 und HSP70, deren anti-apoptischen Funktionen die radiosensibilisierenden Effekte der HSP90-Inhibitoren vermindern können. Um die Hochregulation von HSP90 und HSP70 nach HSP90-Inhibition zu unterbinden, kämen zwei Strategien in Frage: einerseits die siRNA-vermittelte Herunterregulierung der stressinduzierbaren HSP90 α -Isoform, andererseits die Inhibition der HSF1-vermittelten Stressantwort durch KNK437.

3.2. Einfluss des siRNA-vermittelten HSP90 α -Knock-downs alleine oder in Kombination mit HSP90-Inhibition auf die Strahlenantwort humaner Tumorzelllinien

Wie im vorherigen Kapitel gezeigt wurde, erhöhte die Vorbehandlung mit NVP-AUY922 und NVP-BEP800 die Strahlenempfindlichkeit der getesteten humanen Tumorzelllinien. Allerdings führte die HSP90-Inhibition gleichzeitig zu einer stressbedingten Überexpression von HSP90. Die Unterdrückung der HSP90-Expression mittels siRNA könnte die Hochregulation von HSP90 vermindern und dadurch den radiosensibilisierenden Effekt der HSP90-Inhibitoren erhöhen.

Dafür wurden die Tumorzelllinien A549 und GaMG mit siRNAs gegen die stress-induzierbare Isoform HSP90 α (HSP90AA1, Gen ID 3320) transfiziert. Anschließend wurde der Einfluss des siRNA-vermittelten Knock-downs von HSP90 α auf die radiosensibilisierende Wirkung von NVP-AUY922 untersucht. Der zeitliche Ablauf der Experimente ist in Abb. 3.2.1 gezeigt.

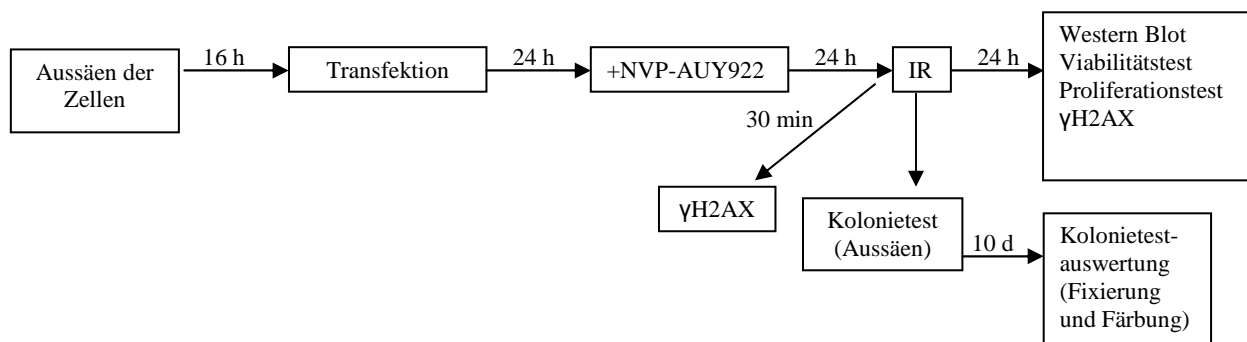


Abb. 3.2.1. Zeitlicher Ablauf der Experimente. Die Tumorzellen wurden 24 h nach der Transfektion mit siRNA gegen HSP90 α oder non-silencing siRNA für weitere 24 h mit 200 nM NVP-AUY922 behandelt und danach mit 8 Gy bestrahlt. Anschließend wurden die Tumorzellen mittels Western Blot, Zellviabilitätstest und Zellproliferationstest 24 h nach der Bestrahlung (IR) analysiert. Die DNA-Schäden und deren Reparatur wurden über die Expression des Histons γ H2AX 30 min und 24 h nach der Bestrahlung gemessen. Für die Koloniebildungstests wurden die transfizierten, mit NVP-AUY922 behandelten und bestrahlten Tumorzellen in frischem Medium ausgesät und bis zu 10 Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Die Abb. wurde modifiziert nach Stingl et al. 2012 und reproduziert mit freundlicher Genehmigung vom Springer Verlag.

3.2.1. Nachweis des HSP90 α -Knock-downs auf mRNA- und Proteinebene

Zur Transfektion wurden vier kommerziell erhältliche siRNAs angewendet, deren Sequenzen komplementär zu unterschiedlichen Regionen der HSP90 α mRNA (RefSeq NM_005348.3) waren. Durch die Transfektion der Tumorzellen mit diesen siRNAs soll spezifisch die Menge der HSP90 α mRNA reduziert und die Expression des HSP90 α -Proteins herunterreguliert werden. Der Effekt der Behandlung mit siRNA wurde sowohl auf der mRNA Ebene mittels semiquantitativer Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) als auch auf der Proteinebene mittels Western Blot untersucht (Abb. 3.2.2).

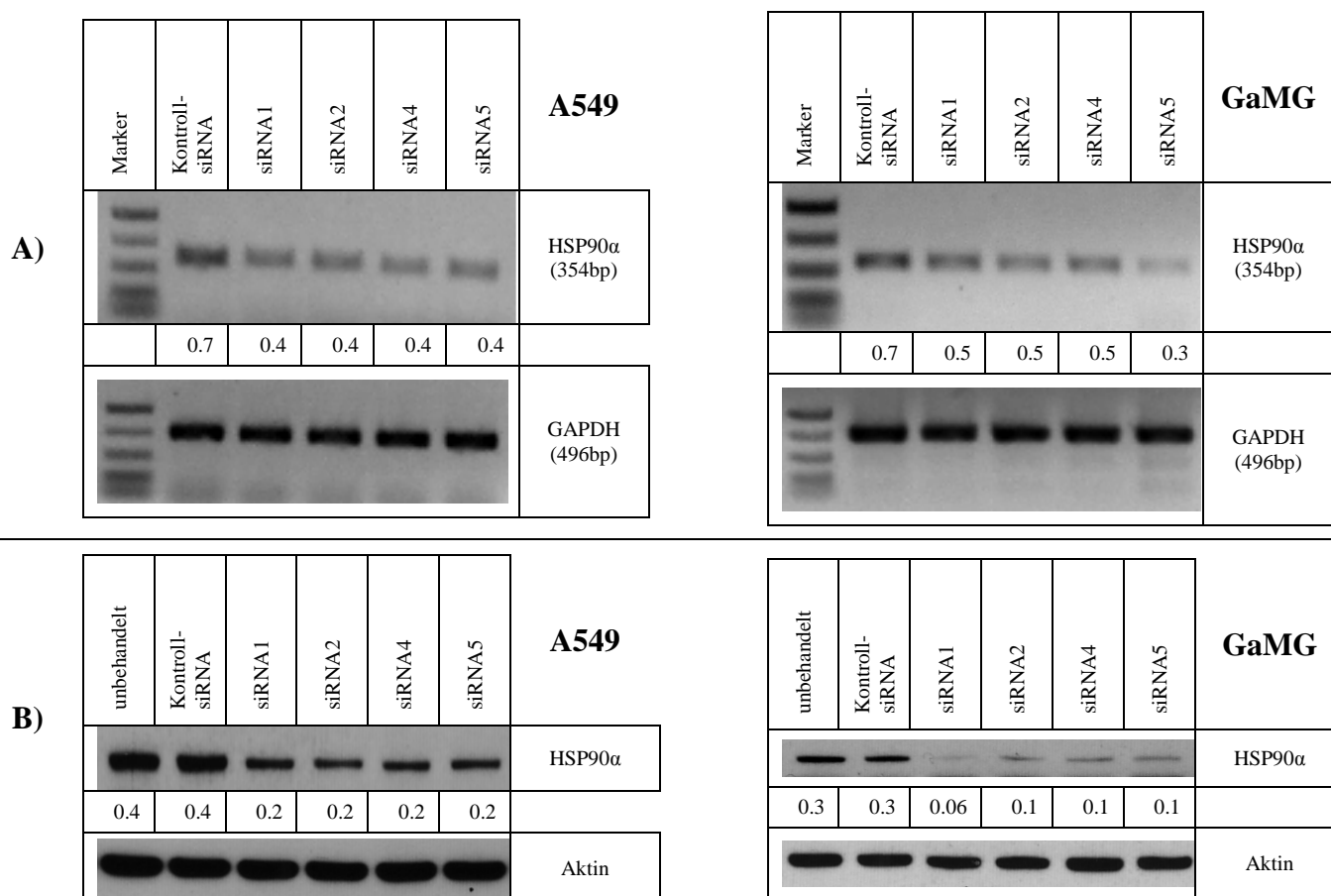


Abb.3.2.2. HSP90 α mRNA- und Proteinlevel in den Tumorzelllinien A549 und GaMG nach Behandlung mit siRNA gegen HSP90 α . Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion mit 100 nM siRNA1, 2, 4 und 5 gegen HSP90 α oder non-silencing siRNA als Kontrolle, wurden RT-PCR- und Western-Blot-Analysen durchgeführt. **(A)** Die repräsentative RT-PCR-Analyse zeigt die amplifizierten RT-PCR-Produkte (354bp für HSP90 α , 496bp für GAPDH) im Vergleich zu dem Quick load PCR Marker, bestehend aus DNA-Fragmenten in Größen von 766 bp, 500 bp, 300 bp, 150 bp und 50 bp. Das Verhältnis der integralen Dichte der HSP90 α -Banden zu den GAPDH-Banden ist durch die Zahlen angegeben. **(B)** Die repräsentative Western-Blot-Analyse zeigt die Expression von HSP90 α , normiert auf die Expression von β -Aktin als Ladekontrolle. (Abb. modifiziert nach Stingl et al. 2012 und reproduziert mit freundlicher Genehmigung vom Springer Verlag).

Wie in der Abb. 3.2.2A gezeigt, reduzierte die Behandlung mit siRNA gegen HSP90 α die Menge der HSP90 α mRNA auf 60% in der A549-Tumorzelllinie im Vergleich zu den Proben, die mit non-silencing Kontroll-siRNA transfiziert wurden. In der GaMG-Tumorzelllinie wurde die Menge der HSP90 α mRNA auf 70% nach Behandlung mit siRNA 1, 2 und 4 sowie auf 40% nach Behandlung mit siRNA5 im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Die Menge der GAPDH mRNA, die als Kontrolle für die Spezifität der siRNAs diente, zeigte dagegen keine Unterschiede (Abb. 3.2.2A).

Wie in der Abb. 3.2.2B ersichtlich, wurde die Menge des HSP90 α Proteins um 50% in der A549-Tumorzelllinie und bis auf 20% in der GaMG-Tumorzelllinie im Vergleich zu der Kontrolle reduziert, was darauf hinweist, dass die Effizienz des Knock-downs von HSP90 α zelltypabhängig ist.

Da die non-silencing siRNAs in der Konzentration von 100 nM keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Proteine zeigte, wurde in weiteren Versuchen aus Kostengründen eine niedrigere Konzentration (25 nM) eingesetzt. Die siRNAs gegen HSP90 α wurden für weitere Experimente in einer Konzentration von 100 nM eingesetzt.

3.2.2. Einfluss von HSP90 α -Knock-down und Bestrahlung auf die Koloniebildungsfähigkeit

Die mit siRNA transfizierten Tumorzelllinien A549 und GaMG wurden 48 h nach Transfektion bestrahlt und deren Überleben mittels Kolonietest bestimmt (Abb. 3.2.3).

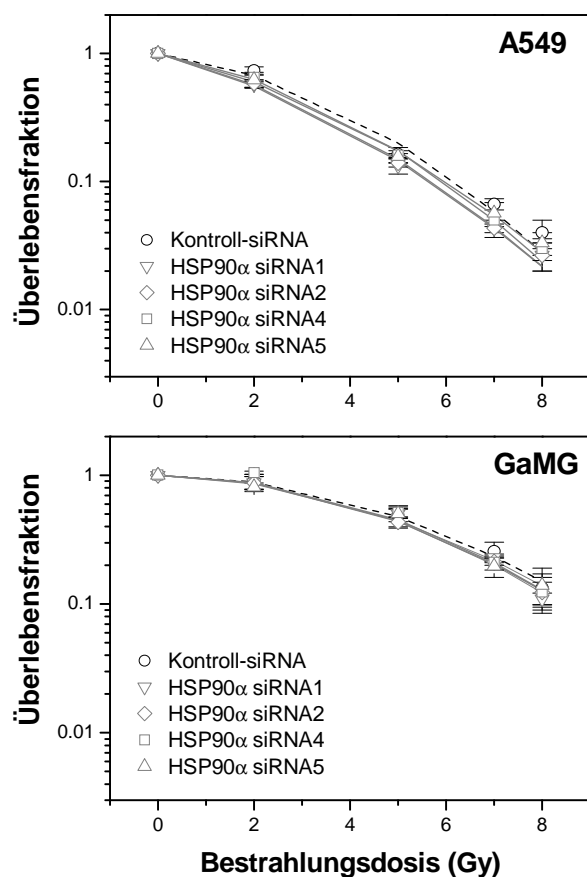


Abb. 3.2.3. Einfluss der Transfektion mit verschiedenen siRNAs auf die Koloniebildungsfähigkeit bestrahlter A549 und GaMG-Tumorzellen. Die Abbildung zeigt die Dosis-Überlebenskurven der Tumorzelllinien 48 h nach Transfektion mit siRNA 1, 2, 4 und 5 gegen HSP90 α (graue Symbole, graue durchgezogene Linien) oder mit non-silencing Kontroll-siRNA (schwarze Kreise, schwarze punktierte Linien) in Abhängigkeit von der Strahlendosis (0 bis 8 Gy), ermittelt nach dem linear-quadratischen Modell. Jeder Datenpunkt stellt die Überlebensfraktionen klonogener Tumorzellen im Vergleich zu unbestrahlten Proben dar und ist ein Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen mit den entsprechenden Standardfehlern.

Wie in der Abb. 3.2.3 gezeigt, verliefen die Zellüberlebenskurven der Tumorzellen, die mit siRNA gegen HSP90 α transfiziert und zusätzlich bestrahlt wurden, ähnlich wie diejenigen der mit non-silencing siRNA-transfizierten Tumorzellen. Daraus lässt sich schließen, dass der HSP90 α -Knock-down von circa 50% keinen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit der transfizierten Tumorzellen hat.

Die Überlebenskurven wurden quantitativ ausgewertet und in der Tabelle 3.2.1 zusammengefasst. Die Überlebensfraktion der unbestrahlten Tumorzellen (PE-Werte) sowie die strahlenbiologischen Parameter SF2 und D10, gemittelt aus drei unabhängigen Versuchen sind für beide Tumorzelllinien gezeigt.

Tabelle 3.2.1. Plattiereffizienz sowie strahlenbiologische Parameter SF2 und D10 der Tumorzelllinien A549 und GaMG nach Transfektion mit siRNA (non silencing siRNA als Kontrolle oder siRNA1, 2, 4, 5 gegen HSP90 α) und Bestrahlung (MW \pm STABW).

Tumorzelllinie	PE	SF2	D₁₀ (Gy)
A549 + Kontroll-siRNA	0.9 \pm 0.1	0.69 \pm 0.12	6.3 \pm 0.6
+ siRNA1	0.8 \pm 0.1	0.57 \pm 0.08	6.0 \pm 0.0
+ siRNA2	0.8 \pm 0.1	0.56 \pm 0.08	6.0 \pm 0.0
+ siRNA4	0.8 \pm 0.1	0.61 \pm 0.08	6.0 \pm 0.0
+ siRNA5	0.6 \pm 0.1	0.54 \pm 0.05	6.0 \pm 0.0
GAMG + Kontroll-siRNA	0.4 \pm 0.1	0.87 \pm 0.06	9.7 \pm 1.2
+ siRNA1	0.3 \pm 0.1	0.85 \pm 0.05	8.7 \pm 0.6
+ siRNA2	0.3 \pm 0.1	0.82 \pm 0.10	8.7 \pm 0.6
+ siRNA4	0.3 \pm 0.1	0.87 \pm 0.02	8.7 \pm 0.6
+ siRNA5	0.2 \pm 0.2	0.83 \pm 0.04	9.3 \pm 2.5

Der Vergleich der PE-Werte (Tabelle 3.2.1) deutet darauf hin, dass die Transfektion mit siRNA 1, 2 und 4 gegen HSP90 α keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebensfraktion der getesteten Tumorzelllinien hatte. Dagegen reduzierte die Transfektion mit siRNA5 gegen HSP90 α die Plattiereffizienz der A549-Tumorzelllinie um Faktor 1.5 sowie um Faktor 2 in der GaMG-Tumorzelllinie im Vergleich zur Kontroll-Transfektion mit non silencing siRNA (Tabelle 3.2.1). Betreffend der SF2- und D10-Werte zeigten die transfizierten und bestrahlten Tumorzellen keine Unterschiede zwischen den verwendeten siRNAs. Aus diesem Grund wurden für weitere Versuche die siRNAs 4 und 5 gegen HSP90 α ausgesucht.

3.2.3. Einfluss von HSP90 α -Knock-down, HSP90-Inhibition mittels NVP-AUY922 und Bestrahlung auf die Zellviabilität

Die A549- und GaMG-Tumorzelllinien wurden mit siRNA transfiziert, mit NVP-AUY922 vorbehandelt und mit 8 Gy bestrahlt. Die Zellviabilität wurde 24 h nach der Bestrahlung wie unter 2.4 beschrieben gemessen (Abb. 3.2.4).

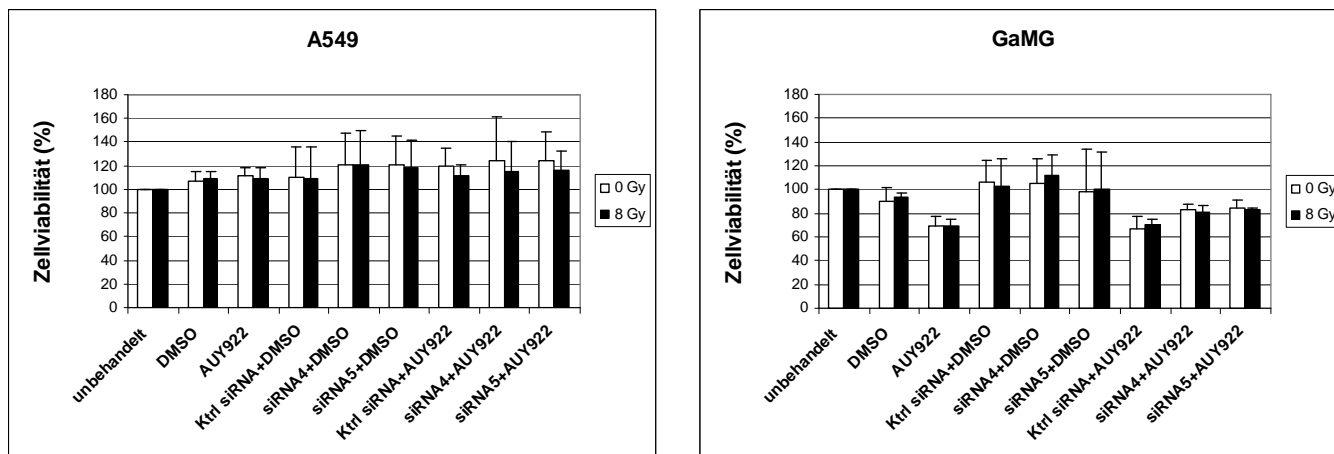


Abb. 3.2.4. Zellviabilität der A549- und GaMG-Tumorzellen nach HSP90 α -Knock-down, HSP90-Inhibition und Bestrahlung. Die Tumorzellen wurden mit non-silencing siRNA (Ktrl), siRNA4 oder siRNA5 gegen HSP90 α transfiziert, mit NVP-AUY922 oder DMSO inkubiert und anschließend mit 8 Gy bestrahlt. Die Abbildung zeigt die gemittelten Ergebnisse des Zellviabilitätstest mit den entsprechenden Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen 24 h nach der Bestrahlung. Weiße und schwarze Balken stellen unbestrahlte bzw. bestrahlte Zellproben dar. Die Zellviabilität der unbehandelten und unbestrahlten Proben wurde auf 100% gesetzt. (Abb. modifiziert nach Stingl et al. 2012 und reproduziert mit freundlicher Genehmigung vom Springer Verlag).

Wie in der Abb. 3.2.4 ersichtlich, blieb die Viabilität der Tumorzelllinien nach Transfektion mit siRNA unverändert. Im Gegensatz dazu wurde die Zellviabilität der GaMG-Tumorzellen nach Behandlung mit NVP-AUY922 auf circa 70% im Vergleich zu unbehandelten Tumorzellen reduziert, während die Zellviabilität der A549-Tumorzellen keine Veränderung aufwies. Nach Behandlung mit siRNA gegen HSP90 α und mit NVP-AUY922 zeigten die getesteten Tumorzelllinien die gleiche Zellviabilität wie nach alleiniger NVP-AUY922-Behandlung. Die Zellviabilität der getesteten Tumorzelllinien blieb 24 h nach der Bestrahlung mit 8 Gy unverändert.

3.2.4. Einfluss von HSP90 α -Knock-down, HSP90-Inhibition mittels NVP-AUY922 und Bestrahlung auf die Proliferationsrate

Die A549- und GaMG-Tumorzelllinien wurden mit siRNA transfiziert, mit NVP-AUY922 behandelt und mit 8 Gy bestrahlt. Die Proliferationsrate wurde 24 h nach der Bestrahlung wie unter 2.5 beschrieben bestimmt (Abb. 3.2.5).

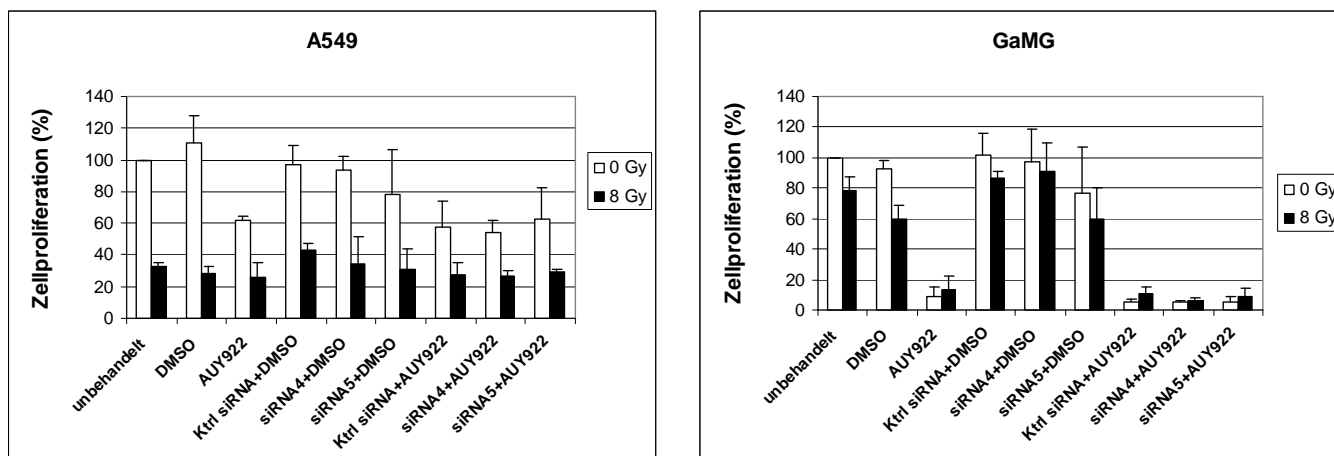


Abb. 3.2.5. Zellproliferationsrate der A549- und GaMG-Tumorzellen nach HSP90 α -Knock-down, HSP90-Inhibition und Bestrahlung. Die Tumorzellen wurden mit non-silencing siRNA (Ktrl), siRNA4 oder siRNA5 gegen HSP90 α transfiziert, mit NVP-AUY922 oder DMSO inkubiert und anschließend bestrahlt. Die Abbildung zeigt die Menge des eingebauten Thymidinanalogs BrdU in die DNA der proliferierenden Tumorzellen als Maß für die DNA-Synthese 24 h nach der Bestrahlung. Weiße und schwarze Balken stellen unbestrahlte bzw. bestrahlte Zellproben dar. Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit den entsprechenden Standardabweichungen, normiert auf die unbehandelten und unbestrahlten Proben (zu 100% gesetzt). Die Abb. wurde modifiziert nach Stingl et al. 2012 und reproduziert mit freundlicher Genehmigung vom Springer Verlag.

Wie in der Abb. 3.2.5 gezeigt, wurde die Zellproliferationsrate nach alleiniger Behandlung mit NVP-AUY922 bis auf 60% in den A549-Tumorzellen und bis auf 10% in den GaMG-Tumorzellen reduziert. Die alleinige Bestrahlung reduzierte die DNA-Syntheserate auf 80% in der GaMG-Tumorzelllinie und auf 30% in der A549-Tumorzelllinie. Der Knock-down von HSP90 α (mit oder ohne Bestrahlung) hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Zellproliferation in den getesteten Tumorzelllinien. In Kombination mit NVP-AUY922 hatte der siRNA-vermittelte Knock-down von HSP90 α keinen zusätzlichen Einfluss auf die Proliferationsrate der mit dem HSP90-Inhibitor behandelten Tumorzellen.

3.2.5. Einfluss des HSP90 α -Knock-downs auf die NVP-AUY922-vermittelte Radiosensibilisierung

Um den Einfluss des HSP90 α -Knock-downs auf die radiosensibilisierende Wirkung von NVP-AUY922 zu bestimmen, wurden die Tumorzelllinien A549 und GaMG mit siRNA gegen HSP90 α oder non-silencing Kontroll-siRNA transfiziert, mit dem HSP90-Inhibitor behandelt, bestrahlt und mittels Kolonietest analysiert (Abb. 3.2.6).

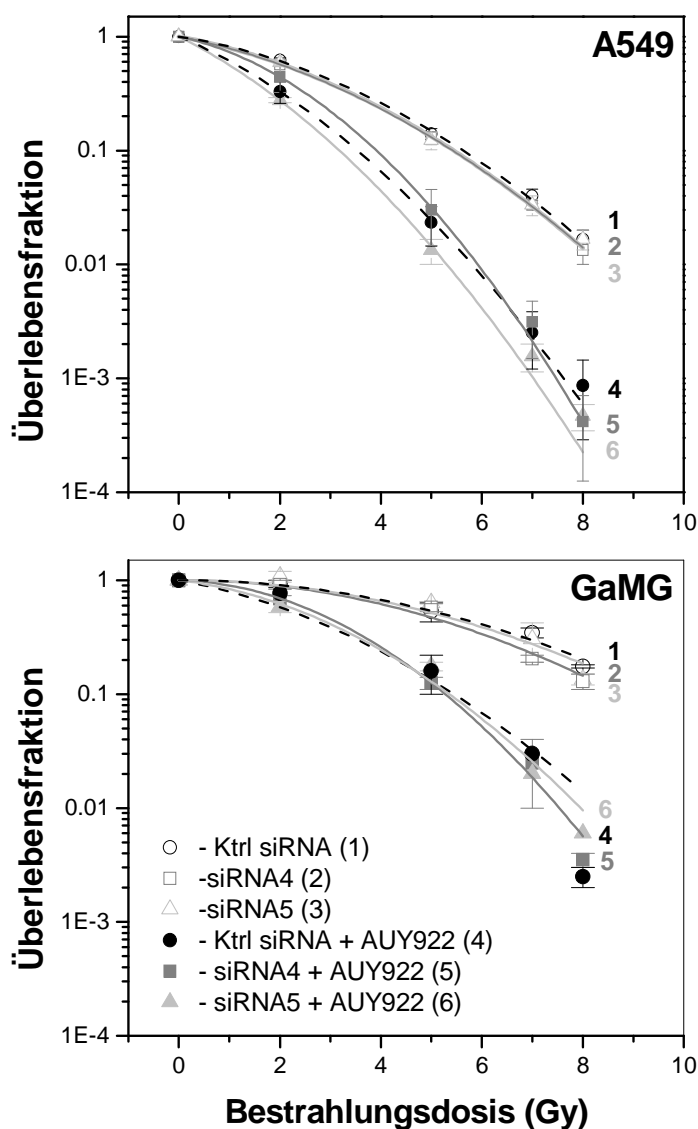


Abb. 3.2.6. Einfluss von HSP90 α -Knock-down, HSP90-Inhibition und Bestrahlung auf die Koloniebildungsfähigkeit der A549- und GaMG-Tumorzellen. Die Tumorzellen wurden mit siRNA gegen HSP90 α (graue Symbole, graue durchgezogene Linien) oder Kontroll-siRNA (schwarze Kreise, schwarze punktierte Linien) transfiziert. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Tumorzellen mit NVP-AUY922 (gefüllte Symbole) oder DMSO (ungefüllte Symbole) für weitere 24 h inkubiert und anschließend bestrahlt (1 bis 8 Gy). Nach Bestrahlung wurden die Tumorzellen in frischem Medium ausplattiert und unter Standardbedingungen für circa 10 Tage inkubiert. Jeder Datenpunkt stellt die Überlebensfraktionen klonogener Tumorzellen im Vergleich zu den unbestrahlten Proben dar und ist ein Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen mit den entsprechenden Standardfehlern. (Abb. modifiziert nach Stingl et al. 2012 und reproduziert mit freundlicher Genehmigung vom Springer Verlag).

Wie in der Abb. 3.2.6 gezeigt, hatte der HSP90 α -Knock-down keinen Einfluss auf den Verlauf der Zellüberlebenskurven nach HSP90-Inhibition und Bestrahlung.

Die Überlebenskurven (Abb. 3.2.6) wurden quantitativ ausgewertet und in Tabelle 3.2.2 zusammengefasst. Die Tabelle 3.2.2 fasst die Überlebensfraktion der unbestrahlten Tumorzellen (PE-Werte) sowie die strahlenbiologischen Parameter SF2 und D10 für beide Tumorzelllinien zusammen.

Tabelle 3.2.2. Plattiereffizienz sowie strahlenbiologische Parameter SF2 und D10 der A549- und GaMG-Tumorzellen nach Kombination der Bestrahlung mit siRNA gegen HSP90 α und mit NVP-AUY922 (MW \pm STABW).

