Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfram T. Knoefel

Survivin: Prognostische und therapeutische Wertigkeit im Liposarkom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von Philipp Martin Schlünder 2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Andreas Krieg

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Pascal Jungbluth

Publikation

Inhalte dieser Dissertation wurden veröffentlicht.

Sabrina Mersch, Jasmin C. Riemer, Philipp M. Schlünder, Markus P. Ghadimi, Hany Ashmawy, Birte Möhlendick, Stefan A. Topp, Tanja Arent, Patric Kröpil, Nikolas H. Stoecklein, Helmut E. Gabbert, Wolfram T. Knoefel, Andreas Krieg. *Peritoneal sarcomatosis: site of origin for the establishment of an in vitro and in vivo cell line model to study therapeutic resistance in dedifferentiated liposarcoma*. Tumor Biol. 15 September 2015. DOI 10.1007/s13277-015-4050-6)

I. Zusammenfassung:

Liposarkome (LPS) stellen als größter Vertreter der Weichteilsarkome eine sehr inhomogene Gruppe von Tumoren dar. Trotz ihrer gemeinsamen Ähnlichkeit zu humanem Fettgewebe gibt es zwischen den Subtypen bei der Prognose und Wirksamkeit von aktuellen Therapieansätzen erhebliche Unterschiede. Somit besteht ein anhaltender Bedarf an subtypen-spezifischen Prognosefaktoren sowie individuellen Therapieansätzen, die die molekularen und genetischen Besonderheiten der LPS aufgreifen.

Diese Arbeit untersucht die prognostische und therapeutische Wertigkeit von Survivin im LPS. Survivin hat regulatorischen Einfluss auf die Apoptosekaskade und bildet ein wichtiges Ziel bei der Bekämpfung von Chemoresistenzen. Zunächst wurde immunhistochemisch die Expression von Survivin im Rahmen einer Kohortenanalyse in Gewebeproben aus LPS von 89 Patienten untersucht. Es folgten Zellkulturversuche an zwei dedifferenzierten LPS (DDLPS) sowie einer pleomorphen LPS (PLS) Zelllinie. Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass Survivin in allen LPS-Subtypen überexprimiert und mit verschiedenen klinischen Parametern assoziiert ist. Die multivariaten Überlebensanalysen zeigten den Subtyp und die Tumorgröße als unabhängigen prognostischen Marker beim LPS. Die Wirkung von YM155, ein Compound welches die Survivin Expression hemmt, zeigte unterschiedliche Wirkungen auf Zellkulturebene. Am deutlichsten waren die Effekte bei der PLS-Zelllinie zu erkennen. Hier konnte erstmals gezeigt werden, dass YM155 beim PLS die Survivin Expression hemmt. In Folge dessen kam es bei diesen Zellen zur gesteigerten Apoptoserate sowie zur Reduktion der Zellviabilität. Diese Arbeit zeigt somit erstmalig den Stellenwert von Survivin und YM155 beim LPS sowie die mögliche Sensibilisierung dieser Zellen durch eine Kombination von YM155 mit verschiedenen Chemotherapeutika. Diese Erkenntnisse könnten die Grundlage weiterer Untersuchungen von Survivin im LPS, sowie neuer Therapieansätze mit YM155 darstellen.

II. Summary:

Liposarcomas (LPS) represent the largest proportion of soft tissue sarcomas and are a very heterogeneous group of tumours. Although they all are similar to human fat tissue one must differentiate between subtypes regarding the prognosis and effectivity of current therapeutic approach. Therefore it is necessary to detect new subtype-specific prognostic factors as well as individual therapeutic approaches that involve the molecular and genetic characteristics of liposarcomas.

This paper surveys the prognostic and therapeutic quality of survivin in LPS. Survivin influences the apoptosis cascade and is an important target in the fight against chemo resistances. Firstly one examined survivin in line of a cohort analysis in samples from liposarcomas of 89 patients. Experiments with cell cultures using two dedifferentiated LPS (DDLPS) as well as a pleomorphic LPS (PLS) cell line followed. These tests were able to show that survivin is overexpressed in all LPS subtypes and that it is associated with different clinical parameters. The multivariate survival analysis revealed that the subtype and the size of the tumour are both independent prognostic markers of LPS. The effect von YM155, a survivin expression inhibiting compound, showed different effects concerning the cell culture. Most prominent were the effects on the cell line of PLS. For the first time one was able to show that YM155 inhibits the expression of survivin in PLS. Subsequently an increased apoptosis rate in these cells could be revealed as well as a reduced metabolism activity. Consequently, this work reveals the significance of survivin and YM155 concerning LPS as well as the possible sensitization of these cells through the combination of YM155 and different chemotherapeutic agents.