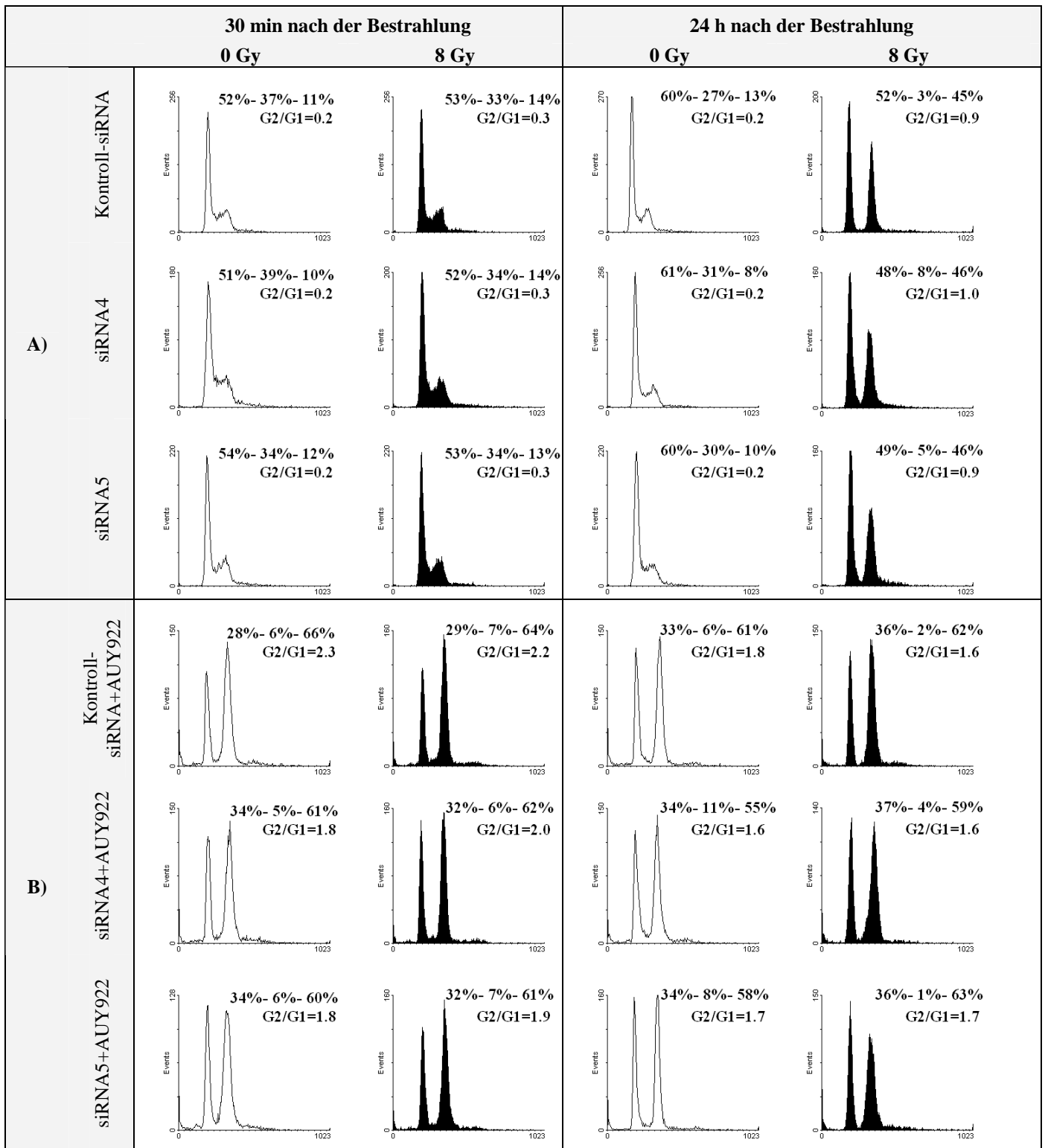
Tumorzelllinie	Behandlung	PE	SF2	D ₁₀ (Gy)
A549	Kontroll-siRNA	0.8 \pm 0.1	0.61 \pm 0.06	5.6 \pm 0.3
	+siRNA4	0.7 \pm 0.1	0.57 \pm 0.06	5.4 \pm 0.3
	+siRNA5	0.6 \pm 0.2	0.58 \pm 0.05	5.3 \pm 0.3
	Kontroll-siRNA+AUY922	0.5 \pm 0.2	0.33 \pm 0.12	3.5 \pm 0.6
	+siRNA4+AUY922	0.3 \pm 0.1	0.32 \pm 0.06	3.8 \pm 0.9
	+siRNA5+AUY922	0.3 \pm 0.1	0.28 \pm 0.02	3.2 \pm 0.1
GAMG	Kontroll-siRNA	0.3 \pm 0.1	0.88 \pm 0.05	10.1 \pm 0.8
	+siRNA4	0.3 \pm 0.1	0.79 \pm 0.1	8.7 \pm 0.1
	+siRNA5	0.2 \pm 0.1	0.89 \pm 0.01	8.7 \pm 0.1
	Kontroll-siRNA+AUY922	0.2 \pm 0.1	0.80 \pm 0.1	5.3 \pm 0.1
	+siRNA4+AUY922	0.2 \pm 0.1	0.69 \pm 0.01	5.3 \pm 0.4
	+siRNA5+AUY922	0.1 \pm 0.05	0.62 \pm 0.1	5.4 \pm 0.1

Wie aus Tabelle 3.2.2 ersichtlich, reduzierte die kombinatorische Behandlung mit siRNA gegen HSP90 α und NVP-AUY922 die Plattiereffizienz der Tumorzelllinien im Vergleich zu der alleinigen Behandlung mit NVP-AUY922: um den Faktor 1.6 in der A549-Tumorzelllinie und um den Faktor 2 in der mit siRNA5-transfizierten GaMG-Tumorzelllinie. In Kombination mit der Bestrahlung zeigten die transfizierten und mit NVP-AUY922 behandelten Tumorzellen ähnliche SF2- und D10-Werte wie nach alleiniger NVP-AUY922-Behandlung.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Transfektion mit siRNA gegen HSP90 α die radiosensibilisierende Wirkung von NVP-AUY922 in beiden Tumorzelllinien nicht erhöhte.

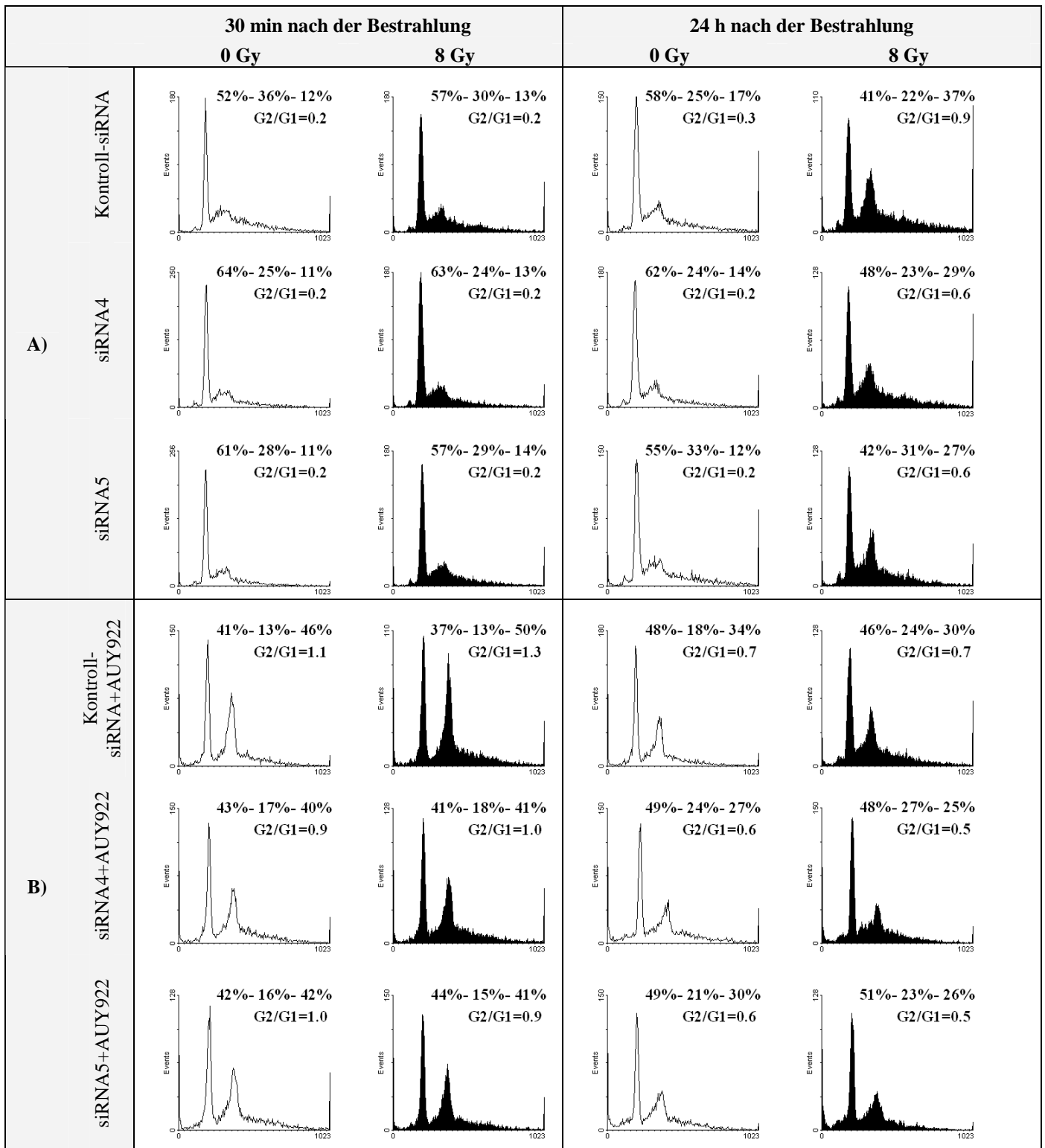
3.2.6. Einfluss von HSP90 α -Knock-down, HSP90-Inhibition mittels NVP-AUY922 und Bestrahlung auf den Zellzyklus

Die Tumorzelllinien A549 und GaMG wurden mit siRNA gegen HSP90 α transfiziert, mit dem HSP90-Inhibitor NVP-AUY922 behandelt und mit 8 Gy bestrahlt. Dreißig Minuten und 24 h nach der Bestrahlung wurden die Tumorzellen fixiert, mit PI gefärbt und anschließend der DNA-Gehalt durchflusszytometrisch bestimmt. Die Abb. 3.2.7 zeigt repräsentative Zellzyklus-Histogramme 30 min und 24 h nach der Bestrahlung.



PI/DNA Gehalt, a. u.

Abb. 3.2.7A. Einfluss von HSP90 α -Knock-down, HSP90-Inhibition mittels NVP-AUY922 und Bestrahlung auf den Zellzyklus der A549-Tumorzellen. Die Tumorzellen wurden mit siRNA transfiziert, mit NVP-AUY922 inkubiert und mit 8 Gy bestrahlt. Gezeigt sind repräsentative Zellzyklus-Histogramme der unbestrahlten (ungefüllte Histogramme) und bestrahlten (gefüllte Histogramme) Tumorzellen 30 min und 24 h nach der Bestrahlung. Die Prozentzahlen entsprechen dem Anteil an Tumorzellen in den G1-, S- und G2-Phasen, woraus der G2/G1-Faktor berechnet wurde.



PI/DNA-Gehalt, a. u.

Abb. 3.2.7B. Einfluss von HSP90 α -Knock-down, HSP90-Inhibition mittels NVP-AUY922 und Bestrahlung auf den Zellzyklus der GaMG-Tumorzellen. Legende wie in Abb. 3.2.7A.

Die Ergebnisse der Zellzyklus-Analysen (wie in Abb. 3.2.7 gezeigt) aus drei unabhängigen Versuchen sind in der Tabelle 3.2.3 zusammengefasst

Tabelle 3.2.3. Zellzyklusverteilung der A549- und GaMG-Tumorzelllinien nach Behandlung mit siRNA und NVP-AUY922, 30 min und 24 h nach der Bestrahlung.

Behandlung	Dosis (Gy)	30 min nach der Bestrahlung				24 h nach der Bestrahlung			
		G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	G2/G1	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	G2/G1
A549-Kontroll-siRNA	0	55±4	33±4	12±3	0.2	59±2	28±4	14±2	0.2
	8	57±4	31±4	13±3	0.2	50±2	6±2	44±1	0.9
siRNA4	0	56±3	34±4	11±1	0.2	61±3	28±4	12±4	0.2
	8	56±4	33±2	12±3	0.2	52±3	7±2	42±3	0.8
siRNA5	0	56±2	31±4	13±3	0.2	58±2	29±3	13±3	0.2
	8	55±3	32±2	13±1	0.2	55±6	7±2	39±8	0.7
Kontroll-siRNA +AUY922	0	33±5	8±4	60±4	1.8	34±1	12±5	54±5	1.6
	8	32±3	8±2	60±5	1.9	39±6	4±2	58±8	1.5
siRNA4 +AUY922	0	40±7	7±3	53±7	1.3	35±1	18±7	47±7	1.3
	8	40±11	8±1	53±12	1.3	41±4	3±1	56±4	1.4
siRNA5 +AUY922	0	37±5	9±4	54±5	1.4	34±1	14±6	52±6	1.5
	8	38±10	8±3	54±8	1.4	40±3	5±4	55±6	1.4
GaMG-Kontroll-siRNA	0	55±2	33±6	13±6	0.2	57±4	26±2	17±3	0.3
	8	57±3	32±5	11±3	0.2	45±7	24±3	31±7	0.7
siRNA4	0	60±5	28±6	12±2	0.2	55±6	33±8	12±2	0.2
	8	58±5	31±7	11±3	0.2	48±2	25±2	27±1	0.6
siRNA5	0	61±5	26±3	13±3	0.2	51±7	35±10	14±4	0.3
	8	55±6	32±12	13±6	0.2	42±3	33±2	26±3	0.6
Kontroll-siRNA +AUY922	0	41±4	17±5	42±7	1.0	53±8	28±5	19±6	0.3
	8	39±5	14±1	47±5	1.2	48±5	26±6	26±8	0.5
siRNA4 +AUY922	0	43±1	20±8	37±7	0.9	54±6	24±5	22±5	0.4
	8	44±3	17±6	39±8	0.9	52±7	22±5	25±10	0.5
siRNA5 +AUY922	0	45±3	13±3	43±1	1.0	53±7	22±6	25±8	0.5
	8	44±2	16±5	40±6	0.9	55±4	23±3	24±8	0.5

Die Zahlen (MW±STABW) geben den prozentualen Anteil der Tumorzellen in den G1-, S- und G2-Phasen, woraus der G2/G1-Faktor berechnet wurde.

Wie in der Abb. 3.2.7 und Tabelle 3.2.3 ersichtlich, unterschieden sich die Zellzyklusverteilungen der Tumorzellen, die mit siRNA gegen HSP90 α transfiziert wurden, nicht von den Kontrollen, unabhängig von der Bestrahlung. In Kombination mit NVP-AUY922 zeigten die mit siRNA gegen HSP90 α transfizierten und mit NVP-AUY922 behandelten Tumorzellen ähnliche Zellzyklusstörungen wie die alleine mit NVP-AUY922 behandelten Proben, nämlich G2/M-Arrest und Depletion der S-Phase. Nach Kombination der Bestrahlung mit NVP-AUY922 und mit siRNA gegen HSP90 α waren die Zellzyklusverteilungen ähnlich wie nach einer Behandlung mit dem HSP90-Inhibitor und Bestrahlung.

3.2.7. Einfluss von HSP90 α -Knock-down, HSP90-Inhibition mittels NVP-AUY922 und Bestrahlung auf die Expression von Markerproteinen

Weiterhin wurde die Expression der Chaperone HSP90 α , HSP90 β , HSP70, der Klientenproteine von HSP90 RAF-1, AKT, CDK1 und CDK4 sowie des aktiven und inaktivierten PARP-Proteins 24 h nach der Bestrahlung mit 8 Gy mittels Western Blot analysiert. Repräsentative Western-Blot-Analysen sind in der Abb. 3.2.8 dargestellt.

Wie in der Abb. 3.2.8 zu sehen, reduzierte die Transfektion mit siRNA gegen HSP90 α die Expression von HSP90 α um etwa 50% in beiden Tumorzelllinien, ohne die Expression von HSP90 β oder HSP70 zu beeinflussen. Allerdings blieb die Expression der HSP90-Klientenproteine RAF-1, AKT, CDK1 und CDK4 unverändert. Als Apoptosemarker diente die Caspase-vermittelte Inaktivierung von PARP, ein DNA-Reparaturprotein, das sich durch den Nachweis eines 85 kDa-Fragments erkennen lässt. Wie in der Abb. 3.2.8 ersichtlich, konnte nach Transfektion mit siRNA gegen HSP90 α kein inaktiviertes PARP-Protein in den getesteten Tumorzelllinien detektiert werden. Gleichzeitig wurde eine gesteigerte Expression von PARP nach Transfektion der GaMG-Tumorzelllinie mit siRNA gegen HSP90 α detektiert (Abb. 3.2.8B), während die Expression von PARP in A549-Tumorzellen unverändert blieb (Abb. 3.2.8A).

Die Behandlung mit NVP-AUY922 führte wie erwartet zu einer gesteigerten Expression der stressinduzierbaren Chaperone HSP90 α und HSP70 in beiden Tumorzelllinien im Vergleich zu unbehandelten Proben (Abb. 3.2.8A und B), während die Expression der konstitutiv exprimierten Isoform HSP90 β unverändert blieb.

0 Gy						8 Gy						
Kontroll siRNA	siRNA4	siRNA5	Kontroll siRNA+ AUY	siRNA4 +AUY	siRNA5 +AUY	Kontroll siRNA	siRNA4	siRNA5	Kontroll siRNA+ AUY	siRNA4 +AUY	siRNA5 +AUY	
												HSP90α
0.7	0.4	0.3	0.9	0.5	0.4	0.7	0.4	0.4	0.9	0.5	0.3	
												HSP90β
0.3	0.4	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3	
												HSP70
1.0	1.1	1.0	1.5	1.4	1.5	1.0	1.0	1.0	1.5	1.5	1.5	
												RAF-1
1.0	1.1	1.2	0.05	0.05	0.05	1.2	1.3	1.2	0.05	0.05	0.05	
												AKT
1.7	1.6	1.7	1.4	1.4	1.3	1.8	1.7	1.7	1.4	1.4	1.4	
												CDK1
0.4	0.4	0.4	0.3	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3	
0.4	0.4	0.4	0.05	0.05	0.05	0.4	0.4	0.4	0.05	0.05	0.05	
												CDK4
1.0	1.0	1.1	0.6	0.6	0.6	1.1	1.0	1.1	0.6	0.6	0.5	
1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	
												PARP
0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	
n.d.	n.d.	n.d.	0.1	0.1	0.1	n.d.	n.d.	n.d.	0.1	0.1	0.1	inaktives PARP

Abb. 3.2.8A. Einfluss von HSP90α-Knock-down, HSP90-Inhibition mittels NVP-AUY922 und Bestrahlung auf die Expression diverser Markerproteine in A549-Tumorzellen. Die Expression von HSP90α, HSP90β, HSP70, RAF-1, AKT, CDK1 und CDK4 sowie PARP wurde mittels Western Blot 24 h nach der Bestrahlung analysiert. Das Verhältnis der integralen Dichte der Proteinbanden zu den β-Aktin Banden als Ladekontrolle ist in Zahlen angegeben. (Abb. modifiziert nach Stingl et al. 2012 und reproduziert mit freundlicher Genehmigung vom Springer Verlag).

0 Gy						8 Gy						
Kontroll siRNA	siRNA4	siRNA5	Kontroll siRNA+ AUY	siRNA4 +AUY	siRNA5 +AUY	Kontroll siRNA	siRNA4	siRNA5	Kontroll siRNA+ AUY	siRNA4 +AUY	siRNA5 +AUY	
												HSP90α
0.2	0.1	0.1	0.6	0.4	0.2	0.2	0.1	0.1	0.6	0.4	0.3	
												HSP90β
0.3	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3	0.3	n.d.	0.4	0.4	0.3	
												HSP70
1.0	1.1	1.1	1.8	1.7	1.8	1.0	1.1	1.0	1.9	1.8	2.0	
												RAF-1
0.4	0.4	0.4	0.05	0.05	0.05	0.4	0.4	0.4	0.05	0.05	0.05	
												AKT
1.1	1.0	1.2	0.5	0.6	0.5	1.0	1.2	1.1	0.6	0.6	0.5	
												CDK1
0.1	0.1	0.1	n.d.	n.d.	n.d.	0.1	0.1	0.1	n.d.	n.d.	n.d.	
												CDK4
0.4	0.4	0.4	0.1	0.1	0.1	0.4	0.4	0.4	0.1	0.1	0.1	
0.7	0.8	0.7	0.7	0.7	0.8	0.7	0.7	0.7	0.8	0.8	0.8	
												PARP
0.1	0.4	0.4	0.8	0.9	0.7	0.2	0.2	0.4	1.0	1.0	0.8	inaktives PARP
n.d.	n.d.	n.d.	0.2	0.2	0.2	n.d.	n.d.	n.d.	0.4	0.3	0.3	

Abb. 3.2.8B. Einfluss von HSP90α-Knock-down, HSP90-Inhibition mittels NVP-AUY922 und Bestrahlung auf die Expression diverser Markerproteine in GaMG-Tumorzellen. Für Legende siehe Abb. 3.2.8A

Die Inkubation mit NVP-AUY922 führte zu geringerer Expression der HSP90-Klientenproteine RAF-1, AKT, CDK1 und CDK4 sowie zum Nachweis von inaktiviertem PARP.

Ein wichtiges Ergebnis war, dass die Transfektion mit siRNA gegen HSP90 α gefolgt von HSP90-Inhibition mittels NVP-AUY922 die Hochregulation von HSP90 α nach Einwirkung von NVP-AUY922 in beiden Tumorzelllinien reduzierte. Wie in Abb. 3.2.8A ersichtlich, war die Expression von HSP90 α in den mit siRNA gegen HSP90 α transfizierten und mit NVP-AUY922 behandelten A549-Tumorzellen um den Faktor 1,8, im Vergleich zu der Expression von HSP90 α nach alleiniger NVP-AUY922-Behandlung, reduziert. In den GaMG-Tumorzellen war die Expression von HSP90 α um den Faktor 2 herunterreguliert (Abb. 3.2.8B). Allerdings hatte die Kombination des HSP90 α -Knock-downs mit HSP90-Inhibition keinen zusätzlichen Effekt auf die Expression der getesteten Proteine im Vergleich zu alleiniger HSP90-Inhibition. Die zusätzliche Bestrahlung änderte die Expression der getesteten Markerproteine (HSP90 α , HSP90 β , HSP70, RAF-1, AKT, CDK1, CDK4, PARP und inaktivem PARP) ebenfalls nicht.

3.2.8. Einfluss von HSP90 α -Knock-down, HSP90-Inhibition mittels NVP-AUY922 und Bestrahlung auf die DNA-Schäden

Die Tumorzelllinien wurden mit siRNA transfiziert, mit NVP-AUY922 behandelt und mit 8 Gy bestrahlt. Dreißig Minuten und 24 h nach der Bestrahlung wurde die Expression von γ H2AX als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche durchflusszytometrisch gemessen. Repräsentative FACS-Analysen von unbestrahlten (ungefüllte Histogramme) und bestrahlten (gefüllte Histogramme) Tumorzelllinien sind in der Abb. 3.2.9 dargestellt.

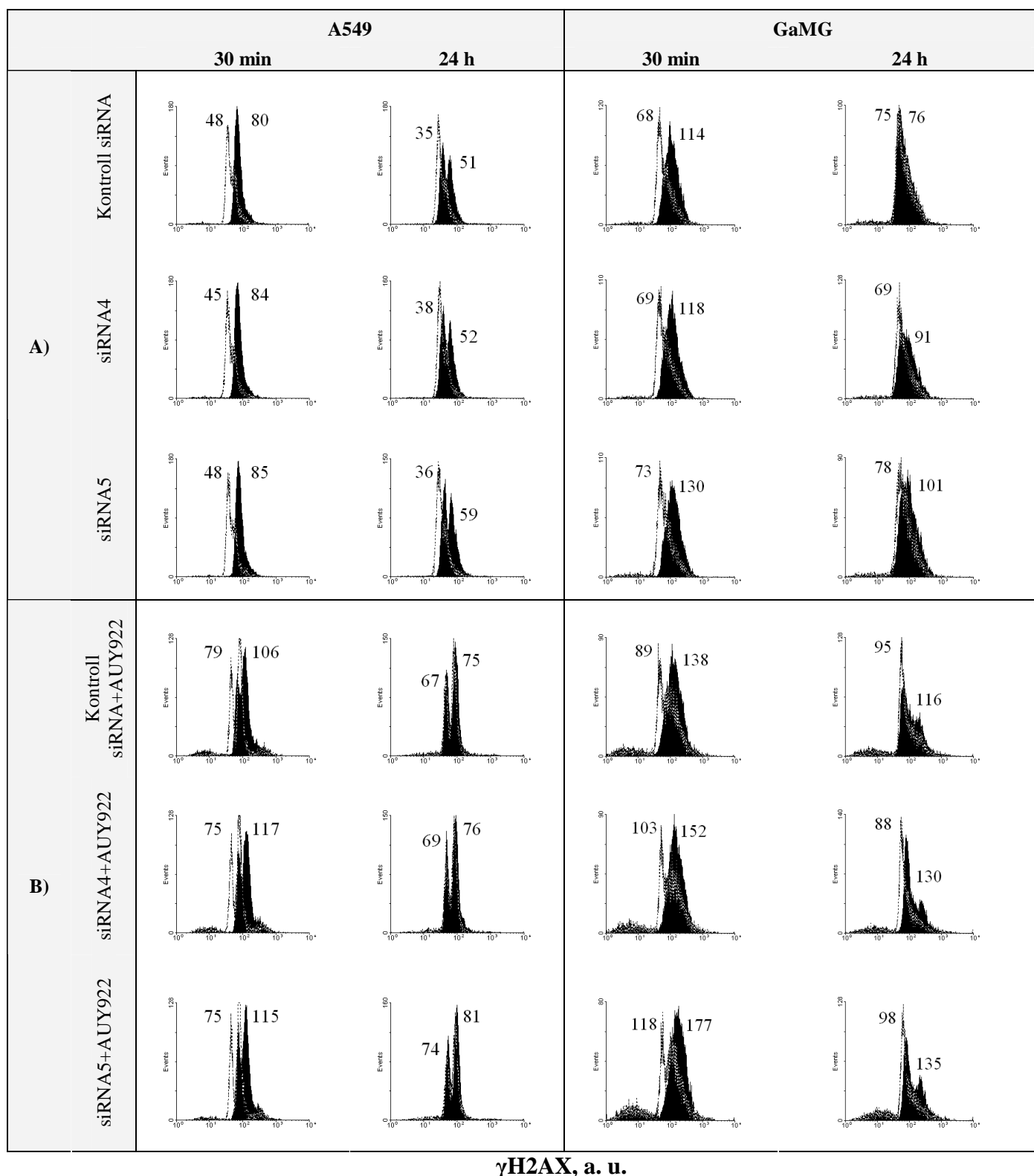


Abb. 3.2.9. Expression von Histon γ H2AX als DNA-DSB-Marker in transfizierten A549- und GaMG-Tumorzellen, die unbehandelt blieben (A) oder mit NVP-AUY922-behandelt wurden (B), in Kombination mit Bestrahlung. Transfizierte, mit NVP-AUY922 behandelte und zusätzlich bestrahlte Tumorzellen wurden 30 min und 24 h nach der Bestrahlung fixiert, mit FITC-gekoppelten anti- γ H2AX Antikörpern markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die mittlere Expression von γ H2AX in unbestrahlten (ungefüllte Histogramme) und bestrahlten (gefüllte Histogramme) Tumorzellen ist durch die Zahlen angegeben. (Abb. modifiziert nach Stingl et al. 2012 und reproduziert mit freundlicher Genehmigung vom Springer Verlag).

Wie in der Abb. 3.2.9A (30 min-Werte) gezeigt, hatte der HSP90 α -Knock-down keinen Einfluss auf die Expression von γ H2AX und erhöhte nicht den γ H2AX-Gehalt in den bestrahlten Proben.

Ein weiteres Ergebnis war, dass der HSP90 α -Knock-down in Kombination mit HSP90-Inhibition keine zusätzlichen DNA-Schäden in der A549-Tumorzelllinie verursachte. Wie in der Abb. 3.2.9B (ungefüllte Histogramme, 30 min-Werte) ersichtlich, war die Expression von γ H2AX in den A549-Tumorzellen, die mit siRNA gegen HSP90 α transfiziert und mit NVP-AUY922 behandelt wurden, ähnlich wie in den Proben, die nur mit NVP-AUY922 behandelt wurden. Dagegen wurde in den GaMG-Tumorzellen ein moderater Anstieg des γ H2AX-Gehalts (um den Faktor 1.3) nach Transfektion mit siRNA5 gegen HSP90 α und Behandlung mit NVP-AUY922 gemessen.

Dreißig Minuten nach Bestrahlung blieb das Ausmaß der DNA-Schäden nach HSP90-Inhibition in der A549-Tumorzelllinie unverändert, unabhängig davon, ob die Zellen transfiziert wurden (Abb. 3.2.9A, gefüllte Histogramme, 30 min-Werte). Ein moderater Anstieg des γ H2AX-Gehalts (um den Faktor 1.3) wurde in bestrahlten GaMG-Tumorzellen nach Transfektion mit siRNA5 gegen HSP90 α und Behandlung mit NVP-AUY922 im Vergleich zu alleiniger HSP90-Inhibition detektiert (Abb. 3.2.9B, gefüllte Histogramme, 30 min-Werte).

Nach Kombination der Bestrahlung mit HSP90 α -Knock-down wurden zusätzliche DNA-Schäden um einen Faktor von 1.2 bis 1.3 nur in der GaMG-Tumorzelllinie im Vergleich zu alleiniger Bestrahlung gemessen (Abb. 3.2.9A, gefüllte Histogramme, 24h-Werte). Die DNA-Restschäden nach HSP90 α -Knock-down, HSP90-Inhibition und Bestrahlung im Vergleich zu HSP90-Inhibition und Bestrahlung waren in den A549-Tumorzellen gleich, und etwas höher (um den Faktor 1.1 bis 1.2) in den GaMG-Tumorzellen (Abb. 3.2.9B, gefüllte Histogramme, 24 h-Werte).

Wie in diesem Kapitel gezeigt wurde, konnte eine circa 50%ige Herunterregulierung der HSP90 α -Expression mittels siRNA in beiden getesteten Tumorzelllinien A549 und GaMG erreicht werden. Allerdings hatte die Unterdrückung der stressinduzierbaren Isoform von HSP90 α mittels siRNAs keinen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit der Tumorzelllinien. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die radiosensibilisierende Wirkung von NVP-AUY922 durch den siRNA-vermittelten Knock down von HSP90 α , gefolgt von HSP90-Inhibition und Bestrahlung in den beiden untersuchten humanen Tumorzelllinien nicht erhöht werden konnte. Eine weitere Möglichkeit um die Stressantwort nach HSP90-Inhibition zu vermindern wird im nächsten Kapitel beschrieben.

3.3. Einfluss der Suppression der Stressantwort nach HSP90-Inhibition mittels des HSF-1-Inhibitors KNK437 auf die Strahlenantwort humaner Tumorzelllinien

Eine weitere Strategie, um die Stressantwort nach HSP90-Inhibition zu unterdrücken, ist die Inhibition des Transkriptionsfaktors für die Hitzeschockgene allgemein (HSF-1) über die Benzyliden-Laktamverbindung KNK437 (Yokota et al. 2000; Ohnishi et al. 2004).

Des Weiteren wurde die Hochregulation der Hitzeschockproteine HSP90 und HSP70 gleichzeitig in den Tumorzelllinien A549 und GaMG mittels KNK437 unterdrückt, um die NVP-AUY922-induzierte Radiosensibilisierung zu erhöhen.

3.3.1. Bestimmung der Zellviabilität nach Behandlung mit KNK437 allein oder in Kombination mit NVP-AUY922

Zuerst wurde die optimale Konzentration von KNK437 alleine und in Kombination mit NVP-AUY922 bestimmt. Basierend auf bereits vorhandene Daten aus der Literatur (Yokota et al. 2000; Ohnishi et al. 2004; Sakurai et al. 2005; Guo et al. 2005), wurden beide Tumorzelllinien mit verschiedenen mikromolaren Konzentrationen KNK437 (10 – 5000 μM) für 24 h behandelt. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels ATP-Test bestimmt, wobei der ATP-Gehalt als Maß für die Lebensfähigkeit der Zellen diente.

Die relative Zellviabilität im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen ist in Abhängigkeit der Konzentration der Testsubstanzen in der Abb. 3.3.1 dargestellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit 50 bis 5000 μM KNK437 die Zellviabilität der A549-Tumorzelllinie auf circa 80% reduzierte. Die Zellviabilität der GaMG-Tumorzelllinie wurde bereits ab 10 μM KNK437 auf 80% reduziert. Die Konzentrationen von 50 bis 5000 μM KNK437 reduzierten die Viabilität der GaMG-Tumorzelllinie um bis zu 50%.

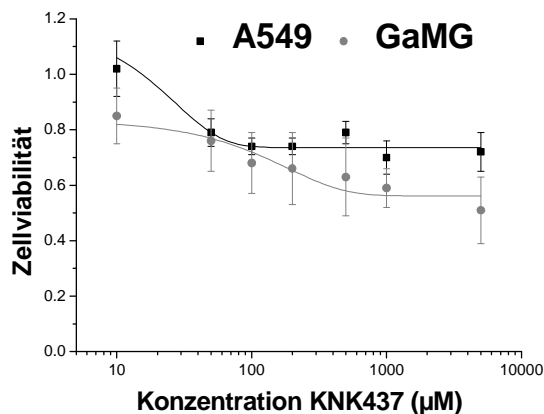


Abb. 3.3.1. Zellviabilität der Tumorzelllinien A549 und GaMG nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an KNK437. Die Tumorzellen wurden für 24 h mit einer Verdünnungsreihe von 10, 50, 100, 200, 500, 1000 und 5000 μM KNK437 behandelt und danach die Zellviabilität mittels ATP-Test bestimmt. Jeder Messpunkt ist ein Mittelwert aus drei Versuchen mit den entsprechenden Standardabweichungen und stellt den Anteil der vitalen Tumorzellen nach jeweiliger Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen dar.

Weiterhin wurde die optimale Konzentration an KNK437 in Kombination mit NVP-AUY922 bestimmt. Dazu wurden beide Tumorzelllinien simultan mit einer Konzentrationsreihe von KNK437 (10 - 5000 μM) behandelt. Zusätzlich wurde je 50 bzw. 200 nM NVP-AUY922 zugegeben und anschließend die Zellviabilität mittels ATP-Test gemessen (Abb. 3.3.2).

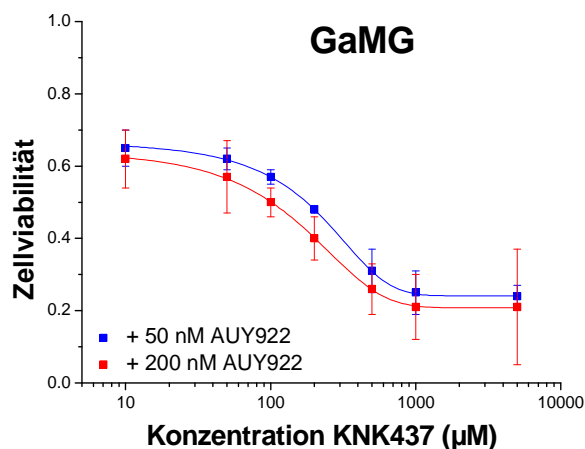
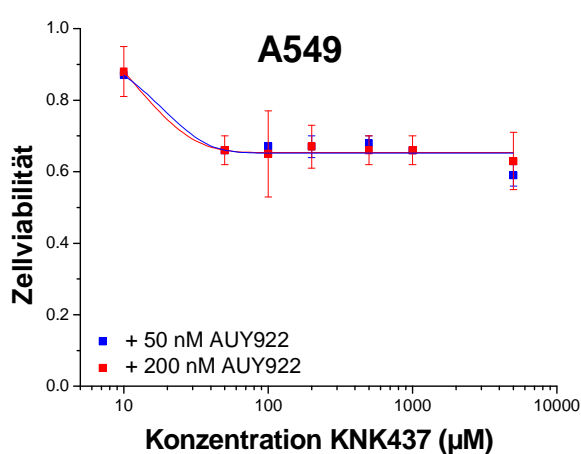


Abb. 3.3.2. Zellviabilität der Tumorzelllinien A549 und GaMG nach Behandlung mit NVP-AUY922 und KNK437. Die Tumorzellen wurden mit 50 nM (blau) oder 200 nM (rot) NVP-AUY922 sowie mit 10 bis 5000 μM KNK437 für 24 h behandelt und danach die Zellviabilität mittels ATP-Test bestimmt. Jeder Messpunkt ist ein Mittelwert aus jeweils zwei Versuchen mit den entsprechenden Standardabweichungen und stellt den Anteil der vitalen Tumorzellen nach jeweiliger Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen dar.

Wie aus Abb. 3.3.2 ersichtlich, wurde die Zellviabilität der A549-Tumorzelllinie nach Behandlung mit NVP-AUY922 und 10 μM KNK437 auf etwa 90% reduziert und erreichte ein Plateau bei etwa 65% nach Behandlung mit KNK437-Konzentrationen zwischen 50 und

5000 μM , unabhängig von der NVP-AUY922-Konzentration. In der GaMG-Tumorzelllinie wurde eine Reduktion der Zellviabilität auf 65% nach Behandlung mit NVP-AUY922 und 10 μM KNK437 gemessen. Ab einer KNK437-Konzentration von 50 μM fiel die Zellviabilität der mit KNK437 und NVP-AUY922 behandelten GaMG-Tumorzellen bis auf 20% ab.

Für weitere Experimente wurden zwei Kombinationen der Substanzen ausgewählt: 50 nM NVP-AUY922 und 50 μM KNK437 (65% Zellviabilität für beide Tumorzelllinien) sowie 200 nM NVP-AUY922 und 100 μM KNK437 (bei einer Zellviabilität von 50% für GaMG und von 65% für A549).

3.3.2 Einfluss der Behandlung mit KNK437 auf die NVP-AUY922-vermittelte Radiosensibilisierung

Der Einfluss der simultanen Behandlung mit beiden Substanzen auf die Strahlenantwort der A549- und GaMG-Tumorzellen wurde mittels Kolonietests untersucht. Die Überlebenskurven der mit KNK437 und NVP-AUY922 behandelten Tumorzelllinien in Abhängigkeit der Bestrahlungsdosis sind in der Abb. 3.3.3 dargestellt.

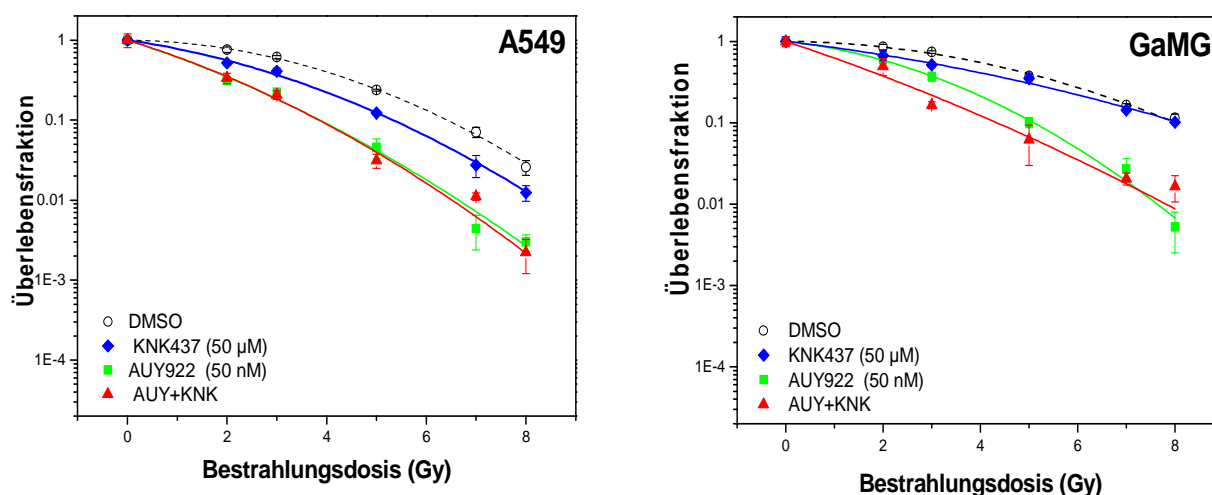


Abb. 3.3.3A. Koloniebildungsfähigkeit der bestrahlten A549- und GaMG-Tumorzelllinien nach Behandlung mit KNK437 (blau), mit NVP-AUY922 (grün) oder mit beiden Substanzen (rot). Die Dosis-Überlebenskurven der Tumorzellen in Abhängigkeit von der Strahlendosis (0 bis 8 Gy) wurden nach dem linear-quadratischen Modell ermittelt. Jeder Datenpunkt stellt die Überlebensfraktionen klonogener Tumorzellen im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen dar und ist ein Mittelwert aus jeweils vier ausgezählten Petrischalen mit den entsprechenden Standardfehlern.

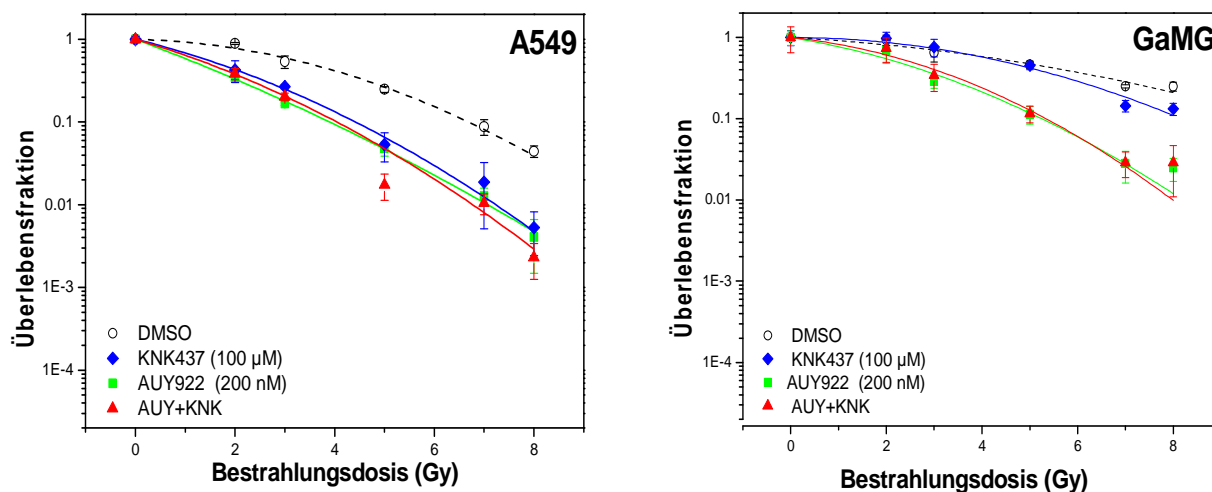


Abb. 3.3.3B. Koloniebildungsfähigkeit der bestrahlten A549- und GaMG-Tumorzelllinien nach Behandlung mit KNK437 (blau), mit NVP-AUY922 (grün) oder mit beiden Substanzen (rot). Legende wie in Abb. 3.3.3A.

Wie in der Abb. 3.3.3A (blaue Linie) ersichtlich, verlief die Zellüberlebenskurve der A549-Tumorzelllinie nach Kombination der Bestrahlung mit 50 μM KNK437 steiler als in der Kontrolle (schwarze Linie). Nach Kombination der Bestrahlung mit 100 μM KNK437 (Abb. 3.3.3B, blaue Linie) zeigte die Zellüberlebenskurve der A549-Tumorzelllinie einen ähnlichen Verlauf wie nach Behandlung mit NVP-AUY922 (Abb. 3.3.4B, grüne Linie). Diese Ergebnisse weisen auf eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit nach Kombination der Bestrahlung mit KNK437 in dieser Tumorzelllinie hin, wobei die radiosensibilisierende Wirkung von KNK437 mit höherer Konzentration des Inhibitors zunahm (Abb. 3.3.3A und B, linke Abbildungen). Im Gegensatz dazu blieb die Strahlenempfindlichkeit der GaMG-Tumorzelllinie nach Behandlung mit KNK437 unverändert, unabhängig von der KNK437-Konzentration (Abb. 3.3.3A und B, rechte Abbildungen, blaue Linien).

Nach simultaner Behandlung mit KNK437 und NVP-AUY922 (Abb. 3.3.3A und B, rote Linien) war der radiosensibilisierende Effekt von NVP-AUY922 (grüne Linie) in beiden Tumorzelllinien nicht erhöht.

Drei Überlebenskurven wie aus Abb. 3.3.3 wurden quantifiziert und die Überlebensfraktion der unbestrahlten Tumorzellen (PE-Werte) sowie die strahlenbiologischen Parameter SF2 und D10 nach Kombination der Bestrahlung mit NVP-AUY922 und KNK437 in Tabelle 3.3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.3.1. Plattiereffizienz sowie strahlenbiologische Parameter SF2 und D10 der Tumorzellen A549 und GaMG nach Kombination der Bestrahlung mit KNK437 und NVP-AUY922 (MW \pm STABW).

Behandlung	PE	SF2	D₁₀ (Gy)
A549–DMSO	0.47 \pm 0.11	0.68 \pm 0.09	6.1 \pm 0.3
+KNK437 50 μ M	0.42 \pm 0.08	0.50 \pm 0.06	4.8 \pm 0.4
+AUY922 50 nM	0.38 \pm 0.05	0.33 \pm 0.04	3.7 \pm 0.3
+KNK+AUY	0.25 \pm 0	0.30 \pm 0.05	3.3 \pm 0.4
A549–DMSO	0.47 \pm 0.08	0.65 \pm 0.18	6.4 \pm 0.4
+KNK437 100 μ M	0.25 \pm 0.02	0.35 \pm 0.12	4.3 \pm 0.2
+AUY922 200 nM	0.34 \pm 0.06	0.32 \pm 0.02	3.7 \pm 0.3
+KNK+AUY	0.28 \pm 0.06	0.33 \pm 0.01	3.7 \pm 0.1
GAMG–DMSO	0.19 \pm 0.05	0.72 \pm 0.14	8.7 \pm 1.1
+KNK437 50 μ M	0.16 \pm 0.06	0.74 \pm 0.07	8.7 \pm 0.6
+AUY922 50 nM	0.06 \pm 0.04	0.60 \pm 0.05	4.9 \pm 0.7
+KNK+AUY	0.03 \pm 0.02	0.48 \pm 0.01	4.1 \pm 0.2
GAMG–DMSO	0.14 \pm 0.06	0.74 \pm 0.11	9.4 \pm 1.1
+KNK437 100 μ M	0.13 \pm 0.09	0.82 \pm 0.08	8.5 \pm 0.4
+AUY922 200 nM	0.07 \pm 0.04	0.56 \pm 0.02	5.3 \pm 0.1
+KNK+AUY	0.04 \pm 0.02	0.55 \pm 0.08	5.8 \pm 0.7

Wie in der Tabelle 3.3.1 gezeigt, blieb der PE-Wert nach alleiniger Behandlung der A549-Tumorzelllinie mit 50 μ M KNK437 unverändert, während die alleinige Behandlung mit 100 μ M KNK437 die Plattiereffizienz um den Faktor 1.9 im Vergleich zur Kontrolle reduzierte. In Kombination mit der Bestrahlung reduzierte die Behandlung der A549-Tumorzellen mit 50 μ M KNK437 den SF2-Wert um den Faktor 1.4 und den D10-Wert um den Faktor 1.3 im Vergleich zu alleiniger Bestrahlung. Nach Kombination der Bestrahlung mit 100 μ M KNK437 wurde ein um den Faktor 1.9 niedrigerer SF2-Wert sowie ein um den Faktor 1.5 niedrigerer D10-Wert im Vergleich zu alleiniger Bestrahlung in der A549-Tumorzelllinie beobachtet. Diese Ergebnisse deuten auf eine radiosensibilisierende Wirkung von KNK437 in der A549-Tumorzelllinie hin.

Dagegen hatte die alleinige Behandlung mit KNK437 keinen Einfluß auf die Plattiereffizienz der GaMG-Tumorzelllinie (Tabelle 3.3.1, GaMG). Außerdem wurde keine Reduktion der SF2- und D10-Werte in den mit KNK437 behandelten und zusätzlich bestrahlten GaMG-Tumorzellen im Vergleich zu alleiniger Bestrahlung verzeichnet.

Wie außerdem in der Tabelle 3.3.1 zu sehen, führte die Kombination der Bestrahlung mit beiden Substanzen, in keiner der getesteten Tumorzelllinien, zu keiner signifikanten Reduktion der SF2 und D10-Werte im Vergleich zu alleiniger Behandlung mit NVP-AUY922.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Behandlung mit KNK437 eine radiosensibilisierende Wirkung nur in der A549-Tumorzelllinie zeigte. Allerdings wurde die Radiotoxizität von NVP-AUY922 nach simultaner Behandlung der getesteten Tumorzelllinien mit NVP-AUY922 und KNK437 nicht erhöht.

3.3.3. Einfluss der Behandlung mit KNK437 allein oder in Kombination mit NVP-AUY922 und Bestrahlung auf die Expression diverser Markerproteine

Weiterhin wurde die Expression diverser Proteine mittels Western Blot in den A549- und GaMG-Tumorzelllinien nach simultaner Behandlung mit beiden Inhibitoren und anschließender Bestrahlung untersucht. Repräsentative Western-Blot-Analysen beider Tumorzelllinien 30 min nach der Bestrahlung sind in der Abb. 3.3.4, sowie 24 h nach der Bestrahlung in der Abb. 3.3.5 dargestellt.

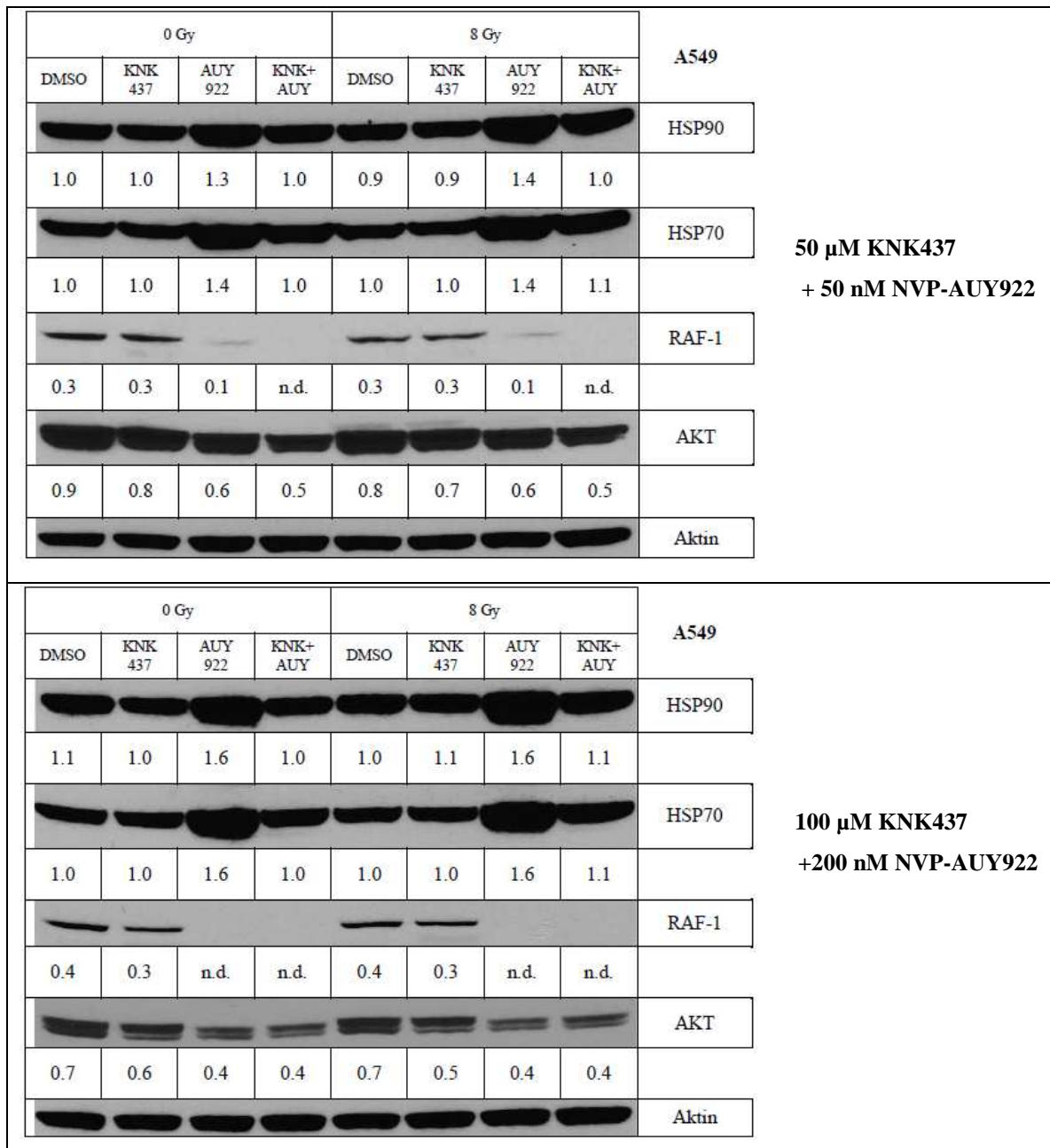


Abb. 3.3.4A. Einfluss von KNK437, HSP90-Inhibition mittels NVP-AUY922 und Bestrahlung auf die Expression diverser Markerproteine in der A549-Tumorzelllinie. Die Tumorzellen wurden mit KNK437, NVP-AUY922 oder beiden Substanzen behandelt, dann bestrahlt. Dreißig Minuten nach Bestrahlung wurden Zellextrakte präpariert. Die Abbildung zeigt je eine repräsentative Western-Blot-Analyse für die Expression von HSP90, HSP70, der HSP90-Klientenproteine RAF-1 und AKT. Das Verhältnis der integralen Dichte der Proteinbanden zu den β -Aktin Banden als Ladekontrolle ist durch die Zahlen angegeben.

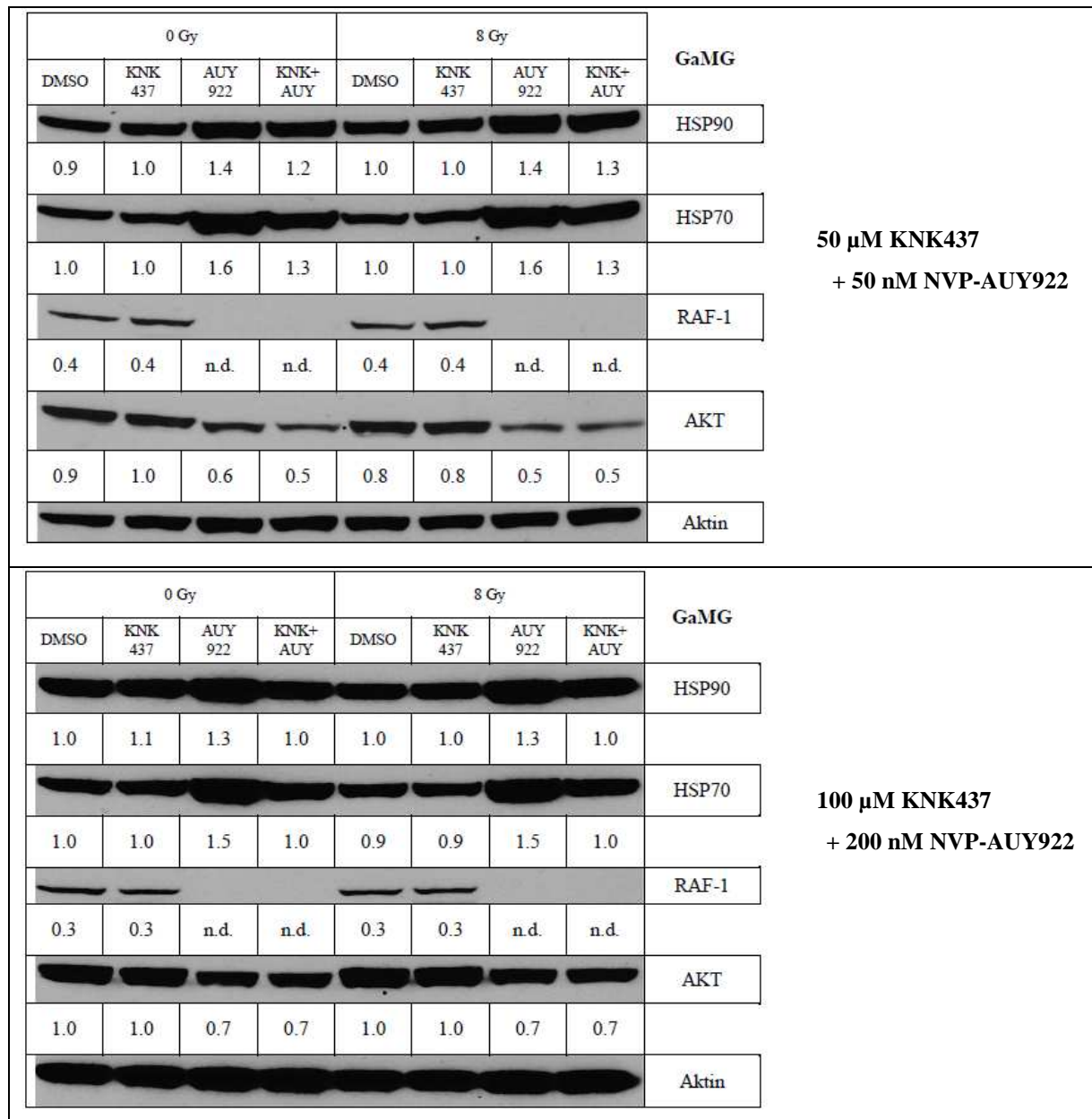


Abb. 3.3.4B. Einfluss von KNK437, HSP90-Inhibition mittels NVP-AUY922 und Bestrahlung auf die Expression diverser Markerproteine in der GaMG-Tumorzelllinie. Für Legende siehe Abb. 3.3.4A.

Wie in der Abb. 3.3.4A und B gezeigt, hatte die Behandlung mit 50 µM oder 100 µM KNK437 keinen Einfluss auf die Expression von HSP90, HSP70, RAF-1 und AKT in beiden Tumorzelllinien, unabhängig von der verwendeten KNK437-Konzentration.

Die Behandlung mit NVP-AUY922 führte zu einer gesteigerten Expression von HSP70 und HSP90 in beiden Tumorzelllinien (Abb. 3.3.4A und B). Außerdem induzierte die Behandlung mit NVP-AUY922 die Reduktion der Menge an HSP90-Klientenproteinen AKT und RAF-1 in beiden Tumorzelllinien.

Ein wichtiges Ergebnis war, dass die Hochregulation von HSP90 und HSP70 nach simultaner Behandlung mit KNK437 und NVP-AUY922 im Vergleich zu alleiniger NVP-AUY922-Behandlung unterdrückt wurde (Abb. 3.3.4A und B). Dabei zeigten die mit beiden Inhibitoren behandelten A549-Tumorzellen eine verminderte Expression von HSP90 und HSP70 um den Faktor 1.3 (Abb. 3.3.4A, oberer Abschnitt) bzw. Faktor 1.6 (Abb. 3.3.4A, unterer Abschnitt) im Vergleich zu den mit NVP-AUY922 behandelten Proben. Die GaMG-Tumorzellen zeigten eine reduzierte Expression um einen Faktor von 1.3 bis 1.4 für HSP90 und um einen Faktor von 1.5 bis 1.6 für HSP70 im Vergleich zu den mit NVP-AUY922 behandelten Proben (Abb. 3.3.4B).

Wie außerdem in der Abb. 3.3.4A und B gezeigt, blieb die Expression von RAF-1 und AKT in beiden Tumorzelllinien nach simultaner Behandlung mit beiden Substanzen ähnlich wie nach alleiniger Behandlung mit NVP-AUY922.

Dreißig Minuten nach Bestrahlung blieb die Expression von HSP90, HSP70, RAF-1 und AKT unverändert.

Weiterhin wurde die Expression der Proteine HSP90, HSP70, RAF-1 und AKT in den A549- und GaMG-Tumorzelllinien 24 h nach der Bestrahlung untersucht (Abb. 3.3.5). Die Tumorzellen wurden mit beiden Substanzen behandelt, danach mit 8 Gy bestrahlt und bis zur Analyse für weitere 24 h in frischem DMEM inkubiert. Die Abb. 3.3.5 stellt repräsentative Western-Blot-Analysen 24 h nach der Bestrahlung dar.