These findings could represent the basis of further exploration of survivin in LPS as well as new therapeutic approaches with YM155.

III. Abkürzungen

AJCC	American Joint Committee on Cancer		
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1		
ATP	Adenosintriphosphat		
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer		
Bax	Bcl-2-associated X		
Bcl-2	B-cell lymphoma 2		
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large		
Bid	BH3 interacting-domain death agonist		
BIR	Baculoviral IAP repeat		
BW	Baden-Württemberg		
CAD	Caspase-aktivierte DNase		
CARD	Caspase activation and recruitment domain		
Caspasen	cysteinyl-aspartate specific protease		
CC	Kontingenzkoeffizient		
cDNA	Komplementäre DNA		
cFLIP	Cellular FLICE-inhibitory protein		
CI	Konfidenzintervall		
c-IAP1	Cellular inhibitor of apoptosis protein 1		
c-IAP2	Cellular inhibitor of apoptosis protein 2		
CO ₂	Kohlenstoffdioxid		
CPC	Chromosomal passenger complex		
CT	Cycle of threshold		
c-terminal	Carboxy-terminal		
Cyt c	Cytochrom C		
DAB	3,3'-Diaminobenzidin		
DD	Dimerisierungsdomänen		
DDLPS	Dedifferenziertes Liposarkom		
dH ₂ O	Destilliertes Wasser		
DIABLO	Direct IAP binding protein with low pl		
DISC	Death-inducing signaling complex		
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium		

DMSO	Dimethylsulfoxid		
DNA	Desoxyribunukleinsäure (acid)		
FACS	Fluorescence-activated cell scanning		
FADD	Fas associated via death domain		
FBS	Fetal bovine serum		
FITC	Fluoresceinisothiocyanat		
FNCLCC	French-Fédératon-Nationale-de Centres-de-Lutte-contre-le-Cancer		
FP	Fractional product		
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase		
GI ₅₀	Growth inhibition		
HBXIP	Hepatitis B X-interacting protein		
HPF	High-power field		
HR	Hazard Ratio		
HRP	Horse Radish Peroxidase		
HtrA2	High temperature requirement A		
IAP	Inhibitors of apoptosis proteins		
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration		
ICAD	Inhibitor of Caspase-activated DNAse		
INCEP	Inner centromere protein		
IRS	Immunreaktiver Score		
LPS	Liposarkom		
LRR	Leucine-rich repeat		
Lsg.	Lösung		
MA	Massachusetts		
MDM2	Mouse double minute 2		
MLPS/RCL	Myxoid/Rundzelliges Liposarkom		
MM	Mastermix		
MTD	Maximum Tolerated Dose		
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-		
	2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium		
MW	Mittelwert		
n	Kollektivgröße		
NAIP	Neuronal apoptosis inhibitory protein		

NCLS	Non-small-cell lung cancer
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NOD	Nucleotide-binding oligomerisation
NOS	Nicht weiter spezifiziert
O²	Sauerstoff
OÖ	Oberösterreich
р	Signifikanzniveau/ p-Wert
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction
PI	Propidium iodide
PLS	Pleomorphes Liposarkom
R²	Bestimmtheitsmaß
REMARK	REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies
RING	Really interesting new gene
RNA	Ribonukleinsäure (acid)
rpm	Rounds per minute
RT	Reverse Transkriptase
SCC	Squamous cell carcinoma
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SH	Schleswig-Holstein
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases
Sp1	Specificity protein 1
SVV	Survivin
tBid	Truncated BH3 interacting-domain death agonist
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMA	Tissue microarray
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR1	Tumor necrosis factor Rezeptor-1
Ts-IAP	Testis-specific IAP
UBC	Ubiquitin-conjugating domain
UICC	Union internationale contre le cancer

UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
VS.	Versus
WB	Western Blot
WDLPS	Gut differenziertes Liposarkom
WHO	World Health Organization
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
5J-ÜL	5-Jahres Überleben

SI-Einheiten

Cm ²	Quadratzentimeter
g	Gramm
h	Stunde
kDa	Kilodalton
I	Liter
m²	Quadratmeter
mg	Milligramm
Min.	Minuten
ml	Milliliter
mol	Mol
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
Sek.	Sekunden
V	Volt
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μΙ	Mikroliter
μM	Mikromolar

IV. Inhaltsverzeichnis

1.	. EINLEITUNG			1
	1.1	DAS LIPC	SARKOM	1
	1	1.1.1	Liposarkom Subtypen	4
	1	1.3.1	Therapie und Prognose des Liposarkoms	6
	1.2	DER PRO	GRAMMIERTE ZELLUNTERGANG	8
	1.3	Арортоз	E HEMMER	.13
	1.4	IAPs – Ir	NHIBITORS OF APOPTOSIS PROTEINS	.15
	1	1.4.2	Survivin	. 17
	1	1.4.3	YM155	. 20
	1.5		ARBEIT	.23
2.	ſ	MATERIAL	UND METHODEN	.24
	2.1	MATERIA		.24
		711	l ahoraeräte	 24
	2	717	Chemikalien und Stoffe	25
	-	713	Verbrauchsmaterialien	27
	2	2.1.4	Kommerzielle molekularbioloaische Test-Kits	. 27
	2	2.1.5	Zvtostatika und Hemmstoffe	. 28
	2	2.1.6	Antikörper. Primer. Sonden und RNA	. 28
	2	2.1.7	Zusammensetzuna der Lösunaen/ Puffer	. 29
	ź	2.1.8	Histologische Proben	. 30
	2	2.1.9	Zellkultur – verwendete Zelllinien	. 32
	2	2.1.10	Verwendete Software	. 32
	2.2	Метнор	EN	.33
	2	2.2.1	Zellkultur	. 33
	2	2.2.2	Proteinisolation	. 34
	2	2.2.3	Gelelektrophorese und Western Blot (WB)	. 34
	ź	2.2.4	RNA Isolierung	. 36
	ź	2.2.5	cDNA Synthese	. 36
	ź	2.2.6	Real-Time PCR	. 37
	2	2.2.7	FACS-Analysen	. 39
	2	2.2.8	MTS Assay	.40
	2	2.2.9	Tissue Mikroarray (TMA)	.42
	ź	2.2.10	Immunhistochemie	. 42
	Ź	2.2.11	Statische Datenauswertung	. 44
3.	E		SE	.46
	3.1	Liposari	(OM – STATISTISCHE AUSWERTUNG	.46
	£	3.1.1	Patientenkollektiv	. 46
	3	3.1.2	Survivin im Liposarkom	.51
	E	3.1.3	Überlebensanalysen beim primären Liposarkom	54
	đ	3.1.4	Rezidivkollektiv des Liposarkoms	. 59
	3.2	LIPOSARI	COM IM ZELLKULTURMODELL	.62
	đ	3.2.1	Survivinexpression	. 62
	3	3.2.2	Wirkung von YM155 auf das Liposarkom	64
	3	3.2.3	Wirkung Chemotherapeutika auf Liposarkom-Zelllinien	. 68

4.	4. DISKUSSION		
	4.1 Korr	elationen und Prognosefaktoren beim Liposarkom	74
	4.1.1	Korrelationen zwischen klinischen Parametern	75
	4.1.2	Potentielle Prognosefaktoren beim LPS	75
	4.2 SURVI	VIN IM LIPOSARKOM	79
	4.2.1	Survivinexpression als prognostischer Faktor beim Liposarkom	80
	4.2.2	Survivin als potentielles therapeutisches Ziel im Liposarkom	
	4.3 Снем	OSENSITIVITÄT UND RESISTENZ BEIM DEDIFFERENZIERTEN UND PLEOMORPHEN LIPOSARKOM	84
	4.3.1	Chemosensibilität gegenüber Anthracyclinen und Etoposid	85
	4.3.2	Chemosensibilisierung durch Kombinationen von Compounds	85
	4.4 SCHLU	ISSFOLGERUNG	87

V. Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Signalkaskade der extrinsischen und intrinsischen Apoptose	11
Abb. 2: Unterschiede zwischen Nekrose und Apoptose	12
Abb. 3: Inhibitoren der Apoptose	14
Abb. 4: Survivin Aufbau, Struktur und Funktionen	18
Abb. 5: YM155	21
Abb. 6: QPCR Effizienzkurve für Survivin und GAPDH mit Referenz RNA	
Abb. 7:. FACS Analyse – <i>blank</i> -Kontrolle – Kalibrierung	
Abb. 8: Geschlechtergetrennte Altersverteilung der Patienten mit primärem Liposarkom	
Abb. 9: Häufigkeit des histopathologischen Grading innerhalb der Subtypen	
Abb. 10: Repräsentative Schnitten der TMA-Tumorstanzen nach immunhistochemischer Färbung	51
Abb. 11. Kaplan Meier Kurven für Überlebensanalysen	57
Abb. 12: Kaplan Meier Kurven für Überlebensanalysen	58
Abb. 12: Kaplan Meier Kurven für Überlebensanalysen Abb. 13: Survivin Expression im Zellkulturmodell	58 62
Abb. 12: Kaplan Meier Kurven für Überlebensanalysen Abb. 13: Survivin Expression im Zellkulturmodell Abb. 14: Wirkung von YM155 im Western-Blot und MTS-Assay	58 62 64
Abb. 12: Kaplan Meier Kurven für ÜberlebensanalysenAbb. 13: Survivin Expression im ZellkulturmodellAbb. 14: Wirkung von YM155 im Western-Blot und MTS-AssayAbb. 15: FACS Analysen nach Behandlung mit YM155 für 48 Stunden	58 62 64 66
Abb. 12: Kaplan Meier Kurven für ÜberlebensanalysenAbb. 13: Survivin Expression im ZellkulturmodellAbb. 14: Wirkung von YM155 im Western-Blot und MTS-AssayAbb. 15: FACS Analysen nach Behandlung mit YM155 für 48 StundenAbb. 16: Apoptoserate nach Behandlung mit YM155 für 48 Stunden	58 62 64 66 68
Abb. 12: Kaplan Meier Kurven für ÜberlebensanalysenAbb. 13: Survivin Expression im ZellkulturmodellAbb. 14: Wirkung von YM155 im Western-Blot und MTS-AssayAbb. 15: FACS Analysen nach Behandlung mit YM155 für 48 StundenAbb. 16: Apoptoserate nach Behandlung mit YM155 für 48 StundenAbb. 17: Zellviabilität nach 96 Stunden Inkubation mit Doxorubicin	58 62 64 66 68 69
Abb. 12: Kaplan Meier Kurven für ÜberlebensanalysenAbb. 13: Survivin Expression im ZellkulturmodellAbb. 14: Wirkung von YM155 im Western-Blot und MTS-AssayAbb. 15: FACS Analysen nach Behandlung mit YM155 für 48 StundenAbb. 16: Apoptoserate nach Behandlung mit YM155 für 48 StundenAbb. 17: Zellviabilität nach 96 Stunden Inkubation mit DoxorubicinAbb. 18: Zellviabilität nach 96 Stunden Inkubation mit Etoposid	58 62 64 66 68 69 70
Abb. 12: Kaplan Meier Kurven für ÜberlebensanalysenAbb. 13: Survivin Expression im ZellkulturmodellAbb. 14: Wirkung von YM155 im Western-Blot und MTS-AssayAbb. 15: FACS Analysen nach Behandlung mit YM155 für 48 StundenAbb. 16: Apoptoserate nach Behandlung mit YM155 für 48 StundenAbb. 17: Zellviabilität nach 96 Stunden Inkubation mit DoxorubicinAbb. 18: Zellviabilität nach 96 Stunden Inkubation mit EtoposidAbb. 19: Kombination Doxorubicin + YM155	58 62 64 66 68 69 70