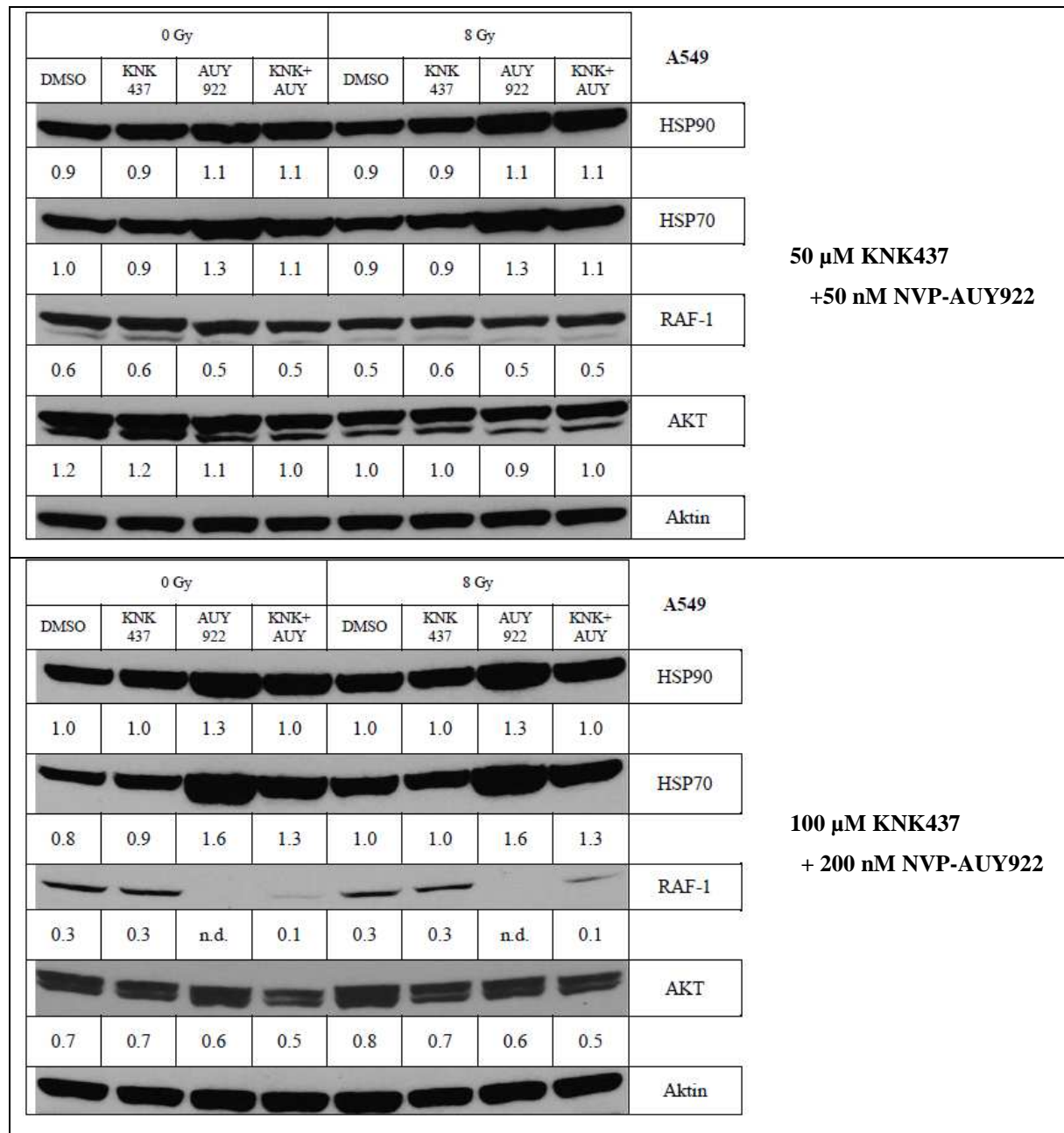


Abb. 3.3.5A. Expression diverser Markerproteine nach Behandlung der A549 Tumorzelllinie mit NVP-AUY922 und KNK437, 24 h nach der Bestrahlung. Die Tumorzellen wurden mit KNK437, NVP-AUY922 oder beiden Substanzen behandelt, dann bestrahlt. Bis zur Analyse wurden die Tumorzellen in frischem DMEM ohne Inhibitoren inkubiert. Vierundzwanzig Stunden nach Bestrahlung wurden Zellextrakte präpariert. Die Abbildung zeigt je eine repräsentative Western-Blot-Analyse für die Expression von HSP90, HSP70 sowie der HSP90-Klientenproteine RAF-1 und AKT. Das Verhältnis der integralen Dichte der Proteinbanden zu den β -Aktin Banden als Ladekontrolle ist durch die Zahlen angegeben

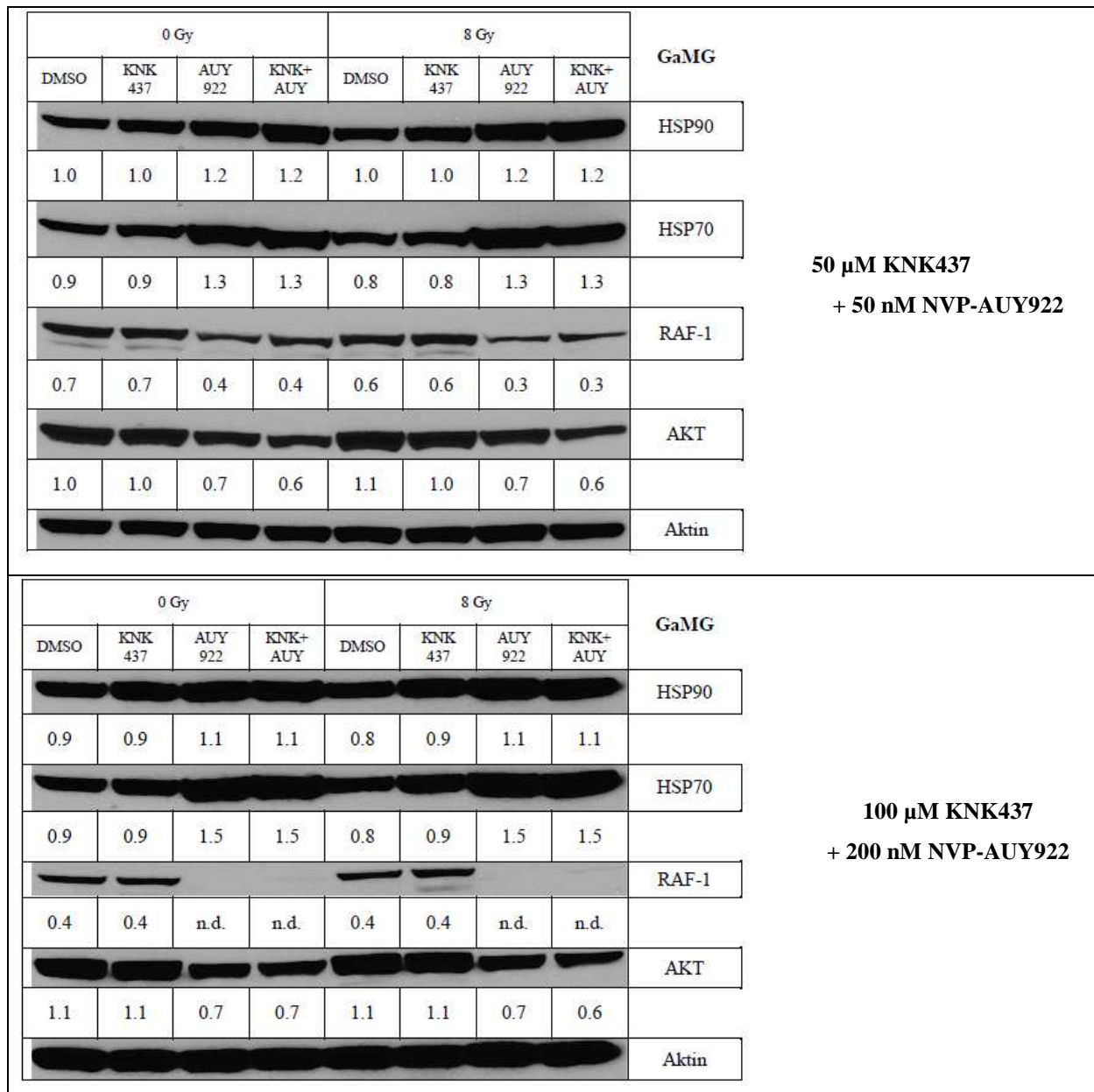


Abb. 3.3.5B. Expression diverser Markerproteine nach Behandlung der GaMG Tumorzelllinie mit NVP-AUY922 und KNK437, 24 h nach der Bestrahlung. Legende wie in Abb. 3.3.4A.

Wie in der Abb. 3.3.5A und B ersichtlich, blieb die Expression der Hitzeschockproteine HSP90 und HSP70 sowie die der HSP90-Klientenproteine AKT und RAF-1 24 h nach dem Auswaschen von KNK437 in beiden Tumorzelllinien unverändert.

Die NVP-AUY922-vermittelte Hochregulation von HSP70, die bereits unmittelbar nach Behandlung beobachtet wurde (Abb. 3.3.4), konnte 24 h nach dem Auswaschen des HSP90-Inhibitors in beiden Tumorzelllinien nachgewiesen werden. Dabei wurde eine erhöhte HSP70-Expression in den mit NVP-AUY922 behandelten A549-Tumorzellen detektiert: um einen Faktor von 1.3 nach Behandlung mit 50 nM NVP-AUY922 (Abb. 3.3.5A, oberer Abschnitt) und um einen Faktor von 2 nach Behandlung mit 200 nM NVP-AUY922 (Abb. 3.3.5A, unterer Abschnitt) im Vergleich zur Kontrolle. In der GaMG-Tumorzelllinie wurde eine gesteigerte Expression von HSP70 um den Faktor 1.5 nach Behandlung mit 50 nM NVP-AUY922 (Abb. 3.3.5B, oberer Abschnitt) und um den Faktor 1.7 nach Behandlung mit 200 nM NVP-AUY922 (Abb. 3.3.5B, unterer Abschnitt) im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Die Expression von HSP90 war um den Faktor 1.1 bis 1.3 in der A549-Tumorzelllinie erhöht (Abb. 3.3.5A) und in der GaMG-Tumorzelllinie um den Faktor 1.1 bis 1.2 (Abb. 3.3.5B) im Vergleich zur Kontrolle. Gleichzeitig konnte die Depletion der HSP90-Klientenproteine RAF-1 und AKT, die unmittelbar nach der Inkubation mit NVP-AUY922 detektiert werden konnte (Abb. 3.3.4), noch 24 h nach dem Auswaschen des HSP90-Inhibitors in unterschiedlichem Maß, je nach Konzentration und Tumorzelllinie, nachgewiesen werden.

Obwohl unmittelbar nach simultaner Behandlung mit beiden Inhibitoren die NVP-AUY922-vermittelte Hochregulation von HSP90 und HSP70 in beiden Tumorzelllinien unterdrückt werden konnte (Abb. 3.3.4), war der inhibierende Effekt von KNK437 reversibel, sobald die Substanz ausgewaschen wurde. Wie in der Abb. 3.3.5A im oberen Abschnitt zu sehen, zeigte die simultane Behandlung der A549-Tumorzelllinie mit 50 nM NVP-AUY922 und 50 μ M KNK437 24 h nach dem Auswaschen der Substanzen keinen Effekt auf die Expression von HSP90 im Vergleich zu alleiniger HSP90-Inhibition, während die Expression von HSP70 weiterhin um den Faktor 1.2 im Vergleich zu alleiniger Behandlung mit NVP-AUY922 herunterreguliert wird. Die simultane Behandlung der A549-Tumorzelllinie mit höheren Konzentrationen (Abb. 3.3.5A, unterer Abschnitt) inhibierte die NVP-AUY922-vermittelte Hochregulation von HSP90 und HSP70 bis zu 24 h nach dem Auswaschen der Inhibitoren. Dabei war die Expression von HSP90 nach simultaner Behandlung der A549-Tumorzelllinie um den Faktor 1.3 und die Expression von HSP70 um den Faktor 1.2 herunterreguliert, im Vergleich zu alleiniger NVP-AUY922-Behandlung. Im Gegensatz zur A549-Tumorzelllinie, konnte in der GaMG-Tumorzelllinie 24 h nach dem Auswaschen der Inhibitoren keine Unterdrückung der NVP-AUY922-vermittelten

Hochregulation von HSP90 und HSP70 mittels KNK437 mehr erreicht werden, unabhängig von der verwendeten Konzentration an KNK437. Wie in Abb. 3.3.5B gezeigt, wurde die gleiche Expression von HSP90 oder HSP70 in der GaMG-Tumorzelllinie gemessen, unabhängig davon, ob die Tumorzellen nur mit NVP-AUY922 oder mit beiden Substanzen behandelt wurden.

Die Expression der HSP90-Klientenproteine AKT und RAF-1 blieb 24 h nach dem Auswaschen der Inhibitoren unverändert, unabhängig davon, ob die Tumorzellen mit beiden Substanzen oder nur mit NVP-AUY922 behandelt wurden (Abb. 3.3.5A und B).

Bis zu 24 h nach der Bestrahlung blieb die Expression der untersuchten Proteine HSP90, HSP70, RAF-1 und AKT unverändert.

3.3.4. Einfluss der Behandlung mit KNK437 allein oder in Kombination mit NVP-AUY922 und Bestrahlung auf den Zellzyklus

Die A549- und GaMG-Tumorzellen wurden mit KNK437 und NVP-AUY922 behandelt und mit 8 Gy bestrahlt. Nach Bestrahlung wurden die Tumorzellen bis zur Analyse in frischem DMEM inkubiert. Dreißig Minuten und 24 h nach der Bestrahlung wurden die Zellen fixiert, mit PI gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 3.3.6A-D).

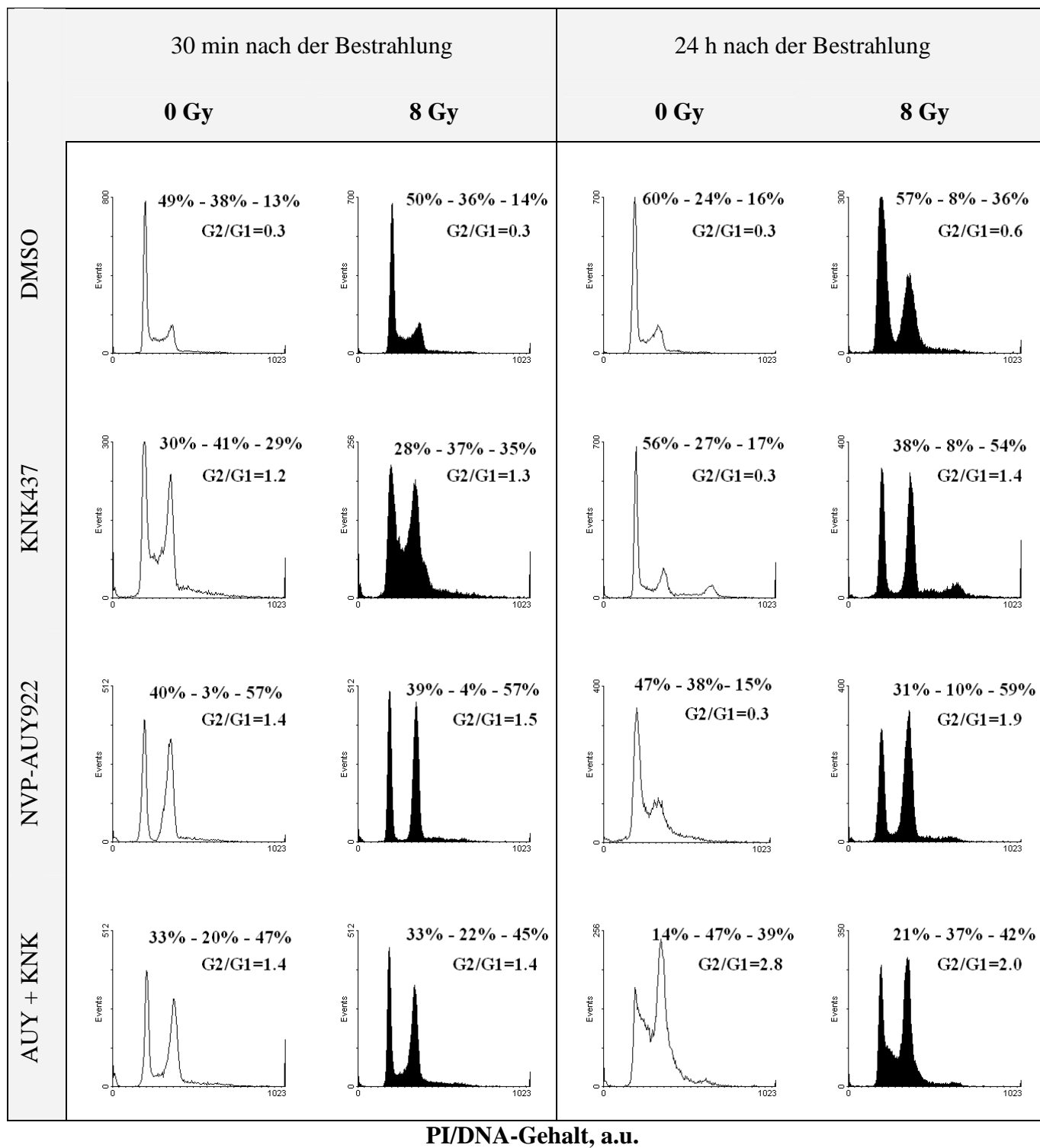


Abb. 3.3.6A. Zellzyklusverteilung der A549-Tumorzellen nach Behandlung mit 50 μ M KNK437 und 50 nM NVP-AUY922, 30 min und 24 h nach der Bestrahlung. Die Tumorzellen wurden mit den Inhibitoren behandelt, mit 8 Gy bestrahlt, anschließend fixiert und mit PI gefärbt. Die Analyse des DNA-Gehalts wurde durchflusszytometrisch im linearen Modus durchgeführt. Gezeigt sind repräsentative DNA-Histogramme der unbestrahlten (ungefüllte Histogramme) und bestrahlten (gefüllte Histogramme) Tumorzellen. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der Tumorzellen in den G1-, S- und G2-Phasen an, woraus der G2/G1-Faktor berechnet wurde.

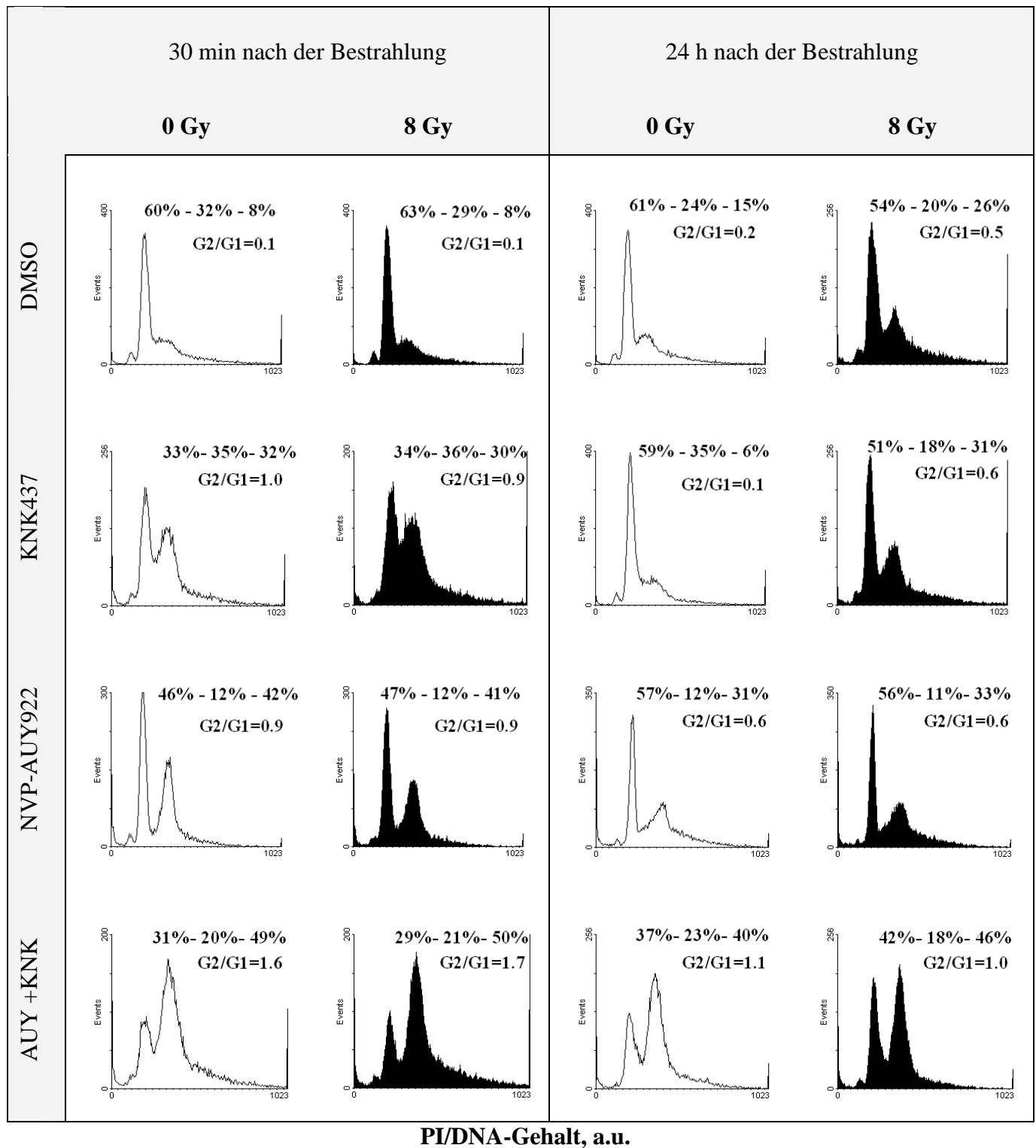


Abb. 3.3.6C. Repräsentative Zellzyklusverteilung der GaMG-Tumorzellen nach Behandlung mit 50 μ M KNK437 und 50 nM NVP-AUY922, 30 min und 24 h nach der Bestrahlung. Für Legende siehe Abb. 3.3.6A.

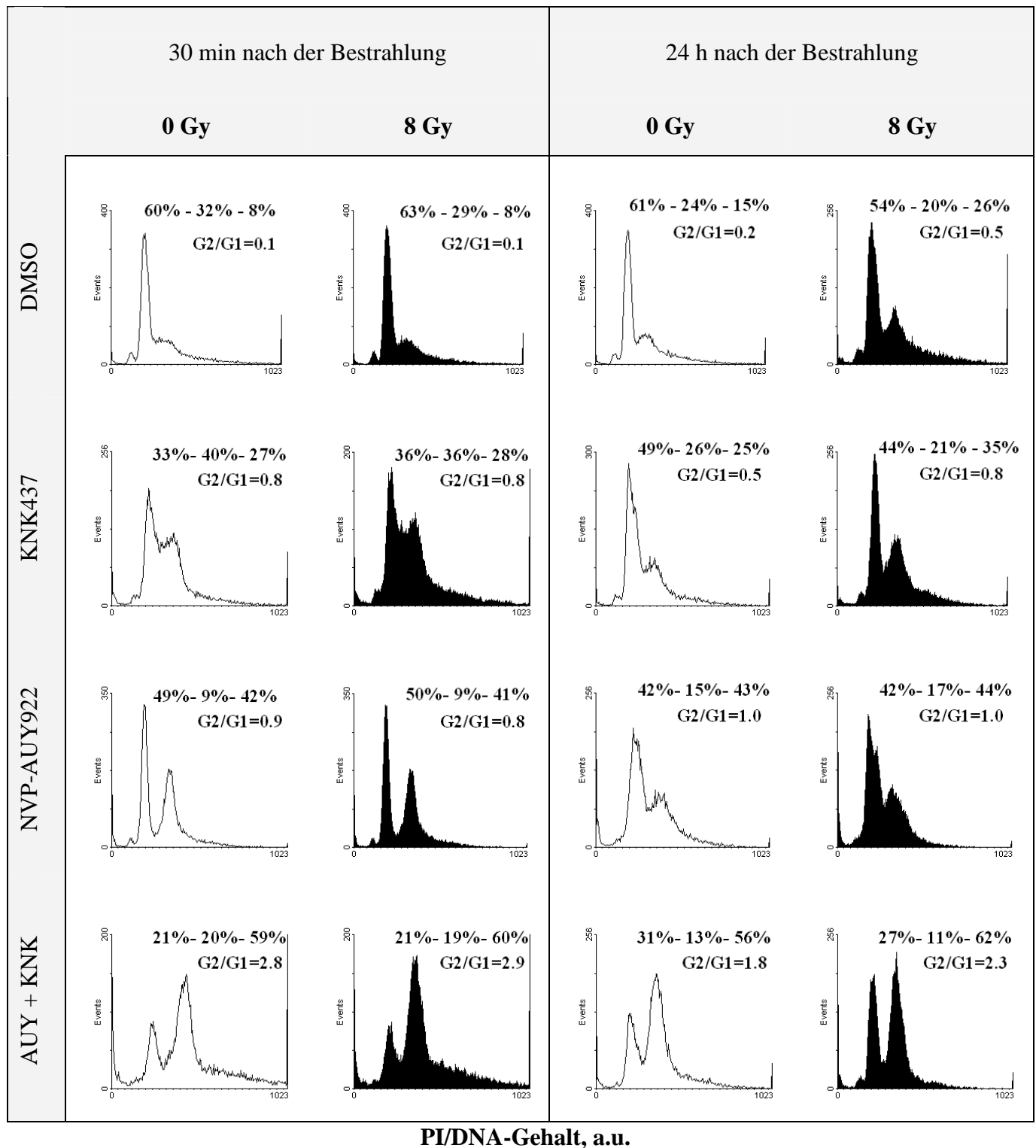


Abb. 3.3.6D. Repräsentative Zellzyklusverteilung der GaMG-Tumorzellen nach Behandlung mit 100 μ M KNK437 und 200 nM NVP-AUY922, 30 min und 24 h nach der Bestrahlung. Für Legende siehe Abb. 3.3.6A.

Wie in der Abb. 3.3.6 zu sehen (ungefüllte Histogramme, 30 min-Werte), induzierte die alleinige Behandlung mit KNK437 eine Akkumulation der Tumorzellen in der G2/M-Phase. Dabei betrug der Anteil der sich in der G2/M-Phase befindlichen A549-Tumorzellen nach alleiniger Behandlung mit KNK437 30 bis 40%, je nach Konzentration des Inhibitors, im Vergleich zu 13% in der Kontrolle (Abb. 3.3.6A und B). Wie in der Abb. 3.3.6C und D ersichtlich, war der Anteil der mit KNK437 alleine behandelten GaMG-Zellen in der G2/M-Phase circa 30% der Gesamtzellpopulation im Vergleich zu 8% in den Kontrollproben.

Die alleinige Behandlung mit NVP-AUY922 induzierte in beiden Tumorzelllinien einen G2/M-Arrest sowie eine Reduktion der S-Phase. Dabei wurde der Anteil der A549-Tumorzellen in der S-Phase auf circa 2% (S-Phase Depletion) reduziert, im Vergleich zu 38% in der Kontrolle. Gleichzeitig stieg der Anteil der sich in der G2/M-Phase befindlichen A549-Tumorzellen auf 57% bis 66% im Vergleich zu 13% in der Kontrolle (Abb. 3.3.6A und B). Wie in der Abb. 3.3.6C und D gezeigt, betrug der Anteil der NVP-AUY922-behandelten GaMG-Tumorzellen in der S-Phase 9 bis 12% und in der G2/M-Phase circa 40% der Gesamtzellpopulation im Vergleich zu den Kontrollproben (circa 30% S-Phase-Zellen und 8% G2/M-Phase-Zellen).

Die simultane Behandlung der Tumorzellen mit KNK437 und NVP-AUY922 führte zu einer ähnlichen Zellzyklusverteilung wie nach alleiniger KNK437-Behandlung: G2/M-Arrest ohne S-Phase-Depletion. Dabei betrug der Anteil an A549-Tumorzellen in der S-Phase 20% bis 30% und die in der G2/M-Phase 41% bis 47% (Abb. 3.3.6A und B, ungefüllte Histogramme, 30 min-Werte), je nach Konzentration der Inhibitoren, im Vergleich zur Kontrolle (circa 38% S-Phase-Zellen und 13% G2/M-Phase-Zellen). Wie in der Abb. 3.3.6C und D gezeigt (ungefüllte Histogramme 30 min), führte die simultane Behandlung der GaMG-Tumorzelllinie zu einer Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase auf 50 bis 60%, je nach Konzentration der Inhibitoren, während der Anteil an Zellen in der S-Phase circa 20% betrug im Vergleich zur Kontrolle (circa 30% S-Phase-Zellen und 8% G2/M-Phase-Zellen).

Dreißig Minuten nach der Bestrahlung ließen sich keine Änderungen in der Zellzyklusverteilung der bestrahlten Tumorzellen (gefüllte Histogramme in Abb. 3.3.6) im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen (ungefüllte Histogramme) detektieren.

Weiterhin zeigt Abb. 3.3.6 (ungefüllte Histogramme, 24 h-Werte) die Ergebnisse der Zellzyklus-Analyse nach Behandlung der Tumorzellen mit KNK437, NVP-AUY922 oder beiden Substanzen 24 h nach dem Auswaschen der Inhibitoren ohne zusätzliche Bestrahlung.

In den Tumorzellen, die mit 50 μM KNK437 alleine behandelt wurden, waren 24 h nach dem Auswaschen des Inhibitors keine Zellzyklusstörungen mehr erkennbar (Abb. 3.3.6A und C, 2. Reihe). In den mit 100 μM KNK437 behandelten Tumorzellen konnte noch 24 h nach dem Auswaschen des Inhibitors ein G2/M-Arrest gemessen werden. Hierbei wurde eine gesteigerte Akkumulation der mit KNK437 behandelten A549-Tumorzellen in der G2/M-Phase (33%) im Vergleich zu 16% in der Kontrolle detektiert (Abb. 3.3.6B, ungefüllte Histogramme). In den mit 100 μM KNK437 behandelten GaMG-Tumorzellen war 25% der Gesamtpopulation in der G2/M-Phase im Vergleich zu 15% in der Kontrolle (Abb. 3.3.6D).

Nach alleiniger Behandlung der A549-Tumorzellen mit NVP-AUY922 konnte 24 h nach dem Auswaschen des HSP90-Inhibitors eine Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase nur in denjenigen Zellen beobachtet werden, die mit 200 nM NVP-AUY922 behandelt wurden, von 42% im Vergleich zu 16% in den Kontrollproben (Abb. 3.3.6B, 3. Reihe, ungefüllte Histogramme). In den mit NVP-AUY922 behandelten GaMG-Tumorzellen wurde 24 h nach dem Auswaschen des HSP90-Inhibitors eine Akkumulation der Tumorzellen in der G2/M-Phase zwischen 30% und 40% gemessen, je nach NVP-AUY922-Konzentration, im Vergleich zu 15% in den Kontrollproben (Abb. 3.3.6C und D, 3. Reihe, ungefüllte Histogramme).

Die simultane Behandlung mit beiden Substanzen (ohne Bestrahlung) induzierte einen G2/M-Arrest in der A549-Tumorzelllinie im Vergleich zu alleiniger NVP-AUY922-Behandlung, wenn niedrigere Konzentrationen des HSP90-Inhibitors verwendet wurden (Abb. 3.3.6A, letzte Reihe, ungefüllte Histogramme). Wie in der Abb. 3.3.6A ersichtlich, wurde 24 h nach dem Auswaschen der Inhibitoren eine Akkumulation der A549-Tumorzellen in der G2/M-Phase auf circa 40% erreicht, wenn sie mit 50 μM KNK437 und 50 nM NVP-AUY922 behandelt wurden. Dies bedeutet einen G2/M-Arrest durch die zusätzliche Behandlung mit 50 μM KNK437 ($G2/G1=2.8$) im Vergleich zu alleiniger Behandlung mit 50 nM NVP-AUY922 ($G2/G1=0.3$). Dagegen war die Zellzyklusverteilung der mit 100 μM KNK437 und 200 nM NVP-AUY922 behandelten A549-Tumorzellen ähnlich wie nach alleiniger Behandlung mit dem HSP90-Inhibitor (Abb. 3.3.6B). In der GaMG-Tumorzelllinie erhöhte die simultane Behandlung mit beiden Substanzen den G2/M-Arrest um circa 10% im Vergleich zu alleiniger NVP-AUY922-Behandlung in beiden Kombinationen (Abb. 3.3.6C und D, jeweils die letzte Reihe, ungefüllte Histogramme).

Die Ergebnisse der Zellzyklus-Analyse nach Behandlung der Tumorzellen mit KNK437, NVP-AUY922 oder beiden Substanzen in Kombination mit Bestrahlung sind in Abb. 3.3.6 (gefüllte Histogramme, 24 h-Werte) gezeigt. Wie erwartet, war der Einfluss der Bestrahlung auf den Zellzyklus 24 h post-IR detektierbar. In beiden Tumorzelllinien kam es zu einem G2/M-Arrest ($G2/G1=0.6$ in der A549-Tumorzelllinie im Vergleich zu $G2/G1=0.3$ in der unbestrahlten Kontrolle, bzw. $G2/G1=0.5$ in der GaMG-Tumorzelllinie im Vergleich zu $G2/G1=0.2$ in der unbestrahlten Kontrolle).

Die Kombination der Bestrahlung mit KNK437 (Abb. 3.3.6, 2. Reihe, gefüllte Histogramme) erhöhte den G2/M-Arrest in beiden Tumorzelllinien im Vergleich zu alleiniger KNK437-Behandlung. Dies zeigte sich in den höheren G2/G1-Werten nach Kombination der Bestrahlung mit KNK437 im Vergleich zu alleiniger KNK437-Behandlung. Für die A549-Tumorzelllinie waren die G2/G1-Werte nach Kombination der Bestrahlung mit KNK437 $G2/G1=1.4$ im Vergleich zu $G2/G1=0.3$ in der unbestrahlten Probe (Abb. 3.3.6A) sowie $G2/G1=1.3$ im Vergleich zu $G2/G1=0.8$ nach alleiniger KNK437-Behandlung (Abb. 3.3.6B). Für die GaMG-Tumorzelllinie waren die G2/G1-Werte nach Kombination der Bestrahlung mit KNK437 wie folgt: $G2/G1=0.6$ im Vergleich zu $G2/G1=0.1$ in der unbestrahlten Probe (Abb. 3.3.6C), sowie $G2/G1=0.8$ im Vergleich zu $G2/G1=0.5$ nach alleiniger KNK437-Behandlung (Abb. 3.3.6D).

In den mit 50 nM NVP-AUY922 behandelten und bestrahlten A549-Tumorzellen konnte ein G2/M-Arrest ($G2/G1=1.9$) 24 h nach der Bestrahlung detektiert werden, (Abb. 3.3.6A, 3. Reihe, gefülltes Histogramm), während die NVP-AUY922 behandelten, unbestrahlten Proben keine Zellzyklusstörungen aufwiesen (Abb. 3.3.6A, 3. Reihe, ungefülltes Histogramm). Die Kombination der Bestrahlung mit 200 nM NVP-AUY922 erhöhte die Akkumulation der A549-Tumorzellen in der G2/M-Phase auf 63% im Vergleich zu NVP-AUY922 allein (42% G2/M-Phase-Zellen), wie in der Abb. 3.3.6B ersichtlich. In Kombination mit Bestrahlung blieb die Zellzyklusverteilung der NVP-AUY922 behandelten und zusätzlich bestrahlten GaMG-Tumorzellen ähnlich wie nach alleiniger HSP90-Inhibition (Abb. 3.3.6C und D, 3. Reihe, 24 h-Histogramme).

In Kombination mit Bestrahlung zeigten die mit KNK437 und NVP-AUY922 behandelten Tumorzellen ähnliche Zellzyklusverteilungen wie ohne Bestrahlung (Abb. 3.3.6, letzte Reihe, 24 h-Histogramme).

Die Ergebnisse der Zellzyklusverteilung von drei unabhängigen Experimenten sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst.

Tabelle 3.3.2. Zellzyklusverteilung der A549- und GaMG-Tumorzelllinien nach Behandlung mit 50 μ M KNK437 und 50 nM NVP-AUY922, 30 min und 24 h nach der Bestrahlung (MW \pm STABW).

Tumorzelllinie	Dosis (Gy)	30 min nach der Bestrahlung				24 h nach der Bestrahlung			
		G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	G2/G1	G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	G2/G1
A549-DMSO	0	50 \pm 2	36 \pm 0	14 \pm 2	0.3	51 \pm 14	28 \pm 7	21 \pm 7	0.4
	8	49 \pm 4	38 \pm 4	13 \pm 1	0.3	47 \pm 9	10 \pm 7	44 \pm 4	1.0
+KNK437	0	30 \pm 2	42 \pm 1	27 \pm 3	0.9	52 \pm 12	30 \pm 11	17 \pm 1	0.3
	8	30 \pm 2	39 \pm 7	31 \pm 8	1.0	38 \pm 6	7 \pm 3	55 \pm 3	1.4
+AUY922	0	40 \pm 1	3 \pm 1	57 \pm 1	1.4	46 \pm 1	36 \pm 4	19 \pm 5	0.4
	8	39 \pm 2	5 \pm 4	56 \pm 2	1.4	29 \pm 2	10 \pm 1	62 \pm 2	2.1
+KNK+AUY	0	37 \pm 6	19 \pm 1	44 \pm 6	1.2	10 \pm 4	46 \pm 6	44 \pm 7	4.4
	8	37 \pm 6	21 \pm 2	43 \pm 7	1.2	20 \pm 1	34 \pm 3	46 \pm 3	2.3
GaMG-DMSO	0	58 \pm 11	31 \pm 8	10 \pm 4	0.2	53 \pm 7	34 \pm 3	13 \pm 5	0.2
	8	55 \pm 11	37 \pm 11	9 \pm 1	0.2	50 \pm 3	29 \pm 8	21 \pm 6	0.4
+KNK437	0	21 \pm 1	39 \pm 15	40 \pm 14	1.9	52 \pm 7	35 \pm 7	12 \pm 7	0.2
	8	20 \pm 2	39 \pm 15	41 \pm 15	2.0	41 \pm 9	25 \pm 14	35 \pm 12	0.9
+AUY922	0	43 \pm 6	15 \pm 9	42 \pm 14	1.0	53 \pm 4	22 \pm 9	25 \pm 5	0.5
	8	42 \pm 7	14 \pm 7	44 \pm 13	1.0	46 \pm 9	21 \pm 12	32 \pm 6	0.7
+KNK+AUY	0	27 \pm 5	16 \pm 6	57 \pm 7	2.1	30 \pm 7	32 \pm 8	38 \pm 6	1.3
	8	26 \pm 5	17 \pm 6	57 \pm 6	2.2	29 \pm 12	28 \pm 8	45 \pm 2	1.5

Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der Tumorzellen in den G1-, S- und G2/M-Phasen an, woraus der G2/G1-Faktor berechnet wurde.

Tabelle 3.3.3. Zellzyklusverteilung der A549- und GaMG-Tumorzelllinien nach Behandlung mit 100 µM KNK437 und 200 nM NVP-AUY922, 30 min und 24 h nach der Bestrahlung (MW ± STABW).

Tumorzelllinie	Dosis (Gy)	30 min nach der Bestrahlung				24 h nach der Bestrahlung			
		G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	G2/G1	G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	G2/G1
A549-DMSO	0	49±10	36±3	15±3	0.3	54±6	31±7	15±2	0.3
	8	49±1	37±1	14±2	0.3	50±7	9±2	41±5	0.8
+KNK437	0	43±7	23±2	34±7	0.8	40±7	25±8	34±13	0.9
	8	43±5	22±2	35±5	0.8	39±2	7±3	55±5	1.4
+AUY922	0	34±2	3±1	63±3	1.9	28±4	19±2	56±3	2.0
	8	33±3	4±3	63±4	1.9	26±6	12±2	62±5	2.4
+KNK+AUY	0	34±6	25±4	41±7	1.2	35±1	26±2	39±2	1.1
	8	36±6	25±3	39±7	1.1	35±1	24±1	40±2	1.1
GaMG-DMSO	0	55±16	37±14	8±2	0.1	55±5	31±6	14±2	0.2
	8	58±9	31±9	11±6	0.1	46±4	29±9	22±5	0.5
+KNK437	0	29±10	43±8	28±10	1.0	45±5	33±6	22±5	0.5
	8	28±8	41±4	30±10	1.1	37±6	22±13	41±14	1.1
+AUY922	0	39±7	13±3	48±9	1.2	43±1	21±10	36±10	0.7
	8	38±10	14±1	48±9	1.2	43±1	22±6	37±8	0.8
+KNK+AUY	0	24±3	24±4	53±6	2.2	26±4	17±5	57±3	2.2
	8	22±4	23±4	55±5	2.5	27±1	14±4	60±4	2.2

Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der Tumorzellen in den G1-, S- und G2/M-Phasen an, woraus der G2/G1-Faktor berechnet wurde.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass jede Testsubstanz alleine in beiden Tumorzelllinien einen G2/M-Arrest induzierte. Ohne Bestrahlung ließ die Wirkung der Inhibitoren auf den Zellzyklus 24 h nach dem Auswaschen der Substanzen nach, vor allem wenn geringere Konzentrationen verwendet wurden (Tabelle 3.3.2, 24 h-Werte). Die Kombination der Bestrahlung mit KNK437 oder NVP-AUY922 bewirkte, dass der G2/M-Arrest bis zu 24 h nach dem Auswaschen der Testsubstanzen anhielt (Tabellen 3.3.2 und 3.3.3, 24 h-Werte). Im Vergleich zu alleiniger NVP-AUY922-Behandlung bewirkte die simultane Behandlung mit KNK437 und NVP-AUY922 in beiden Tumorzelllinien einen G2/M-Arrest ohne dass gleichzeitig eine starke Reduktion der S-Phase stattfand.

3.3.5. Einfluss der Behandlung mit KNK437 allein oder in Kombination mit NVP-AUY922 und Bestrahlung auf die DNA-Schäden

Die Induktion und Reparatur der DNA-Schäden in den Tumorzelllinien A549 und GaMG nach Kombination der Bestrahlung mit KNK437 und NVP-AUY922 wurde über die Expression von γ H2AX als DNA-DSB-Marker bestimmt. Dafür wurden die Tumorzellen mit KNK437, NVP-AUY922 oder beiden Inhibitoren behandelt, dann mit 8 Gy bestrahlt. Nach Bestrahlung wurden die Tumorzellen bis zu Analyse in DMEM ohne Inhibitoren inkubiert.

Repräsentative Histogramme der γ H2AX-Verteilung nach Behandlung der Tumorzelllinien mit KNK437 und NVP-AUY922, 30 min und 24 h nach der Bestrahlung sind in Abb. 3.3.7A-D dargestellt.

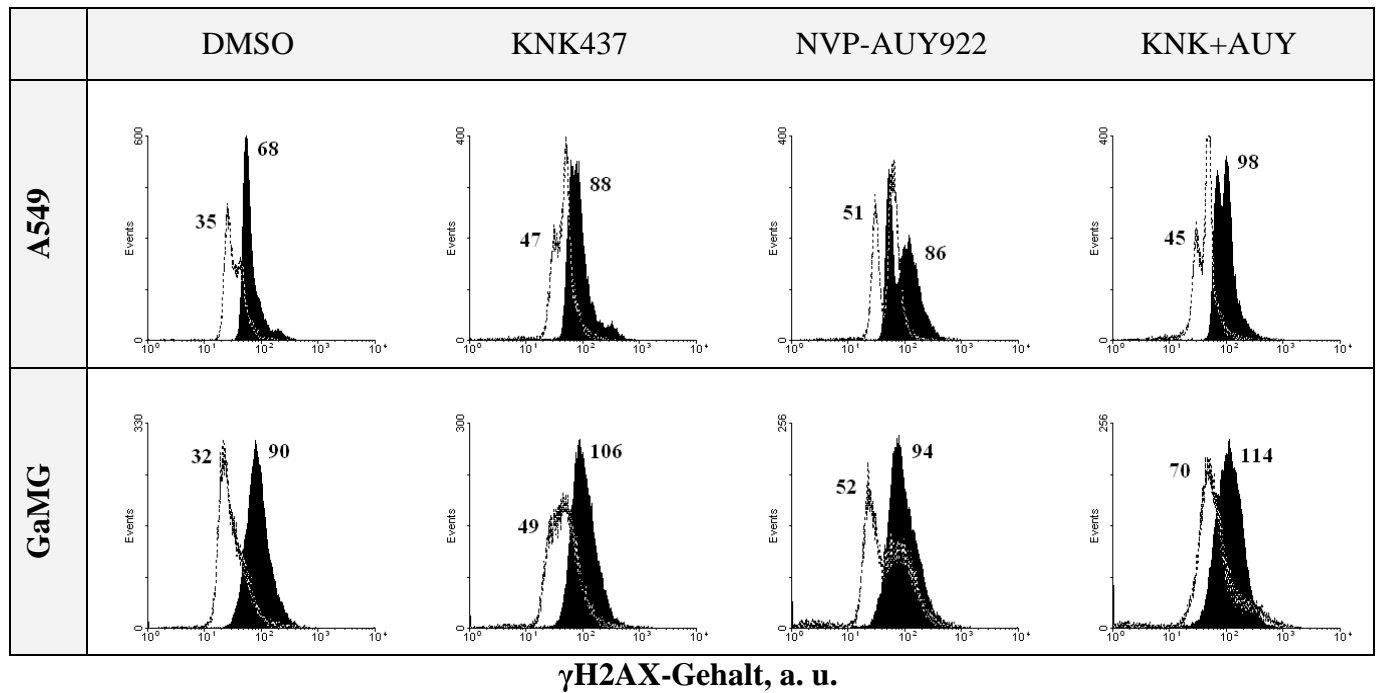


Abb. 3.3.7A. Expression von γ H2AX nach Behandlung der Tumorzelllinien A549 und GaMG mit 50 μ M KNK437 und 50 nM NVP-AUY922, 30 min nach der Bestrahlung mit 8 Gy. Die Abbildung stellt repräsentative FACS-Analysen der unbestrahlten (ungefüllte Histogramme) und bestrahlten (gefüllte Histogramme) Tumorzellen dar, wobei die Zahlen die mittlere Intensität der grünen Fluoreszenz von γ H2AX angeben.

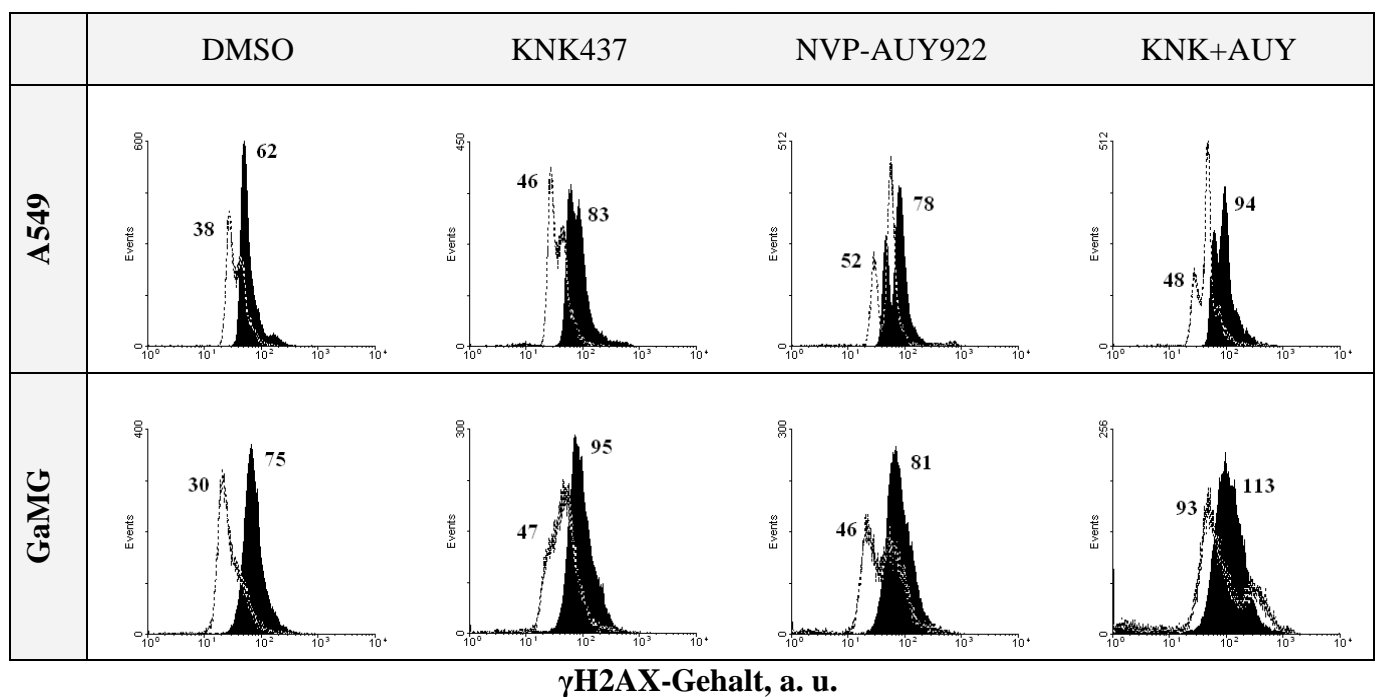


Abb. 3.3.7B. Expression von γ H2AX nach Behandlung der Tumorzelllinien A549 und GaMG mit 100 μ M KNK437 und 200 nM NVP-AUY922, 30 min nach der Bestrahlung mit 8 Gy. Legende wie in Abb. 3.3.7A.

Wie in Abb. 3.3.7A und B (ungefüllte Histogramme) gezeigt, kam es nach alleiniger Behandlung beider Tumorzelllinien mit KNK437 oder mit NVP-AUY922 zu einer Erhöhung der Histon γ H2AX-Expression im Vergleich zur Hintergrundexpression in den unbehandelten Kontrollen: um einen Faktor von 1.2 bis 1.3, je nach Konzentration des Inhibitors, nach alleiniger Behandlung mit KNK437 oder um einen Faktor von 1.4 bis 1.5 nach alleiniger Behandlung mit NVP-AUY922 in der A549-Tumorzelllinie. In der GaMG-Tumorzelllinie stieg die γ H2AX-Expression um den Faktor 1.5 bis 1.6 nach alleiniger Behandlung mit KNK437 oder NVP-AUY922.

Die simultane Behandlung mit KNK437 und NVP-AUY922 führte zu keinen zusätzlichen DNA-Schäden im Vergleich zu alleiniger NVP-AUY922-Behandlung in der A549-Tumorzelllinie. Dagegen zeigten die GaMG-Tumorzellen zusätzliche DNA-Schäden nach simultaner Behandlung mit beiden Inhibitoren: um den Faktor 1.3 (Abb. 3.3.7A) sowie um den Faktor 2 (Abb. 3.3.7B) im Vergleich zu alleiniger NVP-AUY922-Behandlung

Dreißig Minuten nach der Bestrahlung (Abb. 3.3.7A und B, gefüllte Histogramme) kam es zu einer Erhöhung der γ H2AX-Expression um einen Faktor von 1.2 bis 1.3 nach Behandlung mit jeweils einem Inhibitor im Vergleich zu alleiniger Bestrahlung. In Kombination mit Bestrahlung induzierte die simultane Behandlung mit beiden Inhibitoren zusätzliche DNA-Schäden in der A549-Tumorzelllinie um den Faktor 1.1 (Abb. 3.3.7A) und um den Faktor 1.2 (Abb. 3.3.7B) im Vergleich zur NVP-AUY922/IR-Kombination. In der GaMG-Tumorzelllinie führte die Kombination der Bestrahlung mit KNK437 und NVP-AUY922 zu einer Erhöhung der γ H2AX-Expression um einen Faktor von 1.2 (Abb. 3.3.7A) bis Faktor 1.4 (Abb. 3.3.7B) im Vergleich zur NVP-AUY922/IR-Kombination.

Repräsentative Histogramme der Fluoreszenzverteilung von γ H2AX nach Behandlung der Tumorzellen mit KNK437 und NVP-AUY922 24 h nach der Bestrahlung sind in Abb. 3.3.7C und D dargestellt.

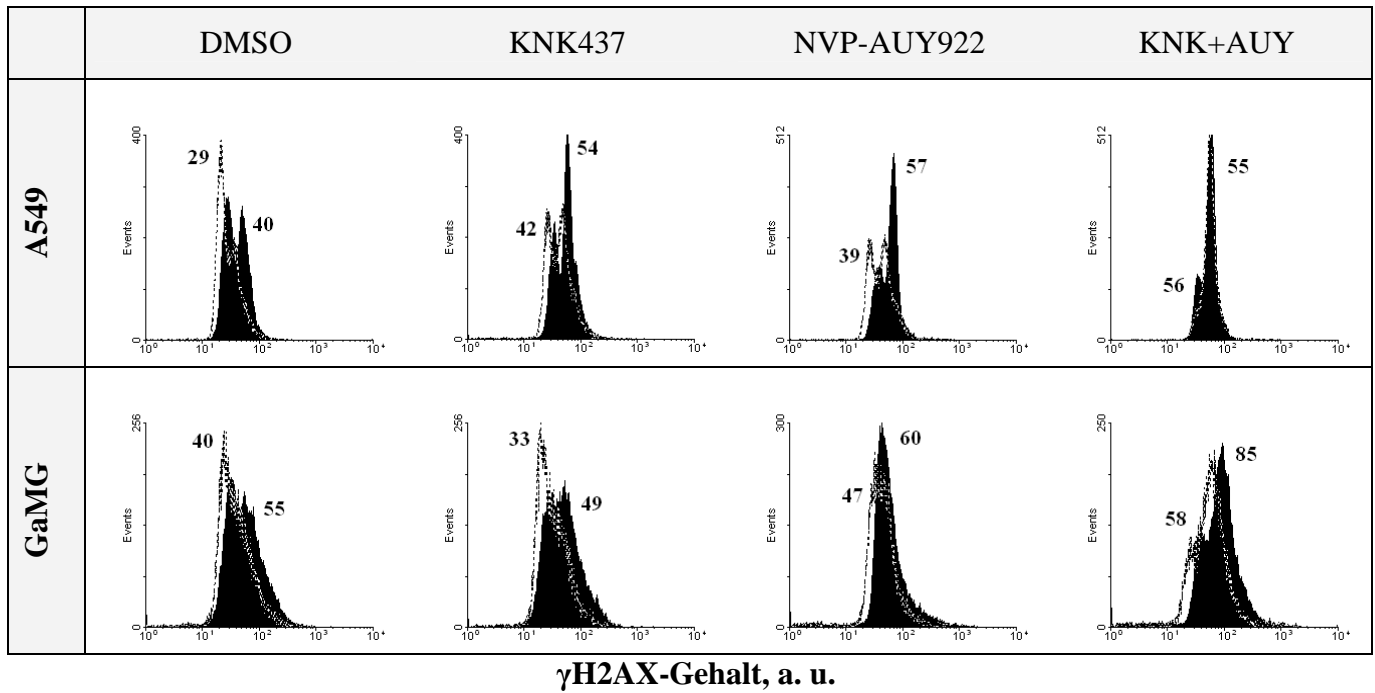


Abb. 3.3.7C. Expression von γ H2AX nach Behandlung der Tumorzelllinien A549 und GaMG mit 50 μ M KNK437 und 50 nM NVP-AUY922, 24 h nach der Bestrahlung mit 8 Gy. Die Abbildung stellt repräsentative FACS-Analysen der unbestrahlten (ungefüllte Histogramme) und bestrahlten (gefüllte Histogramme) Tumorzellen dar, wobei die Zahlen die mittlere Intensität der grünen Fluoreszenz von γ H2AX angeben.

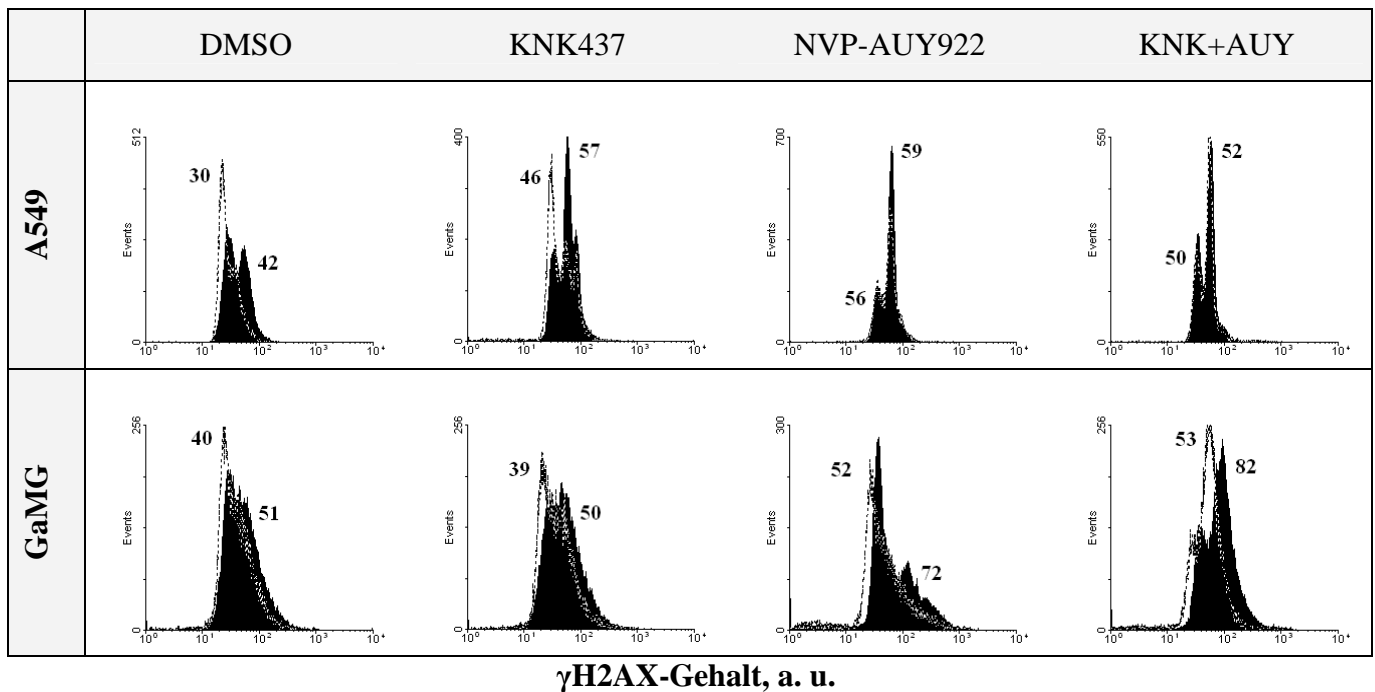


Abb. 3.3.7D. Expression von γ H2AX nach Behandlung der Tumorzelllinien A549 und GaMG mit 100 μ M KNK437 und 200 nM NVP-AUY922, 24 h nach der Bestrahlung mit 8 Gy. Für Legende siehe Abb. 3.3.7C.

Wie in der Abb. 3.3.7C und D (ungefüllte Histogramme) ersichtlich, beeinflusste die alleinige Behandlung mit KNK437 das Ausmaß der DNA-Restschäden in der A549-Tumorzelllinie. Dabei war die γ H2AX-Expression der mit KNK437-behandelten A549-Tumorzellen 24 h nach dem Auswaschen des Inhibitors um den Faktor 1.5 höher als in den unbehandelten Proben. Im Gegensatz zu A549 war die γ H2AX-Expression und damit das Ausmaß der DNA-Doppelstrangbrüche in KNK437 behandelten GaMG-Tumorzellen 24 h nach dem Auswaschen des Inhibitors ähnlich wie in den Kontrollproben, unabhängig von der KNK437-Konzentration. Dies deutet darauf hin, dass die DNA-Schäden, die unmittelbar nach alleiniger Behandlung der GaMG-Tumorzelllinie mit KNK437 entstanden (Abb. 3.3.7A, untere Reihe, ungefüllte Histogramme) nach einer Reparaturzeit von 24 h repariert wurden.

Nach alleiniger Behandlung der A549-Tumorzelllinie mit NVP-AUY922 wurde eine höhere γ H2AX-Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen detektiert: um den Faktor 1.3 nach Behandlung mit 50 nM NVP-AUY922 oder um den Faktor 1.9 nach Behandlung mit 200 nM NVP-AUY922. Die mit 50 nM NVP-AUY922 behandelten GaMG-Tumorzellen hatten 24 h nach dem Auswaschen des HSP90-Inhibitors ähnliche γ H2AX-Expression wie die Kontrollzellen und zeigten damit keine unreparierten DNA-Schäden (Abb. 3.3.7C, untere Reihe, ungefüllte Histogramme). Dagegen war die γ H2AX-Expression in den mit 200 nM NVP-AUY922 behandelten GaMG-Tumorzellen um einen Faktor von 1.3 höher als in der Kontrolle (Abb. 3.3.7D, untere Reihe, ungefüllte Histogramme).

Nach simultaner Behandlung mit beiden Inhibitoren in niedrigeren Konzentrationen wurde in beiden Tumorzelllinien 24 h nach dem Auswaschen der Substanzen einen höheren γ H2AX-Gehalt als nach alleiniger NVP-AUY922-Behandlung: um den Faktor 1.4 in der A549-Tumorzelllinie (Abb. 3.3.7C, obere Reihe, ungefüllte Histogramme) und um den Faktor 1.2 in der GaMG-Tumorzelllinie (Abb. 3.3.7C, untere Reihe, ungefüllte Histogramme). Nach Behandlung mit höheren Konzentrationen beider Inhibitoren war kein Unterschied zwischen kombinierter Behandlung und alleiniger NVP-AUY922-Behandlung betreffend der γ H2AX-Expression in beiden Tumorzelllinie zu erkennen.

Vierundzwanzig Stunden nach der Bestrahlung zeigten die mit jeweils einem Inhibitor behandelten und zusätzlich bestrahlten A549-Tumorzellen einen um den Faktor 1.3 bis 1.5 höheren γ H2AX-Gehalt als die unbehandelten, bestrahlten Proben, was auf zusätzliche DNA-Schäden hinweist (Abb. 3.3.7C und D, obere Reihe, gefüllte Histogramme). In der GaMG-

Tumorzelllinie führte die Kombination der Bestrahlung mit KNK437, unabhängig von der Konzentration des Inhibitors, sowie mit 50 nM NVP-AUY922 24 h post-IR zu keinen zusätzlichen DNA-Schäden im Vergleich zu alleiniger Bestrahlung. Nach Kombination der Bestrahlung mit 200 nM NVP-AUY922 war der γ H2AX-Gehalt in der GaMG-Tumorzelllinie um einen Faktor von 1.4 höher als nach alleiniger Bestrahlung (Abb. 3.3.7C und D, untere Reihe, gefüllte Histogramme).

Nach Kombination der Bestrahlung mit beiden Substanzen konnten 24 h post-IR keine zusätzlichen DNA-Schäden in der A549-Tumorzelllinie im Vergleich zu alleiniger NVP-AUY922-Behandlung detektiert werden. Die mit 50 μ M KNK437 und 50 nM NVP-AUY922 behandelten und bestrahlten GaMG-Tumorzellen zeigten einen um Faktor 1.4 (85 a. u.) erhöhten γ H2AX-Gehalt und damit mehr DNA-Restschäden im Vergleich zu den Proben, die nur mit NVP-AUY922 behandelt und anschließend bestrahlt wurden (60 a. u.). Nach Kombination der Bestrahlung mit höheren Konzentrationen beider Inhibitoren fiel der Unterschied geringer aus: 72 a. u. nach Behandlung mit NVP-AUY922 und 82 a. u. nach simultaner Behandlung mit beiden Inhibitoren (Faktor 1.1).

Die Ergebnisse aus diesem Kapitel zeigen, dass die Hochregulation von HSP90 und HSP70 nach HSP90-Inhibition unmittelbar nach simultaner Behandlung mit KNK437 und NVP-AUY922 in beiden getesteten Tumorzelllinien A549 und GaMG unterdrückt werden konnte. Allerdings konnte 24 h nach dem Auswaschen der Inhibitoren nur in der A549-Tumorzelllinie eine KNK437-vermittelte Unterdrückung der Stressantwort infolge von HSP90-Inhibition detektiert werden. Obwohl KNK437 in der A549-Tumorzelllinie radiosensibilisierend wirkte, konnte durch die simultane Behandlung mit beiden Inhibitoren die NVP-AUY922-induzierte Radiosensibilisierung in beiden Tumorzelllinien nicht erhöht werden.

4. Diskussion

4.1. Modulation der Strahlenempfindlichkeit humaner Tumorzelllinien mittels der neuartigen HSP90-Inhibitoren NVP-AUY922 und NVP-BEP800

Das HSP90-Protein ist ein molekulares Chaperon, involviert in die Faltung, Aktivierung, Translokation sowie Degradation (Pearl et al. 2008; Whitesell & Lindquist 2005; Sarto et al. 2000) von mehr als 200 Klientenproteinen (zusammengefasst in <http://www.picard.ch/downloads/Hsp90facts.pdf>). Eine Vielzahl der HSP90-Klientenproteine sind an allen Schlüsselprozessen der Tumorentstehung und Tumorprogression beteiligt (Zhang & Burrows 2004; Peterson & Blagg 2009) und sind mit allen durch Mutationen erworbene Fähigkeiten der Tumorzellen assoziiert (Hanahan & Weinberg 2000). Außerdem spielen bestimmte HSP90-Klientenproteine, darunter DNA-Reparaturproteine (Dote et al. 2006), Komponenten der Signaltransduktionswege, die Zellüberleben ermöglichen, wie z. B. EGF-Rezeptoren, RAF-1 und AKT (Camphausen & Tofilon 2007; Dote et al. 2005) sowie Regulatoren der Apoptose wie Survivin (Fortugno et al. 2003; Reichert et al. 2011) eine wichtige Rolle bei der Resistenz vieler Tumoren gegenüber ionisierender Strahlung bei klinisch relevanten Dosen. Dadurch stellt die Modulation von HSP90 einen vielversprechenden Therapieansatz zur Radiosensibilisierung strahlenresistenter Tumorzellen dar.

Im Gegensatz zu den Single-Target-Therapieansätzen zur Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit radioresistenter Tumoren wie z. B. die pharmakologische Inhibition der DNA-Reparatur mittels des PARP-Inhibitors ABT-888, die Blockade der EGF-Rezeptoren mittels Cetuximab oder Erlotinib sowie des Angiogenesefaktors VEGF mittels Bevacizumab, die bereits in klinischen Studien erprobt wurden (zusammengefasst in Dumont et al. 2009), bietet die Modulation von HSP90, durch die gleichzeitige Inhibierung multipler Targets und der damit verbundenen Überlebensmechanismen, die Vorteile einer Multi-Target-Therapie an.

Die Wirkung der pharmakologischen HSP90-Inhibition auf die Strahlenempfindlichkeit humaner Zelllinien wurde seit längerem untersucht (Bull et al. 2004; Dote et al. 2005; Machida et al. 2005; Dote et al. 2006; Shintani et al. 2006; Noguchi et al. 2006; Koll et al. 2008; Kabakov et al. 2008; Moran et al. 2008; Fujii et al. 2010). Sowohl bei der Kombination der HSP90-Inhibition mit DNA-schädigenden Agenzien (Robles et al. 2006) als auch mit der Bestrahlung (Koll et al. 2008; Bisht et al. 2003) führte die Behandlung mit verschiedenen HSP90-Inhibitoren vor der Bestrahlung zu maximaler Synergie. Die Einwirkzeit der HSP90-Inhibitoren, notwendig um eine Radiosensibilisierung zu induzieren, lag dabei

zwischen 4 h und 24 h (Bisht et al. 2003). Auch in anderen Studien führte die Behandlung mit HSP90-Inhibitoren von 6 h bis 24 h vor der Bestrahlung zur Radiosensibilisierung der getesteten Tumorzelllinien (Machida et al. 2003; Russell et al. 2003; Bull et al. 2004; Machida et al. 2005; Harashima et al. 2005; Matsumoto et al. 2005; Noguchi et al. 2006; Dote et al. 2006; Fujii et al. 2010; Yin et al. 2010). Der molekulare Mechanismus der Radiosensibilisierung nach pharmakologischer HSP90-Inhibition ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Für die Geldanamycin-vermittelte Radiosensibilisierung wurde die Degradation diverser Radio-resistenz-assoziiierter Proteine wie EGFR/ERBB1, ERBB2, sowie AKT und RAF-1 vorgeschlagen (Chinnaiyan et al. 2006). Andererseits führte die 17-DMAG-induzierte Degradation des EGF-Rezeptors ERBB2 (Bull et al. 2004; Dote et al. 2005) oder die siRNA-vermittelte Herunterregulierung der ERBB2-Expression (Dote et al. 2005) nicht zur Radiosensibilisierung der getesteten Tumorzelllinien. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Verlust des ERBB2-Proteins zwar notwendig für die Radiosensibilisierung sein kann, aber nicht ausreichend. Die in diesen Studien verwendeten HSP90-Inhibitoren (Radicicol, Geldanamycin und seine Derivate 17-AAG oder 17-DMAG) zeigten allerdings zahlreiche Limitierungen in der klinischen Anwendung, darunter schwache Löslichkeit in Wasser und hohe Toxizität vor allem in der Leber (Biamonte et al. 2010), daher wird weiterhin nach HSP90-Inhibitoren mit verbesserter Löslichkeit in Wasser und geringerer Toxizität geforscht.

In dieser Arbeit wurden zwei synthetische HSP90-Inhibitoren verwendet, NVP-AUY922, ein Isoxazol-Resorcinol-Derivat, und NVP-BEP800, ein Pyrimidin-Derivat, sowie das Geldanamycin-Derivat 17-DMAG als Vergleich. Die neuartigen HSP90-Inhibitoren NVP-AUY922 und NVP-BEP800 sind wasserlöslich und zeigten in verschiedenen Studien anti-proliferative Wirkung gegen verschiedene Tumorzelllinien und Xenograft-Tiermodellen bei gut verträglichen Dosen (Brough et al. 2008; Eccles et al. 2008; Jensen et al. 2008; Stühmer et al. 2009; Stühmer et al. 2008; Bergstrom et al. 2008; Monazzam et al. 2009; Kaiser et al. 2010; Munnink et al. 2010; Nagengast et al. 2010; Gaspar et al. 2010; Massey et al. 2010a; Tauchi et al. 2011). Die Wirkungen der neuartigen HSP90-Inhibitoren 24 h vor der Bestrahlung wurde in dieser Arbeit in vier humanen Tumorzelllinien unterschiedlicher Entitäten untersucht, die Lungenkarzinomzelllinie A549, die Fibrosarkomzelllinie HT1080, sowie zwei Glioblastomzelllinien, GaMG und SNB19.

Die optimale Konzentration der HSP90-Inhibitoren wurde mittels *in vitro* Zytotoxizitätstest bestimmt. Die von uns ausgewählte Konzentration von 200 nM reduzierte die Viabilität der getesteten Tumorzelllinien auf maximal 65% (Abb. 3.1.1) und lag nahe bei

den in der Literatur angegebenen Konzentrationen für 17-DMAG von 100 nM (Robles et al. 2006; Koll et al. 2008).

Die Strahlenempfindlichkeit humaner Tumorzelllinien nach Behandlung mit 200 nM HSP90-Inhibitoren wurde mittels Kolonietests 24 h vor der Bestrahlung bestimmt (Abb. 3.1.2, Tabelle 3.1.1). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit den neuartigen HSP90-Inhibitoren die Strahlenempfindlichkeit der getesteten Tumorzellen erhöhte.

Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit ist durch komplexe Interaktionen mit multiplen Signaltransduktionswegen bestimmt, welche die Apoptose, die Zellproliferation und das Zellüberleben, sowie die DNA-Reparatur regulieren (Camphausen & Tofilon 2007). Die Prozesse, die bei der Radiosensibilisierung nach HSP90-Inhibition beteiligt sein könnten, wurden in dieser Arbeit untersucht.

Um die Rolle der Apoptose bei der Radiosensibilisierung zu bestimmen, wurde der Anteil an Zellen mit hypodiploidem DNA-Gehalt durchflusszytometrisch bestimmt (Kapitel 3.1.3) sowie die Expression von Apoptose-regulierenden Proteinen mittels Western Blot analysiert (Kapitel 3.1.4).

Die alleinige Behandlung mit HSP90-Inhibitoren erhöhte den Anteil an Zellen mit hypodiploiden DNA-Gehalt in drei der vier untersuchten Tumorzelllinien (Abb. 3.1.3 bis Abb. 3.1.6). Dieser Effekt zeigte sich in den Tumorzelllinien GaMG und HT1080 bereits unmittelbar nach der Behandlung (Abb. 3.1.3 und Abb. 3.1.4), oder in der SNB19-Tumorzelllinie erst 24 h bzw. 48 h nach der Behandlung (Abb. 3.1.5, D). Verglichen mit den anderen Tumorzelllinien zeigte die A549-Tumorzelllinie keine Erhöhung des Anteils an Zellen mit hypodiploiden DNA-Gehalt nach Behandlung mit HSP90-Inhibitoren (Abb. 3.1.3 und Abb. 3.1.4).

Die Western-Blot-Analysen der Apoptose-regulierenden Proteine bestätigten die Induktion von Apoptose in den Tumorzelllinien GaMG, HT1080 und SNB19 infolge der pharmakologischen HSP90-Inhibition (Abb. 3.1.7 und Abb. 3.1.8). Der Nachweis der beiden Apoptosemarker, die aktivierte Caspase-3 und/oder das 85 kDa große PARP-Fragment, weisen auf die Induktion von Caspase-abhängiger Apoptose nach HSP90-Inhibition in diesen Tumorzelllinien hin. In der HT1080-Tumorzelllinie kann der Apoptosesignalweg über das WT p53-Protein als wichtiger intrazellulärer Stresssensor induziert werden (Abb. 4.1). In den Tumorzelllinien mit mutiertem p53 Status (GaMG und SNB19) kann der Apoptosesignalweg von noch unbekanntem p53-unabhängigen Sensoren genutzt werden, um eine p53-unabhängige Apoptose einzuleiten (Evan & Littlewood 1998; Fimognari et al. 2005; Hanahan & Weinberg 2000), wie in der Abb. 4.1 dargestellt.

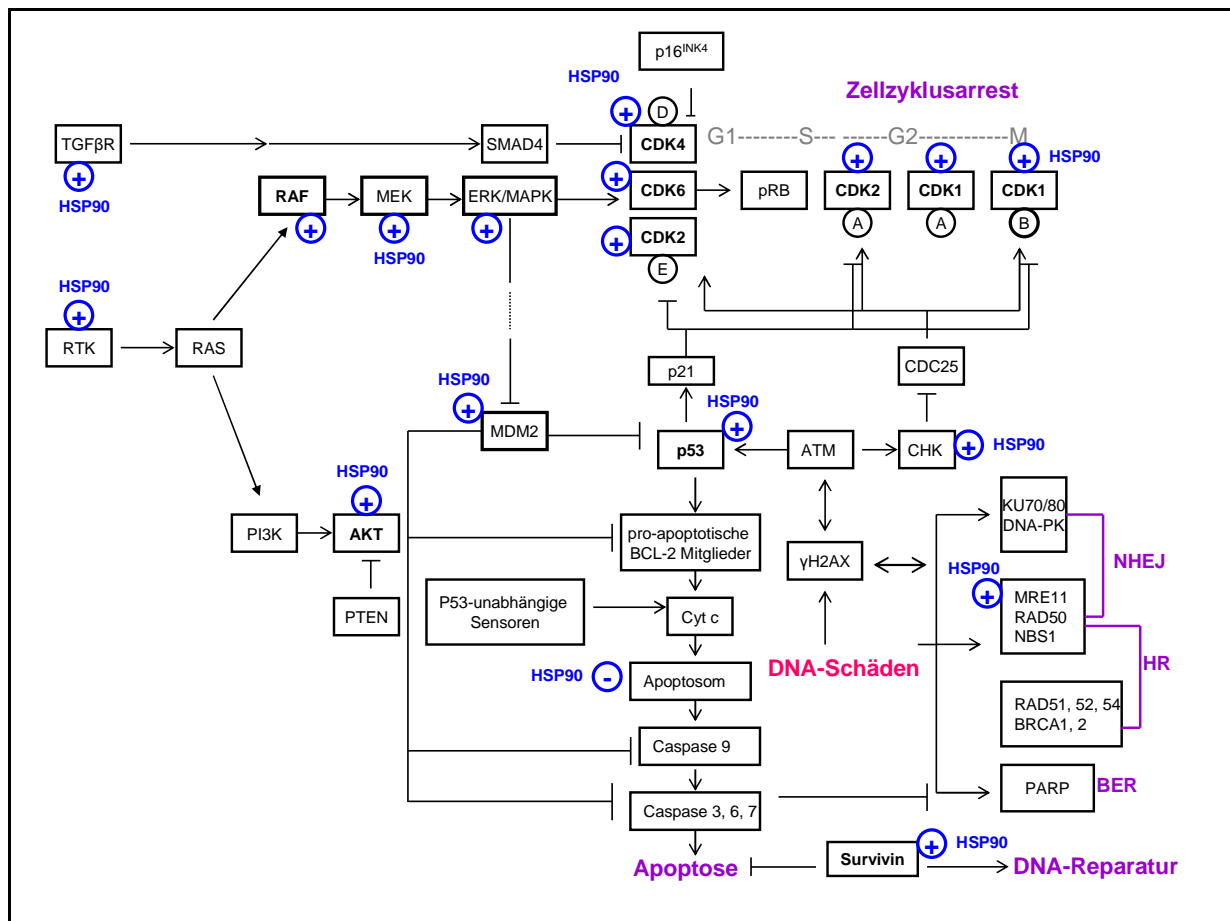


Abb. 4.1. Die Rolle von HSP90 bei der zellulären Stressantwort nach DNA-Schäden. Die aktivierende Wirkung von HSP90 auf diverse Proteine ist durch ein „+“, die inhibierende durch ein „-“ dargestellt. Dabei handelt es sich um Komponenten der Signaltransduktionswege, die Zellwachstum und Zellüberleben regulieren, darunter RAS/RAF/MEK/ERK und RAS/PI3K/AKT, um Zellzyklus-assoziierte Proteine wie CDK1, CDK2, CDK4 und CDK6, um Apoptose-regulierende Proteine wie p53, APAF-1 (als Teil des Apoptosoms) und Survivin sowie um DNA-Reparaturproteine wie der MRN-Komplex (modifiziert nach Hanahan & Weinberg 2000).

Wie in der Abb. 4.1 ersichtlich, können die p53-vermittelten Signalwege zum Zellzyklusarrest über p21 sowie zur Induktion der Apoptose über die Interaktion mit den pro-apoptischen Mitgliedern der BCL-2-Familie führen. Die erhöhte Expression von WT p53 nach HSP90-Inhibition in A549-Tumorzellen (Abb. 3.1.7) lässt vermuten, dass diese p53-vermittelten Signalwege aktiviert wurden. Allerdings waren die nachgeschalteten Proteine des Apoptosesignalweges (aktivierte Caspase-3 und inaktiviertes PARP) sowohl unmittelbar nach der Bestrahlung als auch 24 h danach in der A549-Tumorzelllinie nicht nachweisbar (Abb. 3.1.7 und Abb. 3.1.8). Daher trägt die Induktion von Caspase-3-abhängiger Apoptose zur Erklärung der nach pharmakologischer HSP90-Inhibition beobachteten Radiosensibilisierung in nur drei von vier Tumorzelllinien bei (HT1080, GaMG, SNB19).

Obwohl die pharmakologische HSP90-Inhibition mittels NVP-AUY922 und NVP-BEP800 die Expression des p53-Proteins in Abhängigkeit vom Zelltyp unterschiedlich beeinflusste (Abb. 3.1.7 und 3.1.8), wurde in allen Tumorzelllinien, unabhängig davon, ob p53 WT oder mutiert war, eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit erreicht (Abb. 3.1.2). Dies deutet darauf hin, dass der radiosensibilisierende Mechanismus der HSP90-Inhibition in den getesteten Tumorzelllinien kein funktionelles p53-Protein benötigt. Fujii und Kollegen bestätigten die Unabhängigkeit der Radiosensibilisierung nach 17-AAG-Behandlung von dem p53-Status der Lymphoblastoidzellen (Fujii et al. 2010). Die Unabhängigkeit der pharmakologischen HSP90-Inhibition von einem funktionsfähigen p53-Protein ist von großer Bedeutung, da 50% der Tumoren Mutationen in p53 aufweisen (Hollstein et al. 1991; Vogelstein et al. 2000). Unsere Ergebnisse unterstützen die Anwendung der HSP90-Inhibitoren als Radiosensibilisatoren, unabhängig vom p53-Status der Tumorzellen. Allerdings konnte eine p53-abhängige Radiosensibilisierung nach HSP90-Inhibition in Plattenepithelkarzinomlinien beobachtet werden, wo 17-AAG die Strahlenempfindlichkeit einer Tumorzelllinie mit WT p53 stärker erhöhte (um den Faktor 3) im Vergleich zu einer Tumorzelllinie mit mutiertem p53-Status (um den Faktor 1.5), wie Shintani und Kollegen zeigten (Shintani et al. 2006). Im Gegensatz zu Shintani et al, zeigten Moran und Kollegen eine erhöhte Radiosensibilisierung nach Geldanamycin-Behandlung in Kolonkarzinomzellen mit inaktiviertem p53-Signalweg (Moran et al. 2008).

Die pharmakologische HSP90-Inhibition führte zu mäßiger bis starker Reduktion der HSP90-Klientenproteine AKT und dessen aktivierte Form, pAKT sowie RAF-1 (Abb. 3.1.7). Die Reduktion der Menge an HSP90-Klientenproteine beruht auf die Blockierung der N-terminalen ATP-Bindungstasche durch die HSP90-Inhibitoren. Dadurch wird die Chaperonaktivität des HSP90-Komplexes inhibiert, infolge dessen die HSP90-Klientenproteine gezielt abgebaut werden (Zhang & Burrows 2004). Der Abbau der Schlüsselproteine AKT und RAF-1 blockiert gleichzeitig zwei essentielle RAS-abhängige Signaltransduktionswege, die das Zellwachstum und das Zellüberleben regulieren (Sears & Nevins 2002): RAS/PI3K/AKT und RAS/RAF/MEK/ERK, wie in der Abb. 4.1 zu sehen. Beide Signaltransduktionswege scheinen wichtig für die Strahlenresistenz der Tumorzellen zu sein, da ihre Inhibition (pharmakologische oder mittels siRNA) zur Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit radioresistenter Tumorzellen führte (Pirolo et al. 1997; Gupta et al. 2001; Tanno et al. 2004). Die Reduktion der anti-apoptischen Proteine AKT und RAF-1 nach pharmakologischer HSP90-Inhibition trägt zur Erklärung der beobachteten Radiosensibilisierung bei, kann aber nicht der einzige Faktor sein. Wie andere Studien

zeigten, ist der Beitrag von AKT und RAF-1 bei der Radiosensibilisierung vom Zelltyp abhängig (Pirolo et al. 1997; Gupta et al. 2001; Bull et al. 2004).

Ein anderes bekanntes HSP90-Klientenprotein ist das anti-apoptotische Protein Survivin (Fortugno et al. 2003). HSP90 greift in mehrere Prozesse ein, die das intrazelluläre Survivin-Proteinlevel regulieren, über Transkription, Translation und Proteasomaktivität (Cheung et al. 2010). Die pharmakologische HSP90-Inhibition mittels NVP-AUY922 oder 17-DMAG reduzierte die Menge von Survivin bereits 24 h nach der Behandlung in der Tumorzelllinie A549 (Abb. 3.1.7), während in behandelten GaMG-Tumorzellen eine Reduktion von Survivin erst 48 h nach der Behandlung detektiert wurde (Abb. 3.1.8). Da diese Tumorzelllinien unterschiedlichen p53-Genstatus aufweisen, scheint die Reduktion von Survivin von p53 unabhängig zu sein. Dies könnte auf die Degradation des Proteins als HSP90-Klientenprotein infolge der HSP90-Inhibition beruhen (Fortugno et al. 2003). In den mit HSP90-Inhibitoren behandelten HT1080-Tumorzellen war die Expression von Survivin zuerst erhöht (Abb. 3.1.7), dann 24 h später in Kombination mit Bestrahlung reduziert (Abb. 3.1.8). Die Überexpression von Survivin nach erhöhtem zellulären Stress wurde auch in anderen Studien beobachtet (Belyanskaya et al. 2005; Cheung et al. 2010) und suggeriert einen möglichen kompensatorischen Mechanismus, um ein Zellüberleben in manchen Zelllinien zu ermöglichen (Yamamoto et al. 2008). Die Expression von Survivin wurde in der SNB19-Tumorzelllinie durch die HSP90-Inhibition nicht betroffen.

In weiteren Versuchen wurde das Ausmaß an DNA-Fragmentierung mittels Comet Assay (Kapitel 3.1.5) sowie die Expression von γ H2AX als sensitiver Marker für DNA-Doppelstrangbrüche (Kapitel 3.1.6) analysiert. Außerdem wurde die Expression wichtiger DNA-Reparaturproteine mittels Western Blot detektiert (Kapitel 3.1.7), um die Wirkung der HSP90-Inhibition und Bestrahlung auf die DNA-Reparatur zu untersuchen.

Entgegen unserer Erwartung führte die Kombination der pharmakologischen HSP90-Inhibition mit der Bestrahlung zu geringeren TM-Werten im alkalinen Comet Assay, d.h. geringere DNA-Fragmentierung, im Vergleich zu alleiniger Bestrahlung (Abb. 3.1.9, Tabelle 3.1.2). Für die geringere DNA-Fragmentierung scheint die Tatsache verantwortlich zu sein, dass die HSP90-Inhibitoren starke Zellzyklusstörungen verursachen, nämlich S-Phase-Depletion und G2/M-Arrest (siehe Abb. 3.1.13 und 3.1.14). Da der Comet Assay Veränderungen in der Chromatinintegrität in Abhängigkeit der Zeit nach Bestrahlung detektiert, können sich Unterschiede in der Chromatinkompaktierung, die aufgrund von Zellzyklusphasen entstehen, auf die Ergebnisse auswirken (Noz et al. 1996). Olive und Banáth zeigten, dass Zellen in der S-Phase die höchsten TM-Werte im alkalinen Comet Assay

aufgrund der aktiven Replikation aufwiesen, während die TM-Werte der Zellen in der G2/M-Phase niedriger als die TM-Werte der Zellen in der G1-Phase waren (Olive and Banáth 1993). Daher kann die geringere DNA-Fragmentierung in den mit HSP90-Inhibitoren behandelten und zusätzlich bestrahlten Tumorzellen durch die zellzyklusabhängigen Unterschiede in der DNA-Chromatinkompaktierung erklärt werden. Allerdings konnte die von uns beobachtete geringere DNA-Fragmentierung nach HSP90-Inhibition und Bestrahlung von Koll und Kollegen nicht bestätigt werden (Koll et al. 2008), in deren Studie die bestrahlten 17-DMAG behandelten Tumorzellen höhere TM-Werte im Vergleich zu den unbehandelten Proben zeigten. Diese Unstimmigkeit lässt sich durch die unterschiedliche experimentelle Vorgehensweise bei Koll und Kollegen (Abschaben der Zellen in eiskaltem PBS statt Trypsinisierung, Auswahl der Tumorzelllinien usw.) erklären. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen aus Olive et al. (1990) ging die induzierte DNA-Fragmentierung in unseren Versuchen innerhalb von 30 min zurück (Abb. 3.1.9). Ein weiteres Ergebnis war eine langsamere Restitution der chromosomalen DNA nach HSP90-Inhibition und Bestrahlung.

Um den Einfluss der neuartigen HSP90-Inhibitoren auf die strahleninduzierten DNA-Schäden und deren Reparatur zu untersuchen, wurde weiterhin die Expression von phosphoryliertem Histon H2AX (γ H2AX), einem sensitiven Marker für DNA-Doppelstrangbrüche (Rogakou et al 1998), durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei wurde gezeigt, dass die pharmakologische HSP90-Inhibition in den meisten Tumorzelllinien zu signifikanten Veränderungen in der γ H2AX-Expression führte. Die bimodale Verteilung der FACS-Histogramme nach HSP90-Inhibition, bestehend aus Subpopulationen mit unterschiedlicher Menge an γ H2AX, d.h. unterschiedlicher Anzahl an DNA-DSB, deutet auf unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber HSP90-Inhibition innerhalb einer Zellpopulation hin (Abb. 3.1.10). Da sich die Tumorzellen vor der Behandlung in der exponentiellen Phase befanden (Abb. 3.1.13), handelte es sich eher um eine zelltypspezifische als um eine zellzyklusabhängige Empfindlichkeit gegenüber HSP90-Inhibition. Die Kombination der Bestrahlung mit HSP90-Inhibitoren führte zu zusätzlichen DNA-Schäden verglichen mit jeder Behandlung alleine, was die Interaktion der HSP90-Inhibitoren mit der DNA-Reparatur bestätigt. Zudem weist die erhöhte Expression von γ H2AX bis zu 48 h nach Behandlung mit HSP90-Inhibitoren (Abb. 3.1.11) auf eine Verzögerung der Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB nach HSP90-Inhibition hin.

Um den Einfluss der HSP90-Inhibition auf die DNA-Reparatur zu bestätigen, wurde die Expression diverser DNA-Reparaturproteine mittels Western Blot analysiert (Abb. 3.1.12). Dabei wurde die Reduktion der DNA-Reparaturproteine KU70 und KU80 nach Behandlung

mit HSP90-Inhibitoren nachgewiesen, während andere DNA-Reparaturproteine (RAD50, DNA-PK, RAD51 und BRCA2) nicht betroffen waren. Obwohl KU70/KU80 keine bekannten HSP90-Klientenproteine sind, scheint die Expression dieser DNA-Reparaturproteine indirekt von der HSP90 reguliert zu sein. Die Hemmung der Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden wurde auch in anderen Studien beobachtet, und wurde als eine mögliche Ursache für die durch HSP90-Inhibition vermittelte Radiosensibilisierung erwähnt (Dote et al. 2006; Noguchi et al. 2006).

Um weitere Faktoren für die Radiosensibilisierung nach HSP90-Inhibition zu bestimmen, wurde der Einfluss der HSP90-Inhibition und Bestrahlung auf den Zellzyklus durchflusszytometrisch analysiert (Kapitel 3.1.8) sowie die Expression bestimmter Zellzyklus-regulierender Proteine mittels Western-Blot untersucht (Kapitel 3.1.9).

Die pharmakologische HSP90-Inhibition hatte in allen getesteten Tumorzelllinien einen G2/M-Arrest zur Folge (Abb. 3.1.13 und Tabelle 3.1.3). Die zusätzliche Bestrahlung erhöhte den G2/M-Arrest in den mit NVP-BEP800 behandelten Tumorzellen (Abb. 3.1.14). Zusätzlich zu einem G2/M-Arrest führte NVP-AUY922 zu einer temporären S-Phase-Depletion. Unsere Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, wo 17-DMAG oder NVP-AUY922 eine S-Phase Depletion und einen G2/M-Arrest bewirkten (Eccles et al. 2008; Koll et al. 2008). Allerdings scheint die Kombination der Bestrahlung mit HSP90-Inhibition nicht generell zu den von uns beobachteten Zellzyklusstörungen (G2/M-Arrest und S-Phase Depletion) zu führen. Bull und Kollegen berichteten von einem Austritt der mit 17-DMAG-behandelten Tumorzellen (U251, MiaPaCa, DU145, alle drei mit Mutationen in p53) aus dem durch die Bestrahlung induzierten G2- und S-Phase-Arrest (Bull et al. 2004). Geldanamycin oder 17-DMAG bewirkte zudem die Aufhebung des durch die Bestrahlung induzierten G2-Arrest in Kolonkarzinoma-Tumorzellen mit gestörtem p53-Signalweg (Moran et al. 2008). Es ist bekannt, dass der Zellzyklus eine entscheidende Rolle für die spezifische zelluläre Empfindlichkeit gegenüber Bestrahlung spielt, wobei die Strahlenempfindlichkeit in der Mitose am höchsten und die Strahlenresistenz in der späten S-Phase am höchsten ist (Pawlik & Keyomarsi 2004). Daher könnte die Akkumulation der Zellen in der strahlenempfindlichen G2/M-Phase sowie die Reduktion der Zellen in der strahlenresistenten S-Phase nach HSP90-Inhibition (Abb. 3.1.14) eine weitere Ursache für die von uns beobachtete erhöhte Strahlenempfindlichkeit der Tumorzellen sein (Abb. 3.1.2).

Da wichtige Zellzyklus-regulierende Proteine, darunter CDK1, CDK2 und CDK4, bekannte HSP90-Klientenproteine sind, wurde ihre Expression nach pharmakologischer HSP90-Inhibition analysiert (Abb. 3.1.15). Dabei wurde eine Reduktion von CDK4 in allen

Tumorzelllinien und in unterschiedlichem Maß beobachtet. Außerdem zeigten beide Tumorzelllinien mit WT p53 eine Depletion des p(Ser780)RB Proteins nach Behandlung mit NVP-AUY922 und 17-DMAG. CDK4 ist im Komplex mit CDK6 und Zyklin D bei der Phosphorylierung des RB-Proteins an der Aminosäure Ser780 involviert (Kitagawa et al. 1996). Somit zeigt die Reduktion des Substrates (phosphoryliertes RB-Protein) indirekt die Inhibition der vorangeschalteten Kinasen CDK4 und CDK6 (Sauvageot et al. 2009). Ohne die Hyperphosphorylierung des RB-Proteins wird die DNA-Synthese nicht eingeleitet und die Zellen bleiben in der G1-Phase (Kasten & Giordano 1998). Die Reduktion von CDK4 sowie die Depletion von p(Ser780)RB nach HSP90-Inhibition verhindern somit die Progression des Zellzyklus in die S-Phase und unterstützen die beobachtete Reduktion der S-Phase (Abb. 3.1.13 und Abb. 3.1.14). Außerdem reduzierte die pharmakologische HSP90-Inhibition die Menge von CDK1, die notwendig für die Zellzyklusprogression in die Mitose ist. Insgesamt korrelierte die Degradation der Zellzyklus-regulierenden Proteine mit den Zellzyklusstörungen (G2/M-Arrest und S-Phase Depletion), die nach pharmakologischer HSP90-Inhibition beobachtet wurden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit den neuartigen HSP90-Inhibitoren NVP-AUY922 und NVP-BEP800 24 h vor der Bestrahlung zur Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit aller getesteter Tumorzelllinien führte, unabhängig vom p53-Status. Der Mechanismus der Radiosensibilisierung nach HSP90-Inhibition scheint komplex zu sein und basiert auf die simultane Degradation der HSP90-Klientenproteine. Manche HSP90-Klientenproteine sind wichtige Bestandteile zellulärer Signaltransduktionswege, welche das Zellüberleben unterstützen und die Apoptose inhibieren (AKT, RAF-1). Andere HSP90-Klientenproteine regulieren die Zellproliferation (CDK1, CDK4) oder sind in der DNA-Reparatur involviert. Die simultane Depletion dieser Proteine nach pharmakologischer HSP90-Inhibition ermöglicht die gleichzeitige Blockierung multipler Signaltransduktionswege, wodurch die Tumorzellen radiosensibilisiert werden.

Weitere Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass der HSP90-Inhibitor NVP-AUY922 die Strahlenempfindlichkeit der Tumorzelllinien A549 und SNB19 auch unter Hypoxie erhöht (Djuzenova et al. 2012). Dies ist von großer Bedeutung für die Strahlentherapie, da viele Tumoren eine erhöhte Strahlenresistenz bei strahlentherapeutisch relevanten Dosen unter hypoxischen und anoxischen Bedingungen zeigen (Brown & Giaccia 1998; Vaupel & Mayer 2007). Weiterhin konnte der radiosensibilisierende Effekt von NVP-AUY922 oder NVP-BEP800 in der SNB19-Tumorzelllinie gesteigert werden, wenn die Tumorzellen bis zu 48 h nach Bestrahlung in Medium inkubiert wurden, welches

HSP90-Inhibitoren enthielt (Niewidok et al., unpublizierte Daten). Diese *in vitro* Ergebnisse unterstützen die Anwendung von NVP-AUY922 und NVP-BEP800 für *in vivo* Studien in Xenograft-Tiermodellen alleine oder in Kombination mit der Bestrahlung. In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits die Wirkung von NVP-AUY922 in Maus-Xenograft-Tiermodellen in Kombination mit Bestrahlung untersucht. Dabei bewirkte die alleinige NVP-AUY922-Behandlung eine Stagnierung des Tumorenwachstums. Die mit HSP90-Inhibition kombinierte Radiotherapie erhöhte die Überlebensrate der Versuchstiere signifikant (Kuger et al., unpublizierte Daten). Diese Ergebnisse sind von besonderem Interesse für die Strahlentherapie, da NVP-AUY922 bereits in klinischen Studien getestet wird (siehe www.clinicaltrials.gov).

Die Behandlung mit NVP-AUY922 und NVP-BEP800 führte gleichzeitig zur Hochregulation von HSP90 und HSP70. Die gesteigerte Expression der Hitzeschockproteine nach pharmakologischer HSP90-Inhibition wurde in mehreren Studien beschrieben (Drysdale et al. 2006; Zaarur et al. 2006; Powers & Workman 2007; Powers et al. 2008). Die erhöhte Menge an molekularen Chaperonen übt eine Zellschutzfunktion aus, indem sie die Solubilisierung der Proteinaggregate, die Renaturierung der beschädigten Proteine oder deren Degradation, sowie die Faltung der neusynthetisierten Proteinen übernehmen (Sarto et al. 2000). Sowohl HSP90 als auch HSP70 spielen eine aktive Rolle bei der Regulation der Apoptose durch die Inhibition der pro-apoptotischen Komponenten des Apoptosesignalwegs (Beere 2004). Die anti-apoptotischen Eigenschaften von HSP90 und HSP70, die infolge der HSP90-Inhibition überexprimiert werden, könnten die radiosensibilisierende Wirkung der HSP90-Inhibitoren vermindern. Daher scheint die Unterdrückung der Hochregulation dieser Stressproteine eine Möglichkeit, die radiosensibilisierende Wirkung der HSP90-Inhibitoren zu erhöhen. Zwei Strategien wurden in dieser Arbeit getestet: einerseits die temporäre Herunterregulierung der Genexpression mittels siRNA (Kapitel 3.2), andererseits die Unterdrückung der Hochregulation von HSP90 und HSP70 mit dem HSF-1-Inhibitor KNK437 (Kapitel 3.3).

4.2. Einfluss des siRNA-vermittelten HSP90 α -Knock-downs alleine oder in Kombination mit HSP90-Inhibition auf die Strahlenantwort humaner Tumorzelllinien

In dieser Arbeit wurden siRNAs gegen die stressinduzierbare HSP90 α -Isoform (HSP90AA1, Gen ID 3320) verwendet, um die Expression von HSP90 α zu unterdrücken. Der Effekt des HSP90 α -Knock-downs in Kombination mit Bestrahlung und/oder HSP90-Inhibition mittels NVP-AUY922 wurde in den humanen Tumorzelllinien A549 und GaMG untersucht. Hierbei soll die Transfektion mit siRNA gegen HSP90 α die NVP-AUY922-induzierte Hochregulation von HSP90 α vermindern, wodurch die Erhöhung der radiosensibilisierenden Wirkung von NVP-AUY922 zu erwarten wäre.

Da die Effizienz des Knock-downs unter anderem von der Sequenz der verwendeten siRNAs abhängig ist, wurden vier verschiedenen siRNAs, komplementär zu unterschiedlichen Regionen der mRNA Sequenz (RefSeq NM_005348.3), verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit siRNA gegen HSP90 α sowohl das HSP90 α mRNA Transkript als auch die HSP90 α Proteinmenge in beiden Tumorzelllinien reduzierte (Abb. 3.2.2).

Allerdings hatte der Knock-down von HSP90 α keinen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit der getesteten Tumorzelllinien (Abb. 3.2.3, Tabelle 3.2.1). Außerdem blieben die Zellviabilität (Abb. 3.2.5) und die Teilungsfähigkeit (Abb. 3.2.5 und Abb. 3.2.7) der getesteten Tumorzelllinien nach dem Knock-down von HSP90 α unverändert. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen zeigten Chatterjee und Kollegen, dass der transiente siRNA-vermittelte Knock-down von HSP90 α keinen Einfluss auf die Zellviabilität der Multiplenmyeloma-Tumorzelllinien hatte (Chatterjee et al. 2007).

In weiteren Versuchen wurden die transfizierten Tumorzellen zusätzlich mit NVP-AUY922 behandelt. Dabei konnten keine Veränderungen der Zellviabilität im Vergleich zu alleiniger NVP-AUY922-Behandlung detektiert werden (Abb. 3.2.4). Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen reduzierte der siRNA-vermittelte Knock-down von HSP90 α die Zellviabilität von U87-MG in Kombination mit Temozolomid (Cruickshanks et al. 2010). Das deutet darauf hin, dass die Herunterregulierung der HSP90 α -Expression unterschiedliche Wirkungen haben kann, je nach Zelllinie und zusätzlicher Behandlung.

Weiterhin haben wir gezeigt, dass der temporäre HSP90 α -Knock-down die Hochregulation von HSP90 α infolge der HSP90-Inhibition mittels NVP-AUY922 um den Faktor 2 unterdrückte (Abb. 3.2.8). Allerdings konnte die Unterdrückung der Hochregulation von

HSP90 α keine Erhöhung der radiosensibilisierenden Wirkung von NVP-AUY922 in keiner der getesteten Tumorzelllinien hervorrufen (Abb. 3.2.6).

Die Western-Blot-Analysen zeigten unveränderte Expression der analysierten HSP90-Klientenproteine RAF-1, AKT, CDK1 und CDK4 (Abb. 3.2.8). Dies legt nahe, dass der siRNA-vermittelte Knock-down von HSP90 α (um etwa 50%) die Chaperonfunktion von HSP90 in beiden Tumorzelllinien nicht beeinflusste.

Des Weiteren hatte der siRNA-vermittelte Knock-down von HSP90 α keine Wirkung auf die Induktion und Reparatur der DNA-Schäden nach Bestrahlung in der A549-Tumorzelllinie (Abb. 3.2.9). Dagegen wurde in den GaMG-Tumorzellen ein moderater Anstieg der DNA-Schäden, gemessen über die Phosphorylierung von Histon γ H2AX, nach HSP90 α -Knock-down und Bestrahlung beobachtet. Die Erhöhung der DNA-Schäden in der GaMG-Tumorzelllinie korrelierte mit einer gesteigerten Expression von PARP (Abb. 3.2.8B), ein DNA-Reparaturprotein, dessen Aktivität infolge von DNA-Schäden steigt (Los et al. 2002). Dennoch konnte nach Transfektion beider Tumorzelllinien mit siRNA gegen HSP90 α kein inaktiviertes PARP als Anzeichen von Apoptose detektiert werden (Abb. 3.2.8).

In Gegensatz zur temporären Reduktion der HSP90 α -Proteinmenge mittels siRNA, blockiert der HSP90-Inhibitor NVP-AUY922 die ATP-Bindungstasche von HSP90 (Pearl & Prodromou 2006). Dadurch ist seine Funktion als molekulares Chaperon vollständig inhibiert, infolge dessen die HSP90-Klientenproteine degradiert werden (Pearl & Prodromou 2006). Die HSP90-Inhibition mittels NVP-AUY922 führte zu zytotoxischen (Abb. 3.2.4) und zytostatischen Wirkungen (Abb. 3.2.5), zu gesteigerten DNA-Schäden und zur Verlangsamung der DNA-Reparatur (Abb. 3.2.9) sowie zur Apoptose (Abb. 3.2.8). Die Summe dieser Effekte führte zu der im Kolonietest beobachteten gesteigerten Strahlenempfindlichkeit beider Tumorzelllinien (Abb. 3.2.6).

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die Transfektion mit siRNA gegen HSP90 α die Menge des HSP90 α -Proteins in beiden Tumorzelllinien um 50% reduzierte. Außerdem unterdrückte die Transfektion mit siRNA gegen HSP90 α die NVP-AUY922-vermittelte Hochregulation von HSP90 α in beiden Tumorzelllinien. Allerdings reichte die siRNA-vermittelte Suppression von HSP90 α (um circa 50%) nicht aus, um die radiosensibilisierende Wirkung von NVP-AUY922 zu erhöhen. Der Hauptgrund dafür scheint die Tatsache zu sein, dass die partielle Unterdrückung der HSP90 α -Expression mittels siRNA die Chaperonfunktion von HSP90 nicht beeinflusst. Die restlichen Mengen von HSP90-Protein (mindestens 50% des HSP90 α -Proteins sowie die komplette HSP90 β -Isoform) scheinen ausreichende Chaperonfunktion ausüben zu können.

4.3. Einfluss der Suppression der Stressantwort nach HSP90-Inhibition mittels des HSF-1-Inhibitors KNK437 auf die Strahlenantwort humaner Tumorzelllinien

Eine weitere Strategie um die pharmakologische HSP90-Inhibition als adjuvante Behandlung für die Strahlentherapie zu optimieren war die Inhibition der Stressantwort. In dieser Arbeit wurde KNK437 verwendet, eine Benzyliden-Verbindung, die die Expression diverser stress-induzierbarer Hitzeschockproteine wie HSP110, HSP70 und HSP40 unterdrückt, ohne die Expression von konstitutiv exprimierten HSC70- und HSP90-Proteine zu beeinflussen (Powers & Workman, 2007). Der Mechanismus der KNK437-vermittelten Inhibition der HSP-Expression ist noch nicht vollständig verstanden, allerdings scheint die Aktivierung des Transkriptionsfaktors für die HSP-Gene, HSF-1, durch KNK437 inhibiert zu sein (Ohnishi et al. 2004).

Die simultane Behandlung mit KNK437 erhöhte die apoptotische Wirkung von 17-AAG in der akuten lymphatischen Leukämiezelllinie HL-60 (Guo et al. 2005). Die Vorbehandlung mit KNK437 erhöhte den pro-apoptotischen Effekt der Hyperthermie, gemessen über durchflusszytometrische Annexin-Färbung sowie den Nachweis von Caspase-3 und inaktivem PARP, in den Prostatakarzinomlinien PC-3 und LNCaP (Sahin et al. 2011). Wie mittels Kolonietest gezeigt, erhöhte KNK437 die radiosensibilisierende Wirkung der Hyperthermie in der A549-Tumorzelllinie (Sakurai et al. 2005). Außerdem wurde eine gesteigerte Zytotoxizität gemessen, wenn Pankreaskarzinomlinien mit Gemcitabin und KNK437 statt mit dem Zytostatikum Gemcitabin alleine behandelt wurden (Taba et al. 2011). Daher scheint die KNK437-vermittelte Unterdrückung der Stressantwort eine weitere Strategie zu sein, um die Radiosensibilisierung nach HSP90-Inhibition zu erhöhen.

Der Einfluss der Behandlung mit KNK437 und NVP-AUY922 wurde auf die Strahlenantwort der Tumorzelllinien A549 und GaMG untersucht. Die Tumorzelllinien wurden simultan für 24 h mit beiden Inhibitoren behandelt. Mittels *in vitro* Zytotoxizitätstest wurde die optimale Kombination der Substanzen bestimmt: 50 µM KNK437 und 50 nM NVP-AUY922 (65% Zellviabilität für beide Tumorzelllinien) sowie 100 µM KNK437 und 200 nM NVP-AUY922 (bei einer Zellviabilität von 50% für GaMG und 65% für A549). Anschließend wurden die Tumorzellen mit 8 Gy bestrahlt und analysiert.

Die Behandlung mit KNK437 alleine erhöhte die Strahlenempfindlichkeit der Lungenkarzinomlinie A549 (Abb. 3.3.3). In Übereinstimmung mit unserem Ergebnis wurde eine radiosensibilisierende Wirkung in der A549-Tumorzelllinie nach alleiniger Behandlung mit

KNK437 beobachtet, wobei der Mechanismus der Radiosensibilisierung unbekannt ist (Sakurai et al. 2005). Im Gegensatz zu A549 war die Strahlenempfindlichkeit der Glioblastomlinie GaMG durch die Behandlung mit KNK437 nicht beeinflusst (Abb. 3.3.3). In anderen Glioblastomlinien (A-172 und SAS) stieg allerdings die Überlebensfraktion nach Kombination der Bestrahlung mit KNK437 im Vergleich zu alleiniger Bestrahlung (Ohnishi et al. 2006), was darauf hinweist, dass die Wirkung von KNK437 zelltypabhängig ist.

Die Behandlung mit KNK437 hatte keinen Einfluss auf die Expression von HSP90 und HSP70 in beiden Tumorzelllinien, unabhängig von der Bestrahlung. Außerdem blieb die Expression der HSP90-Klientenproteine AKT und RAF-1 unverändert (Abb. 3.3.4 und Abb. 3.3.5). Allerdings induzierte die Behandlung mit KNK437 in beiden Tumorzelllinien einen G2/M-Arrest (Abb. 3.3.6). Der KNK437-induzierte G2/M-Arrest wurde auch in anderen Studien beschrieben (Sakurai et al. 2005; Ohnishi et al. 2006). Bei Sakurai und Kollegen trug die KNK437-induzierte Akkumulation der A549-Tumorzellen in der radiosensitiven G2/M-Phase zur Radiosensibilisierung bei (Sakurai et al. 2005). Im Gegensatz zu Sakurai und Kollegen, bewirkte der G2/M-Arrest nach KNK437-Behandlung in den Glioblastomzellen A-172 eine KNK437-bedingte Radioresistenz (Ohnishi et al. 2006). In unserer Studie induzierte KNK437 in der Glioblastomlinie GaMG auch einen G2/M-Arrest. Allerdings wurde im Kolonietest weder Radiosensibilisierung noch Radioresistenz nach Behandlung der GaMG-Tumorzelllinie mit KNK437 beobachtet (Abb. 3.3.3). Daher scheint der G2/M-Arrest nach KNK437-Behandlung unterschiedliche Auswirkungen auf die Strahlenempfindlichkeit der getesteten Tumorzelllinien zu haben, je nach Zelltyp, und kann nur teilweise die Radiosensibilisierung in der A549-Tumorzelllinie erklären. Ein weiterer Grund für die unterschiedliche Wirkung von KNK437 auf die Strahlenantwort der Tumorzellen könnte die zelltypabhängige Wirkung von KNK437 auf die Induktion und Reparatur der DNA-Schäden sein. Obwohl die Kombination der Bestrahlung mit KNK437 unmittelbar danach (30 min) mehr DNA-Schäden wie nach alleiniger Bestrahlung in beiden getesteten Tumorzelllinien induzierte (Abb. 3.3.7A und B), konnten nur in den mit KNK437-behandelten A549-Tumorzellen bis zu 24 h nach Bestrahlung unreparierte DNA-Schäden detektiert werden (Abb. 3.3.7C und D). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die DNA-Reparatur durch die Behandlung mit KNK437 in der A549-Tumorzelllinie inhibiert sein könnte. Wie Kang und Kollegen zeigten, reduzierte die Behandlung der Hepatomazelllinie HepG2 mit KNK437 die Expression von DNA-PK, einem DSB-DNA-Reparaturprotein (Kang et al. 2008).

Die simultane Behandlung mit KNK437 und NVP-AUY922 führte zu keiner Erhöhung der radiosensibilisierenden Wirkung von NVP-AUY922 in beiden Tumorzelllinien (Abb. 3.3.3).

Wie die Western-Blot-Analysen zeigten, konnte unmittelbar nach simultaner Behandlung mit KNK437 und NVP-AUY922 die NVP-AUY922-vermittelte Hochregulation von HSP90 und HSP70 in beiden Tumorzelllinien unterdrückt werden (Abb. 3.3.4). In der A549-Tumorzelllinie konnte noch 24 h nach dem Auswaschen der Substanzen eine Unterdrückung der NVP-AUY922-vermittelten Hochregulation von HSP90 und HSP70 nachgewiesen werden (Abb. 3.3.5A). Dagegen wurde 24 h nach dem Auswaschen der Substanzen in der GaMG-Tumorzelllinie die gleiche Expression von HSP90 und HSP70 nach simultaner Behandlung wie nach alleiniger NVP-AUY922-Behandlung detektiert (Abb. 3.3.5B), was darauf hinweist, dass der inhibierende Effekt von KNK437 reversibel ist. Trotzdem bewirkte die simultane Behandlung mit KNK437 und NVP-AUY922 in beiden Tumorzelllinien einen anhaltenden G2/M-Arrest (Abb. 3.3.6). Allerdings konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Unterdrückung der Stressantwort nach HSP90-Inhibition auf Transkriptionsebene mittels KNK437 keinen zusätzlichen Einfluss auf die Expression der anti-apoptotischen HSP90-Klientenproteine AKT und RAF-1 in beiden Tumorzelllinien im Vergleich zu alleiniger HSP90-Inhibition hatte (Abb. 3.3.4 und Abb. 3.3.5). Ein weiterer Befund war, dass die inhibierende Wirkung von NVP-AUY922 auf die Reparatur der DNA-Schäden durch die Unterdrückung der Stressantwort mittels KNK437 nicht erhöht wurde: obwohl die Kombination der Bestrahlung mit KNK437 und NVP-AUY922 30 min nach der Bestrahlung zusätzliche DNA-Schäden in beiden Tumorzelllinien induzierte (Abb. 3.3.7A und B), war das Ausmaß der unreparierten DNA-Restschäden 24 h nach der Bestrahlung ähnlich wie nach HSP90-Inhibition und Bestrahlung (Abb. 3.3.7C und D).

Zusammengefasst konnte mittels KNK437 die NVP-AUY922-vermittelte Hochregulation von HSP90 und HSP70 in beiden Tumorzelllinien temporär unterdrückt werden. Obwohl KNK437 in der A549-Tumorzelllinie radiosensibilisierend wirkte, induzierte die Suppression der Stressantwort mittels KNK437 in beiden Tumorzelllinien keine Erhöhung der NVP-AUY922-vermittelten Radiosensibilisierung.

4.5. Zusammenfassung und Ausblick

Trotz der erheblichen Verbesserungen in der medizinischen Versorgung und den dadurch gestiegenen Überlebenschancen bleiben Tumorerkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Für die Behandlung von Tumorerkrankungen wird unter anderen die Strahlentherapie angewendet. Allerdings ist die Wirkung der Bestrahlung durch die Radiotoxizität auf normalem Gewebe sowie durch die Radioresistenz vieler Tumoren bei klinisch relevanten Dosen limitiert. Deswegen gilt die Kombination der Bestrahlung mit Substanzen, die vorzugsweise die Radiotoxizität der Tumorzellen verstärken (Radiosensibilisatoren) als eine vielversprechende Strategie, um die Tumorthherapie zu verbessern. Die bis jetzt angewendeten Radiosensibilisatoren wie PARP-, EGFR- oder VEGFR-Inhibitoren zielen auf einzelne molekulare Komponenten der Mechanismen, die für die Radioresistenz der Tumoren verantwortlich sein können (zusammengefasst in Dumont et al. 2009). Aufgrund der Resistenzen, die gegen diese Therapieansätze entstehen, sind neuartige molekulare Strategien gefragt, um die Strahlentherapie zu verbessern.

Ein vielversprechendes Target für die Radiosensibilisierung scheint das Hitzeschockprotein HSP90 zu sein, ein wichtiges molekulares Chaperon, das für die Faltung, Aktivierung, Translokation und Degradation der so genannten Klientenproteine zuständig ist (Pearl et al. 2008; Whitell & Lindquist 2005). Durch die pharmakologische Blockierung seiner Funktion wird die simultane Degradation multipler HSP90-Klientenproteine eingeleitet, darunter Radioresistenz-assoziierte Proteine wie RAF-1, AKT, EGFR (Camphausen & Tofilon 2007; Dote et al. 2005), Survivin, (Reichert et al. 2011), DNA-Reparaturproteine (Dote et al. 2006). Verschiedene Studien belegen das Potential der HSP90-Inhibitoren Geldanamycin und seiner Derivate als Radiosensibilisatoren (Bisht et al. 2003; Machida et al. 2003; Russell et al. 2003; Bull et al. 2004; Harashima et al. 2005; Dote et al. 2006; Kabakov et al. 2008). Allerdings zeigten diese HSP90-Inhibitoren Limitierungen für die klinische Anwendung hin, darunter geringe Solubilität in Wasser und Toxizität (zusammengefasst in Porter et al. 2010). Die synthetischen HSP90-Inhibitoren NVP-AUY922 und NVP-BEP800 sind wasserlöslich und zeigen anti-proliferative Wirkung *in vitro* und *in vivo* bei gut verträglichen Dosen (Brough et al. 2008; Eccles et al. 2008; Jensen et al. 2008; Stühmer et al. 2009; Stühmer et al. 2008; Bergstrom et al. 2008; Monazzam et al. 2009; Kaiser et al. 2010; Oude Munnink et al. 2010; Nagengast et al. 2010; Gaspar et al. 2010; Massey et al. 2010a; Tauchi et al. 2011).

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von NVP-AUY922 und NVP-BEP800 auf die Strahlenempfindlichkeit humaner Tumorzelllinien unterschiedlicher Entitäten untersucht. Hierbei handelte es sich um eine Lungenkarzinomzelllinie A549 und eine Fibrosarkomzelllinie HT1080, beide mit WT p53-Status sowie zwei Glioblastomzelllinien GaMG und SNB19, beide mit Mutationen in p53. Die optimale Konzentration der verwendeten HSP90-Inhibitoren von 200 nM, bei der die Viabilität der getesteten Tumorzelllinien auf maximal 65% reduziert wurde, wurde mittels *in vitro* Zytotoxizitätstest bestimmt. Mittels Koloniebildungstest wurde gezeigt, dass die Behandlung mit den neuartigen HSP90-Inhibitoren eine strahlensensibilisierende Wirkung in allen getesteten Tumorzelllinien unabhängig von ihren p53-Status hatte, wobei NVP-AUY922 einen stärkeren radiosensibilisierenden Effekt als NVP-BEP800 zeigte.

Die mit HSP90-Inhibitoren behandelten und zusätzlich bestrahlten Tumorzellen wurden mit diversen Methoden charakterisiert, um den Mechanismus der Radiosensibilisierung zu erklären. Hierbei wurde die Apoptoserate, die Induktion und Reparatur der DNA-Schäden sowie der Zellzyklus untersucht. Die durchflusszytometrischen Messungen der subG1-Fraktion ergaben, dass die HSP90-Inhibition den Anteil der Zellen mit hypodiploiden DNA-Gehalt in den meisten untersuchten Tumorzelllinien, außer in der A549-Tumorzelllinie, erhöhte. Außerdem induzierte die HSP90-Inhibition die Depletion der anti-apoptotischen Proteine AKT, pAKT und RAF-1 in allen Tumorzelllinien. Wie die erhöhte Expression von beiden Apoptosemarkern, aktivierte Caspase-3 und inaktiviertes PARP, nahe legt, wurde verstärkt die Caspase-abhängige Apoptose in den meisten untersuchten Tumorzelllinien (außer in der A549-Tumorzelllinie) nach HSP90-Inhibition eingeleitet. Laut Comet Assay induzierte die Behandlung mit den neuartigen HSP90-Inhibitoren eine geringere DNA-Fragmentierung in bestrahlten Tumorzellen, gleichzeitig konnte aber eine langsamere Restitution der chromosomalen DNA festgestellt werden. Mittels durchflusszytometrischer Messungen der γ H2AX-Expression als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche konnte eine erhöhte Induktion von DNA-Schäden nach HSP90-Inhibition und Bestrahlung sowie eine verlangsamte Reparatur der induzierten DNA-Schäden gemessen werden. Die Verlangsamung der Reparatur strahleninduzierten DNA-Schäden nach HSP90-Inhibition korrelierte mit der Depletion der DNA-Reparaturproteine KU70/KU80. Die Analyse der Zellzyklusphasen zeigte, dass die Behandlung mit HSP90-Inhibitoren zu einem ausgeprägten G2/M-Arrest führte, der durch die zusätzliche Bestrahlung verstärkt werden kann. Die Behandlung mit NVP-AUY922 induzierte außerdem eine Depletion der S-Phase. Wie in den Western-Blot-

Analysen ersichtlich, korrelierte die Depletion der Zellzyklus-regulierenden Proteine CDK1 und CDK4 sowie pRB mit den beobachteten Zellzyklusstörungen.

Die hier gewonnenen Ergebnisse verdeutlichen, dass der komplexe Mechanismus der Radiosensibilisierung nach HSP90-Inhibition die simultane Degradation diverser HSP90-Klientenproteine involviert, was verschiedene zelluläre Auswirkungen hat: verlangsamte Zellteilung durch anhaltende Zellzyklusstörungen, erhöhte DNA-Schäden und Verlangsamung der Reparatur der DNA-Schäden nach Bestrahlung sowie Apoptoseinduktion aufgrund von Blockierung diverser anti-apoptotischer Signaltransduktionswege.

Die hier gezeigten *in vitro* Ergebnisse unterstützen die Anwendung von NVP-AUY922 und NVP-BEP800 für *in vivo* Studien in Xenograft-Tiermodellen sowie in klinischen Studien alleine oder in Kombination mit der Bestrahlung. Unsere Arbeit ist von besonderem Interesse für die Strahlentherapie, da NVP-AUY922 bereits in klinischen Studien getestet wird (siehe www.clinicaltrials.gov).

Die HSP90-Inhibition induzierte gleichzeitig die Expression der Hitzeschockproteine HSP90 und HSP70, deren anti-apoptotischen Funktionen die radiosensibilisierenden Effekte der HSP90-Inhibitoren vermindern können. In dieser Arbeit wurden zwei Strategien getestet, um die Hochregulation von HSP90/HSP70 nach HSP90-Inhibition in den Tumorzelllinien A549 und GaMG zu unterdrücken. Zum einen wurden siRNAs gegen die stressinduzierbare α -Isoform von HSP90 angewendet, zum anderen wurde KNK437, eine Substanz die die Expression der HSP auf Transkriptionsebene (HSF-1-Inhibitor) unterdrückt, eingesetzt.

Im zweiten Teil der Arbeit konnten wir zeigen, dass die Behandlung mit siRNA gegen HSP90 α sowohl die mRNA als auch die Proteinmenge von HSP90 α reduzierte. Der Knock-down von HSP90 α hatte keinen Einfluss auf die Zellviabilität oder Teilungsfähigkeit beider Tumorzelllinien. Allerdings induzierte der Knock-down von HSP90 α die Expression von PARP, ein DNA-Reparaturprotein, in der Tumorzelllinie GaMG. Verglichen mit alleiniger Bestrahlung führte die Kombination der Bestrahlung mit siRNA gegen HSP90 α zu leicht erhöhten DNA-Schäden bis zu 24 h post-IR in der GaMG-Tumorzelllinie. Dennoch konnte nach dem HSP90 α -Knock-down kein inaktiviertes PARP als Anzeichen von Apoptose in beiden Tumorzelllinien detektiert werden. Die Vorbehandlung mit siRNA gegen HSP90 α gefolgt von NVP-AUY922 supprimierte die NVP-AUY922-vermittelte Hochregulation von HSP90 α um circa 50%. Allerdings wurde durch die siRNA-vermittelte Unterdrückung der Hochregulation von Hsp90 α keine Erhöhung der NVP-AUY922-vermittelten Radiosensibilisierung erreicht. Es wurden außerdem keine signifikanten Veränderungen betreffend

der Induktion und Reparatur der DNA-Schäden, Zellzyklusverteilung sowie Apoptose-induktion festgestellt. Wie in Western-Blot-Analysen nachgewiesen, hatte der Knock-down von HSP90 α keine zusätzlichen Effekte auf die Expression der getesteten HSP90-Klientenproteine AKT, RAF-1, CDK1 und CDK4 im Vergleich zu NVP-AUY922. Diese Ergebnisse deuten auf eine unveränderte Chaperonfunktion trotz des Knock-downs von HSP90 α hin, was der Hauptgrund für die fehlende Erhöhung der Radiosensibilisierung nach Kombination der Bestrahlung mit siRNA gegen HSP90 α und NVP-AUY922 zu sein scheint.

Im dritten Teil der Arbeit konnten wir zeigen, dass die simultane Behandlung mit NVP-AUY922 und KNK437 die NVP-AUY922-vermittelte Hochregulation von HSP90 und HSP70 in beiden Tumorzelllinien temporär unterdrückt. Obwohl die alleinige Behandlung mit KNK437 in der A549-Tumorzelllinie laut Kolonietest radiosensibilisierend wirkte, konnte die simultane Behandlung mit beiden Inhibitoren die NVP-AUY922-vermittelte Radiosensibilisierung nicht erhöhen. Die Zellzyklus-Analysen zeigten, dass die Unterdrückung der Stressantwort nach HSP90-Inhibition mittels KNK437 in beiden Tumorzelllinien einen anhaltenden G2/M-Arrest induzierte. Allerdings wurde die Expression der anti-apoptotischen HSP90-Klientenproteine AKT und RAF-1 nicht verändert im Vergleich zu alleiniger HSP90-Inhibition. Mittels durchflusszytometrischer Analysen der γ H2AX-Expression konnte gezeigt werden, dass die inhibierende Wirkung von NVP-AUY922 auf die Reparatur der strahleninduzierten DNA-Schäden durch die simultane Behandlung nicht erhöht wurde.

Die Ergebnisse der letzten beiden Abschnitte dieser Arbeit erfordern weitere Experimente, um die Menge an HSP90 α stärker zu reduzieren, zum einen die mehrmalige Behandlung der Tumorzellen mit siRNA gegen HSP90 α , zum anderen die Verwendung von shRNA gegen HSP90 α für einen stabilen Knock-down. Eine weitere Strategie wäre der siRNA-vermittelte Knock-down beider zytoplasmatischer HSP90-Isoformen, HSP90 α und HSP90 β . Weiterhin könnten siRNA gegen HSP90 und HSP70 eingesetzt werden, um die Überexpression beider Chaperone infolge der HSP90-Inhibition zu inhibieren.

4.6. Summary and Outlook

Besides important improvement of tumor therapy, which increased the chance of survival for the patients, cancer remains the second cause of death in Germany. Among others, radiotherapy is one of the treatment options for tumor diseases. However, radiotherapy has some limitations due to the radiotoxicity on normal tissue and to the radioresistance of several tumors at therapeutic doses. The combination of radiotherapy with chemotherapeutical drugs, which preferentially enhance the radiotoxicity of tumor cells (radiosensitizer), seems to be a promising strategy to improve tumor therapy. The radiosensitizer used until now such as PARP, EGFR or VEGFR inhibitors target singular molecular components of signaling pathways, which are thought to contribute to radioresistance (reviewed in Dumont et al. 2009). These single-target therapies are limited by the fact that several tumors can develop resistance to the used drugs.

One of the promising radiosensitizers seems to be the heat shock protein HSP90 – an essential molecular chaperone involved in folding, activation, translocation and degradation of its so called client proteins (Pearl et al. 2008; Whitesell & Lindquist 2005). The pharmacological inhibition of its chaperone function leads to simultaneous degradation of several HSP90 client proteins such as RAF-1, AKT, EGFR (Camphausen & Tofilon 2007; Dote et al. 2005), survivin (Reichert et al. 2011), DNA repair proteins (Dote et al. 2006) and consequent disruption of several radioresistance-associated pathways. Several studies proved the radiosensitizing ability of geldanamycin and its derivatives (Bisht et al. 2003; Machida et al. 2003; Russell et al. 2003; Bull et al. 2004; Harashima et al. 2005; Dote et al. 2006; Kabakov et al. 2008). However, these HSP90 inhibitors showed limitations for their clinical applicability such as low solubility in water and hepatotoxicity (reviewed in Porter et al. 2010). The synthetic HSP90 inhibitors NVP-AUY922 and NVP-BEP800 are water soluble and exhibit strong anti-proliferative activity *in vitro* and *in vivo* at well tolerated doses (Brough et al. 2008; Eccles et al. 2008; Jensen et al. 2008; Stühmer et al. 2009; Stühmer et al. 2008; Bergstrom et al. 2008; Monazzam et al. 2009; Kaiser et al. 2010; Oude Munnink et al. 2010; Nagengast et al. 2010; Gaspar et al. 2010; Massey et al. 2010; Tauchi et al. 2011).

In the first part of this work, we tested the effect of NVP-AUY922 and NVP-BEP800 on the radiation response of tumor cell lines of different entities and with different genetical background. Two of the tested tumor cell lines, the lung carcinoma A549 and the fibrosarcoma HT1080 had WT p53, whereas the glioblastoma cell lines GaMG and SNB19 had mutated p53. The optimal concentration of the novel HSP90 inhibitors (200 nM), at

which the viability of the tested tumor cell lines was reduced to a maximum of 65%, was determined by an *in vitro* cell viability assay. The colony forming assay revealed that pre-treatment with the novel HSP90 inhibitors increased the radiosensitivity of all tested tumor cell lines, independent of their p53 status. In addition NVP-AUY922 showed a stronger radiosensitizing effect than NVP-BEP800.

To determine the mechanism of radiosensitization after HSP90 inhibition, we analysed apoptosis, induction and repair of DNA damage as well as cell cycle phases using different methods. We found that HSP90 inhibition led to an increased percentage of tumor cells with hypodiploid DNA content (subG1 fraction) in most tested cell lines (to a lesser extent in A549). Moreover, HSP90 inhibition led to the depletion of the anti-apoptotic HSP90 client proteins AKT, pAKT and RAF-1. In addition, it increased the pro-apoptotic caspase-3 and PARP cleavage in most of the tested cell lines (except A549). Our comet assay revealed a lower DNA fragmentation in drug-treated and irradiated tumor cells. However, the restoration of DNA damage after irradiation occurred more slowly in most of the tested cell lines pretreated with HSP90 inhibitors compared with irradiation alone. Measurements of γ H2AX expression as a sensitive marker for DNA-DSB showed an increased induction of DNA damage as well as DNA repair protraction in drug-treated and irradiated tumor cells. Inhibition of DNA repair after HSP90 inhibition was supported by the depletion of the DNA repair proteins KU70/KU80 detected by western blot. Our cell cycle analyses showed that the treatment with the novel HSP90 inhibitors led to an increased G2/M-arrest, which could be enhanced by irradiation. In addition, treatment with NVP-AUY922 induced S-Phase depletion. Western blot analyses revealed that the cell cycle disturbances correlated with the drug-mediated degradation of cell cycle regulating proteins CDK4, CDK1 and pRB.

In conclusion, our results made clear that the complex mechanism of radiosensitization involves simultaneous degradation of several HSP90 client proteins, thus causing slower proliferation of the tumor cells due to dramatic cell cycle disturbances, increased DNA damage and protraction of DNA repair after irradiation as well as apoptosis induction due to impairment of several anti-apoptotic pathways.

Our *in vitro* results support the use of the novel HSP90 inhibitors in *in vivo* studies with xenograft animal models as well as in clinical studies alone or in combination with irradiation. This work is of particular interest for the radiation therapy of cancer, because the novel HSP90 inhibitor NVP-AUY922 is currently in clinical trials (www.clinicaltrials.org).

However, the radiosensitizing effect of the novel HSP90 inhibitors might be limited by the simultaneous drug-mediated induction of the expression of the anti-apoptotic heat shock proteins HSP90 and HSP70. In this study, we tested two strategies to suppress the drug-mediated up-regulation of HSP90 and HSP70 in the tumor cell lines A549 and GaMG. The first strategy was the siRNA-mediated down-regulation of the stress-inducible isoform HSP90 α , combined with drug treatment and irradiation. The second strategy was the inhibition of the stress response by simultaneous treatment with the HSF-1 inhibitor KNK437.

In the second part of this work we could show that treatment with siRNA against HSP90 α reduced the mRNA and the protein level of HSP90 α in both tumor cell lines. Silencing of HSP90 α did not alter viability or proliferation rate in both cell lines. Treatment with siRNA against HSP90 α increased the levels of PARP, a DNA repair protein, in GaMG cells. As detected by γ H2AX, silencing of Hsp90 α slightly increased IR-mediated DNA damage up to 24 h post-IR in GaMG cells. However, silencing of Hsp90 α did not induce pro-apoptotic PARP cleavage in both tested tumor cell lines. Pre-silencing of HSP90 α followed by treatment with NVP-AUY922 indeed reduced the drug-mediated up-regulation of HSP90 α to about 50%. However, pre-silencing of HSP90 α followed by HSP90 inhibition did not enhance the radiosensitizing effect of NVP-AUY922 in both tumor cell lines. In addition, it did not show any significant changes concerning the induction and the repair of DNA damage, the cell cycle distribution or the apoptosis induction compared with drug-only treatment. Our western blot analyses revealed that pre-silencing of HSP90 α followed by treatment with NVP-AUY922 did not change the expression of the tested HSP90 client proteins AKT, RAF-1, CDK1 and CDK4 compared with drug-only treatment. These results suggest unaffected chaperone function in tumor cells pre-silenced for HSP90 α and seems to be the main reason for the lack of increased radiosensitization after combined siRNA, NVP-AUY922 and irradiation treatment.

In the third part of this work we could show that simultaneous treatment with NVP-AUY922 and KNK437 temporarily suppressed the NVP-AUY922-mediated up-regulation of HSP90 and HSP70. Although treatment with KNK437 alone increased the radiosensitivity of A549 tumor cells as shown by colony forming assays, simultaneous treatment with both inhibitors did not increase NVP-AUY922-mediated radiosensitization in both tumor cell lines. Our cell cycle analyses revealed that the suppression of stress response after HSP90 inhibition by KNK437 led to a sustained G2/M-arrest in both tumor cell lines.

However, the expression of the anti-apoptotic proteins AKT and RAF-1 remained unchanged compared with HSP90 inhibition alone. The flow cytometric-based evaluation of γ H2AX expression showed that simultaneous treatment did not enhance NVP-AUY922-mediated inhibition of DNA repair after irradiation.

The results of the second and third part of the work request further investigations. Future experiments should include the repeated delivery of siRNA targeting HSP90 α , in order to reduce more efficiently the expression of HSP90 α protein. Another possibility could be the stable transfection by shRNA, thereby simultaneous silencing of α - and β -isoforms of HSP90 or the treatment with siRNAs against HSP90 and HSP70.

5. Literaturverzeichnis

- Arya R, Mallik M, Lakhota SC. Heat shock genes - integrating cell survival and death. *J Biosci.* 2007 Apr;32(3):595-610. Review. PubMed PMID: 17536179.
- Barksdale, K.A. & Bijur, G.N., 2009. The basal flux of Akt in the mitochondria is mediated by heat shock protein 90. *Journal of Neurochemistry*, 108(5), pp.1289-1299.
- Bartek, J & Lukas, J, 2001. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(6), pp.738-747.
- Beere, H.M., 2004. "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 13), pp.2641-2651.
- Belyanskaya, L.L. et al., 2005. Cisplatin activates Akt in small cell lung cancer cells and attenuates apoptosis by survivin upregulation. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 117(5), pp.755-763.
- Bergstrom, M. et al., 2008. Modeling spheroid growth, PET tracer uptake, and treatment effects of the Hsp90 inhibitor NVP-AUY922. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 49(7), pp.1204-1210.
- Biamonte, M.A. et al., 2010. Heat shock protein 90: inhibitors in clinical trials. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(1), pp.3-17.
- Bischoff, P., Altmeyer, A. & Dumont, F., 2009. Radiosensitising agents for the radiotherapy of cancer: advances in traditional and hypoxia targeted radiosensitisers. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 19(5), pp.643-662.
- Bisht, K.S. et al., 2003. Geldanamycin and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin potentiate the in vitro and in vivo radiation response of cervical tumor cells via the heat shock protein 90-mediated intracellular signaling and cytotoxicity. *Cancer Research*, 63(24), pp.8984-8995.
- Bröker, L.E., Kruyt, F.A.E. & Giaccone, G., 2005. Cell death independent of caspases: a review. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 11(9), pp.3155-3162.
- Brough, P.A. et al., 2008. 4,5-diarylisoaxazole Hsp90 chaperone inhibitors: potential therapeutic agents for the treatment of cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(2), pp.196-218.
- Brown JM, Giaccia AJ. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res.* 1998 Apr 1;58(7):1408-16. Review. PubMed PMID: 9537241.
- Bull, E.E.A. et al., 2004. Enhanced tumor cell radiosensitivity and abrogation of G2 and S phase arrest by the Hsp90 inhibitor 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(23), pp.8077-8084.

- Burdak-Rothkamm, S. & Prise, K.M., 2009. New molecular targets in radiotherapy: DNA damage signalling and repair in targeted and non-targeted cells. *European Journal of Pharmacology*, 625(1-3), pp.151-155.
- Cahill, D., Connor, B. & Carney, J.P., 2006. Mechanisms of eukaryotic DNA double strand break repair. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 11, pp.1958-1976.
- Camphausen, K. & Tofilon, P.J., 2007. Inhibition of Hsp90: a multitarget approach to radiosensitization. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(15 Pt 1), pp.4326-4330.
- Chatterjee, Manik et al., 2007. STAT3 and MAPK signaling maintain overexpression of heat shock proteins 90alpha and beta in multiple myeloma cells, which critically contribute to tumor-cell survival. *Blood*, 109(2), pp.720-728.
- Chaudhury, S., Welch, T.R. & Blagg, B.S.J., 2006. Hsp90 as a target for drug development. *ChemMedChem*, 1(12), pp.1331-1340.
- Chen, B. et al., 2005. The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. *Genomics*, 86(6), pp.627-637.
- Cheung, C.H.A. et al., 2010. Targeting Hsp90 with small molecule inhibitors induces the over-expression of the anti-apoptotic molecule, survivin, in human A549, HONE-1 and HT-29 cancer cells. *Molecular Cancer*, 9, p.77.
- Chinnaiyan, P., Allen, G.W. & Harari, P.M., 2006. Radiation and new molecular agents, part II: targeting HDAC, HSP90, IGF-1R, PI3K, and Ras. *Seminars in Radiation Oncology*, 16(1), pp.59-64.
- Cruickshanks, N. et al., 2010. Can hsp90alpha-targeted siRNA combined with TMZ be a future therapy for glioma? *Cancer Investigation*, 28(6), pp.608-614.
- Djuzenova, C.S. & Flentje, M., 2002. Characterization of Fanconi anemia fibroblasts in terms of clonogenic survival and DNA damage assessed by the Comet assay. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 8(10), pp.BR421-430.
- Djuzenova CS, Blassl C, Roloff K, Kuger S, Katzer A, Niewidok N, Günther N, Polat B, Sukhorukov VL, Flentje M. Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 enhances radiation sensitivity of tumor cell lines under hypoxia. *Cancer Biol Ther*. 2012 Apr 1;13(6). [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22286776.
- Dote, H. et al., 2006. Inhibition of hsp90 compromises the DNA damage response to radiation. *Cancer Research*, 66(18), pp.9211-9220.
- Dote, H. et al., 2005. ErbB3 expression predicts tumor cell radiosensitization induced by Hsp90 inhibition. *Cancer Research*, 65(15), pp.6967-6975.
- Drysdale, M.J. et al., 2006. Targeting Hsp90 for the treatment of cancer. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 9(4), pp.483-495.

- Duerfeldt, A.S. & Blagg, B.S.J., 2010. Hsp90 inhibition: elimination of shock and stress. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20(17), pp.4983-4987.
- Dumont, F., Altmeyer, A. & Bischoff, P., 2009. Radiosensitising agents for the radiotherapy of cancer: novel molecularly targeted approaches. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 19(6), pp.775-799.
- Eccles, S.A. et al., 2008. NVP-AUY922: a novel heat shock protein 90 inhibitor active against xenograft tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Cancer Research*, 68(8), pp.2850-2860.
- Eustace, B.K. & Jay, D.G., 2004. Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 3(9), pp.1098-1100.
- Evan, G. & Littlewood, T., 1998. A matter of life and cell death. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5381), pp.1317-1322.
- Fimognari, C. et al., 2005. A mutated p53 status did not prevent the induction of apoptosis by sulforaphane, a promising anti-cancer drug. *Investigational New Drugs*, 23(3), pp.195-203.
- Folini, M., Pennati, M. & Zaffaroni, N., 2009. RNA interference-mediated validation of genes involved in telomere maintenance and evasion of apoptosis as cancer therapeutic targets. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 487, pp.303-330.
- Fortugno, P. et al., 2003. Regulation of survivin function by Hsp90. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), pp.13791-13796.
- Fujii, Y. et al., 2010. p53 independent radio-sensitization of human lymphoblastoid cell lines by Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Oncology Reports*, 23(1), pp.199-203.
- Gaspar, N. et al., 2010. Mechanistic evaluation of the novel HSP90 inhibitor NVP-AUY922 in adult and pediatric glioblastoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(5), pp.1219-1233.
- Guo, F. et al., 2005. Abrogation of heat shock protein 70 induction as a strategy to increase antileukemia activity of heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-demethoxy geldanamycin. *Cancer Research*, 65(22), pp.10536-10544.
- Gupta, A.K. et al., 2001. The Ras radiation resistance pathway. *Cancer Research*, 61(10), pp.4278-4282.
- Hahnel A, Wichmann H, Kappler M, et al. Effects of osteopontin inhibition on radiosensitivity of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Radiat Oncol*. 2010;5:82.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), pp.57-70.
- Harashima, K. et al., 2005. Heat shock protein 90 (Hsp90) chaperone complex inhibitor, radicicol, potentiated radiation-induced cell killing in a hormone-sensitive prostate cancer cell line through degradation of the androgen receptor. *International Journal of Radiation Biology*, 81(1), pp.63-76.

- Hartl, F.U., 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381(6583), pp.571-579.
- Hollstein, M. et al., 1991. p53 mutations in human cancers. *Science (New York, N.Y.)*, 253(5015), pp.49-53.
- Iliakis, G. et al., 2003. DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene*, 22(37), pp.5834-5847.
- Jensen, Michael Rugaard et al., 2008. NVP-AUY922: a small molecule HSP90 inhibitor with potent antitumor activity in preclinical breast cancer models. *Breast Cancer Research: BCR*, 10(2), p.R33.
- Kabakov, A.E., Makarova, Y.M. & Malyutina, Y.V., 2008. Radiosensitization of human vascular endothelial cells through Hsp90 inhibition with 17-N-allilamino-17-demethoxygeldanamycin. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 71(3), pp.858-865.
- Kaiser, M. et al., 2010. Synergistic action of the novel HSP90 inhibitor NVP-AUY922 with histone deacetylase inhibitors, melphalan, or doxorubicin in multiple myeloma. *European Journal of Haematology*, 84(4), pp.337-344.
- Kang MJ, Jung SM, Kim MJ, Bae JH, Kim HB, Kim JY, Park SJ, Song HS, Kim DW, Kang CD, Kim SH. DNA-dependent protein kinase is involved in heat shock protein-mediated accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha in hypoxic preconditioned HepG2 cells. *FEBS J.* 2008 Dec;275(23):5969-81. PubMed PMID:19021771.
- Kao, G.D., McKenna, W.G. & Yen, T.J., 2001. Detection of repair activity during the DNA damage-induced G2 delay in human cancer cells. *Oncogene*, 20(27), pp.3486-3496.
- Kasten, M.M. & Giordano, A., 1998. pRb and the cdks in apoptosis and the cell cycle. *Cell Death and Differentiation*, 5(2), pp.132-140.
- Kaufmann, J., Ahrens, K. & Santel, A., 2010. RNA interference for therapy in the vascular endothelium. *Microvascular Research*, 80(2), pp.286-293.
- Kitagawa, M. et al., 1996. The consensus motif for phosphorylation by cyclin D1-Cdk4 is different from that for phosphorylation by cyclin A/E-Cdk2. *The EMBO Journal*, 15(24), pp.7060-7069.
- Koishi, M. et al., 2001. The effects of KNK437, a novel inhibitor of heat shock protein synthesis, on the acquisition of thermotolerance in a murine transplantable tumor in vivo. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 7(1), pp.215-219.
- Koll, T.T. et al., 2008. HSP90 inhibitor, DMAG, synergizes with radiation of lung cancer cells by interfering with base excision and ATM-mediated DNA repair. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(7), pp.1985-1992.
- Langer, T., Schlatter, H. & Fasold, H., 2002. Evidence that the novobiocin-sensitive ATP-binding site of the heat shock protein 90 (hsp90) is necessary for its autophosphorylation. *Cell Biology International*, 26(7), pp.653-657.

- Li, D. et al., 2011. Functional Inactivation of Endogenous MDM2 and CHIP by HSP90 Causes Aberrant Stabilization of Mutant p53 in Human Cancer Cells. *Molecular Cancer Research: MCR*, 9(5), pp.577-588.
- Los, M. et al., 2002. Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Molecular Biology of the Cell*, 13(3), pp.978-988.
- Lukas, Jiri, Lukas, C. & Bartek, Jiri, 2004. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair*, 3(8-9), pp.997-1007.
- Machida, H et al., 2003. Geldanamycin, an inhibitor of Hsp90, sensitizes human tumour cells to radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 79(12), pp.973-980.
- Machida, Hikaru et al., 2005. Heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin potentiates the radiation response of tumor cells grown as monolayer cultures and spheroids by inducing apoptosis. *Cancer Science*, 96(12), pp.911-917.
- Marcu, M.G. et al., 2000. The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxyl terminus of the chaperone. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(47), pp.37181-37186.
- Massey, A.J., Schoepfer, Joseph, et al., 2010a. Preclinical antitumor activity of the orally available heat shock protein 90 inhibitor NVP-BEP800. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(4), pp.906-919.
- Matsumoto, Yoshitaka, Machida, Hikaru & Kubota, Nobuo, 2005. Preferential sensitization of tumor cells to radiation by heat shock protein 90 inhibitor geldanamycin. *Journal of Radiation Research*, 46(2), pp.215-221.
- McCready, J. et al., 2010. Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. *BMC Cancer*, 10, p.294.
- Monazzam, A. et al., 2009. Evaluation of the Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 in multicellular tumour spheroids with respect to effects on growth and PET tracer uptake. *Nuclear Medicine and Biology*, 36(3), pp.335-342.
- Moran, D.M. et al., 2008. Geldanamycin promotes premature mitotic entry and micronucleation in irradiated p53/p21 deficient colon carcinoma cells. *Oncogene*, 27(42), pp.5567-5577.
- Murata, S. et al., 2001. CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Reports*, 2(12), pp.1133-1138.
- Nagengast, W.B. et al., 2010. 89Zr-bevacizumab PET of early antiangiogenic tumor response to treatment with HSP90 inhibitor NVP-AUY922. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 51(5), pp.761-767.
- Nakai, A. & Ishikawa, T., 2001. Cell cycle transition under stress conditions controlled by vertebrate heat shock factors. *The EMBO Journal*, 20(11), pp.2885-2895.

- Noguchi, M. et al., 2006. Inhibition of homologous recombination repair in irradiated tumor cells pretreated with Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351(3), pp.658-663.
- Noz, K.C. et al., 1996. Comet assay demonstrates a higher ultraviolet B sensitivity to DNA damage in dysplastic nevus cells than in common melanocytic nevus cells and foreskin melanocytes. *The Journal of Investigative Dermatology*, 106(6), pp.1198-1202.
- Oehler, C. et al., 2007. Current concepts for the combined treatment modality of ionizing radiation with anticancer agents. *Current Pharmaceutical Design*, 13(5), pp.519-535.
- Ohnishi, K et al., 2004. Effects of a heat shock protein inhibitor KNK437 on heat sensitivity and heat tolerance in human squamous cell carcinoma cell lines differing in p53 status. *International Journal of Radiation Biology*, 80(8), pp.607-614.
- Ohnishi, Ken et al., 2006. Induction of radiation resistance by a heat shock protein inhibitor, KNK437, in human glioblastoma cells. *International Journal of Radiation Biology*, 82(8), pp.569-575.
- Okada, H. & Mak, T.W., 2004. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nature Reviews. Cancer*, 4(8), pp.592-603.
- Olive, P.L. & Banáth, J.P., 1993. Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle. *Mutation Research*, 294(3), pp.275-283.
- Olive, P.L., Banáth, J.P. & Durand, R.E., 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiation Research*, 122(1), pp.86-94.
- Oude Munnink, T.H. et al., 2010. (89)Zr-trastuzumab PET visualises HER2 downregulation by the HSP90 inhibitor NVP-AUY922 in a human tumour xenograft. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 46(3), pp.678-684.
- Panner, A. et al., 2007. Heat shock protein 90alpha recruits FLIPS to the death-inducing signaling complex and contributes to TRAIL resistance in human glioma. *Cancer Research*, 67(19), pp.9482-9489.
- Pawlik, T.M. & Keyomarsi, K., 2004. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 59(4), pp.928-942.
- Pearl, L.H. & Prodromou, C., 2006. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annual Review of Biochemistry*, 75, pp.271-294.
- Pearl, L.H., Prodromou, C. & Workman, P., 2008. The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment. *The Biochemical Journal*, 410(3), pp.439-453.
- Peterson, L.B. & Blagg, B.S., 2009. To fold or not to fold: modulation and consequences of Hsp90 inhibition. *Future Medicinal Chemistry*, 1(2), pp.267-283.

- Petrocca, F. & Lieberman, J., 2010. Promise and Challenge of RNA Interference-Based Therapy for Cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21079135> [Accessed November 25, 2010].
- Pietenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology*. 2002 Dec 27;181-182:475-81. Review. PubMed PMID:12505356.
- Piper P.W., Millson S.H. Mechanisms of Resistance to Hsp90 Inhibitor Drugs: A Complex Mosaic Emerges. *Pharmaceuticals*. 2011; 4(11):1400-1422.
- Pirollo, K.F. et al., 1997. Evidence supporting a signal transduction pathway leading to the radiation-resistant phenotype in human tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 230(1), pp.196-201.
- Podhorecka, M., Skladanowski, A. & Bozko, P., 2010. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *Journal of Nucleic Acids*, 2010. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20811597> [Accessed November 30, 2011].
- Porter JR, Fritz CC, Depew KM. Discovery and development of Hsp90 inhibitors: a promising pathway for cancer therapy. *Curr Opin Chem Biol*. 2010 Jun;14(3):412-20. Epub 2010 Apr 19. Review. PubMed PMID: 20409745.
- Powers, M.V. & Workman, P., 2007. Inhibitors of the heat shock response: biology and pharmacology. *FEBS Letters*, 581(19), pp.3758-3769.
- Powers, M.V., Clarke, P.A. & Workman, P., 2008. Dual targeting of HSC70 and HSP72 inhibits HSP90 function and induces tumor-specific apoptosis. *Cancer Cell*, 14(3), pp.250-262.
- Reichert, S. et al., 2011. Survivin inhibition and DNA double-strand break repair: a molecular mechanism to overcome radioresistance in glioblastoma. *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 101(1), pp.51-58.
- Richter, Klaus et al., 2008. Conserved conformational changes in the ATPase cycle of human Hsp90. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(26), pp.17757-17765.
- Robles, A.I. et al., 2006. Schedule-dependent synergy between the heat shock protein 90 inhibitor 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin and doxorubicin restores apoptosis to p53-mutant lymphoma cell lines. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 12(21), pp.6547-6556.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S. & Bonner, W.M., 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(10), pp.5858-5868.
- Rossi, A. et al., 2006. Targeting the heat shock factor 1 by RNA interference: a potent tool to enhance hyperthermochemotherapy efficacy in cervical cancer. *Cancer Research*, 66(15), pp.7678-7685.

- Rödel F, Frey B, Leitmann W, et al. Survivin antisense oligonucleotides effectively radiosensitize colorectal cancer cells in both tissue culture and murine xenograft models. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2008;71(1):247-255.
- Russell, J.S. et al., 2003. Enhanced cell killing induced by the combination of radiation and the heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin: a multitarget approach to radiosensitization. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 9(10 Pt 1), pp.3749-3755.
- Sahin, E. et al., 2011. KNK437, a benzylidene lactam compound, sensitises prostate cancer cells to the apoptotic effect of hyperthermia. *International Journal of Hyperthermia: The Official Journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*, 27(1), pp.63-73.
- Sakurai, H. et al., 2005. Attenuation of chronic thermotolerance by KNK437, a benzylidene lactam compound, enhances thermal radiosensitization in mild temperature hyperthermia combined with low dose-rate irradiation. *International Journal of Radiation Biology*, 81(9), pp.711-718.
- Sarto, C., Binz, P.A. & Mocarelli, P., 2000. Heat shock proteins in human cancer. *Electrophoresis*, 21(6), pp.1218-1226.
- Sauvageot, C.M.-E. et al., 2009. Efficacy of the HSP90 inhibitor 17-AAG in human glioma cell lines and tumorigenic glioma stem cells. *Neuro-Oncology*, 11(2), pp.109-121.
- Schneider, C. et al., 1996. Pharmacologic shifting of a balance between protein refolding and degradation mediated by Hsp90. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(25), pp.14536-14541.
- Schoof, N. et al., 2009. HSP90 is essential for Jak-STAT signaling in classical Hodgkin lymphoma cells. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 7, p.17.
- Sears, R.C. & Nevins, J.R., 2002. Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(14), pp.11617-11620.
- Shah, M.A. & Schwartz, G.K., 2001. Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 7(8), pp.2168-2181.
- Sharma, S.V., Agatsuma, T. & Nakano, H., 1998. Targeting of the protein chaperone, HSP90, by the transformation suppressing agent, radicicol. *Oncogene*, 16(20), pp.2639-2645.
- Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*. 2003 Mar;3(3):155-68. Review. PubMed PMID: 12612651.
- Shintani, S. et al., 2006. P53-dependent radiosensitizing effects of Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin on human oral squamous cell carcinoma cell lines. *International Journal of Oncology*, 29(5), pp.1111-1117.
- Song, X. & Luo, Y., 2010. The regulatory mechanism of Hsp90alpha secretion from endothelial cells and its role in angiogenesis during wound healing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 398(1), pp.111-117.

- Sreedhar, A.S. et al., 2004. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Letters*, 562(1-3), pp.11-15.
- Staab A, Fleischer M, Loeffler J, et al. Small interfering RNA targeting HIF-1 α reduces hypoxia-dependent transcription and radiosensitizes hypoxic HT 1080 human fibrosarcoma cells in vitro. *Strahlenther Onkol.* 2011;187(4):252-259.
- Stingl L, Stühmer T, Chatterjee M, Jensen MR, Flentje M, Djuzenova CS. Novel HSP90 inhibitors, NVP-AUY922 and NVP-BEP800, radiosensitize tumour cells through cell-cycle impairment, increased DNA damage and repair protraction. *Br J Cancer.* 2010 May 25;102(11):1578-91. PubMed PMID: 20502461; PubMed Central PMCID:PMC2883148.
- Stingl L, Niewidok N, Müller N, Selle M, Djuzenova CS, Flentje M. Radiosensitizing effect of the novel Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 in human tumour cell lines silenced for Hsp90 α . *Strahlenther Onkol.* 2012 Mar 24. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22441439.
- Stühmer, T et al., 2008. Signalling profile and antitumour activity of the novel Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 in multiple myeloma. *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 22(8), pp.1604-1612.
- Stühmer, Thorsten et al., 2009. Anti-myeloma activity of the novel 2-aminothienopyrimidine Hsp90 inhibitor NVP-BEP800. *British Journal of Haematology*, 147(3), pp.319-327.
- Taba, K. et al., 2011. KNK437 downregulates heat shock protein 27 of pancreatic cancer cells and enhances the cytotoxic effect of gemcitabine. *Chemotherapy*, 57(1), pp.12-16.
- Tanno, S. et al., 2004. Serine/threonine kinase AKT is frequently activated in human bile duct cancer and is associated with increased radioresistance. *Cancer Research*, 64(10), pp.3486-3490.
- Tao Y, Zhang P, Frascogna V, et al. Enhancement of radiation response by inhibition of Aurora-A kinase using siRNA or a selective Aurora kinase inhibitor PHA680632 in p53-deficient cancer cells. *Br. J. Cancer.* 2007;97(12):1664-1672.
- Tauchi, T. et al., 2011. Combined effects of novel heat shock protein 90 inhibitor NVP-AUY922 and nilotinib in a random mutagenesis screen. *Oncogene*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21278787> [Accessed February 18, 2011].
- Terasawa, K., Minami, Michiko & Minami, Yasufumi, 2005. Constantly updated knowledge of Hsp90. *Journal of Biochemistry*, 137(4), pp.443-447.
- Toulany M, Kehlbach R, Florczak U, et al. Targeting of AKT1 enhances radiation toxicity of human tumor cells by inhibiting DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair. *Mol. Cancer Ther.* 2008;7(7):1772-1781.
- Vabulas RM, Raychaudhuri S, Hayer-Hartl M, Hartl FU. Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Dec;2(12):a004390. Review. PubMed PMID: 21123396.
- Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* 2007 Jun;26(2):225-39. Review. PubMed PMID:17440684.

- Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A.J., 2000. Surfing the p53 network. *Nature*, 408(6810), pp.307-310.
- Wen, K.W. & Damania, B., 2010. Hsp90 and Hsp40/Erdj3 are required for the expression and anti-apoptotic function of KSHV K1. *Oncogene*, 29(24), pp.3532-3544.
- Whitesell, L. & Lindquist, S.L., 2005. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 5(10), pp.761-772.
- Workman, P., 2004. Combinatorial attack on multistep oncogenesis by inhibiting the Hsp90 molecular chaperone. *Cancer Letters*, 206(2), pp.149-157.
- Yamamoto, H., Ngan, C.Y. & Monden, M., 2008. Cancer cells survive with survivin. *Cancer Science*, 99(9), pp.1709-1714.
- Yin, X. et al., 2010. BIIB021, a novel Hsp90 inhibitor, sensitizes head and neck squamous cell carcinoma to radiotherapy. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 126(5), pp.1216-1225.
- Yokota, S, Kitahara, M. & Nagata, K., 2000. Benzylidene lactam compound, KNK437, a novel inhibitor of acquisition of thermotolerance and heat shock protein induction in human colon carcinoma cells. *Cancer Research*, 60(11), pp.2942-2948.
- Young, J.C., Moarefi, I. & Hartl, F.U., 2001. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *The Journal of Cell Biology*, 154(2), pp.267-273.
- Yun, B.-G. et al., 2004. Novobiocin induces a distinct conformation of Hsp90 and alters Hsp90-cochaperone-client interactions. *Biochemistry*, 43(25), pp.8217-8229.
- Zaarur, N. et al., 2006. Targeting heat shock response to sensitize cancer cells to proteasome and Hsp90 inhibitors. *Cancer Research*, 66(3), pp.1783-1791.
- Zhang, H. & Burrows, F., 2004. Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of Hsp90. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 82(8), pp.488-499.
- Zhao, R. et al., 2005. Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone. *Cell*, 120(5), pp.715-727.
- <http://www.picard.ch/downloads/Hsp90facts.pdf>
- http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/core_line_viewer?action=cell_lines
- <http://atlasgeneticsoncology.org/>
- Klinische Strahlenbiologie-kurz und bündig, Herrmann, Baumann und Dörr, 4. Auflage, 2006, Elsevier Urban & Fischer.
- Zell- und Gewebekultur, Lindl und Bauer, 3. Auflage, Stuttgart, Fischer Verlag, 1994.
- Holland-Frei Cancer Medicine, 6th edition, BC Decker 2003, Philadelphia.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen angefertigt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt wurde.

Neben dem akademischen Grad „Diplom-Biologin Univ.“ habe ich keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den.....

.....
Vorname, Name