VI. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Stadieneinteilung für Weichteilsarkome modifiziert nach AJCC	3
Tabelle 2. Apoptose Hemmer und Ihre Funktion in der Zelle	13
Tabelle 3. Übersicht der histologischen und klinischen Daten	31
Tabelle 4. Übersicht der verwendeten Zelllinien für die Zellkulturversuche	32
Tabelle 5. Zusammensetzung der Elektrophorese Gele	34
Tabelle 6. Verwendete Konzentration und Inkubationszeit von YM155 im Western Blot	35
Tabelle 7. Compounds für MTS Assays mit Konzentration und Inkubationszeiten	41
Tabelle 8. Modifizierter Immunreaktiver Score (IRS) nach Remmele	44
Tabelle 9. Statistische Tests	44
Tabelle 10. Merkmalsverteilung im Primärtumorkollektiv	48
Tabelle 11. Korrelationsanalysen zwischen IRS und klinischen Parametern mittels Chi ² -Test	53
Tabelle 12. Univariate Analysen der primären Liposarkome	56
Tabelle 13. Multivariate Analysen der primären Liposarkome	56
Tabelle 14. Merkmalsverteilung im Rezidivkollektiv	60
Tabelle 15. Auswertung FASC Analyse nach Behandlung mit YM55	67
Tabelle 16. Signifikante Viabilitätsunterschiede zwischen den Doxorubicin Konzentrationen nach 96-	
stündiger Inkubation	69
Tabelle 17. Signifikante Viabilitätsunterschiede zwischen den Etoposid Konzentrationen.	70

1. Einleitung

1.1 Das Liposarkom

Das Liposarkom (LPS) ist eine maligne Neubildung des Weichteilgewebes mit histologischen und makroskopischen Merkmalen des humanen Fettgewebes.

Unter den malignen Tumorerkrankungen stellen die Weichteiltumore einen Anteil von circa 1 % dar. Den größten Anteil dieser Gruppe bildet das LPS mit circa 12 % (Wibmer et al., 2010). Es tritt mit einer Häufigkeit von etwa 2 - 4 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr auf. Weiterhin lässt sich ein Inzidenzpeak um die sechste Lebensdekade beobachten. Im Kindes- und Jugendalter tritt das LPS sehr selten auf. Hier finden sich nur vereinzelt Fallberichte (Ahmed et al., 2004). Männer sind mit einem Verhältnis von etwa 1,3:1 etwas häufiger betroffen als Frauen (Dalal et al., 2008, Kransdorf, 1995).

Das LPS kann in jeder Körperregion auftreten, am häufigsten wird es an der oberen und besonders der unteren Extremität diagnostiziert. Weitere Lokalisationen sind das Retroperitoneum, der Thorax sowie intraperitoneale Tumore (Kuhnen et al., 2004, Dalal et al., 2008). Selten treten Liposarkome zum Beispiel im Kopf-/Halsbereich (Orbitalregion oder Kehlkopf) auf (Dworak et al., 2018, Corvino A, 2016).

Nach M. Glehr et al. beträgt das 5-Jahres-Überleben 82 % und ist abhängig vom Alter der Patientinnen/Patienten (Glehr et al., 2009). Die Mortalität variiert stark von 1 % - 90 % und ist von verschiedenen Faktoren abhängig (Dalal et al., 2008). Neben den Subtypen und der Lokalisation spielt auch die Qualität der chirurgischen R0-Resektion eine entscheidende Rolle für das Überleben und die Rezidivrate (Smith et al., 2015, Singer et al., 2003b, Henricks et al., 1997).

Symptomatisch fällt das Liposarkom durch eine schmerzlose Weichteilschwellung und/oder Bewegungseinschränkung auf. Besonders bei abdominellen und retroperitonealen LPS steht eher die Symptomatik durch verdrängendes Wachstum im Vordergrund. Die Diagnose dieser abdominellen und retroperitonealen LPS erfolgt aufgrund der unspezifischen Symptome oft erst im fortgeschrittenen Stadium (Taguchi, 2016, Jaques et al., 1990).

Im Rahmen der Diagnostik stellt die Biopsie den Goldstandard dar. Zur weiteren Ausdehnungsdiagnostik sowie zur Suche nach Metastasen werden zusätzliche bildgebende Verfahren eingesetzt (Dalal et al., 2008, Heslin et al., 1997, Kuhnen et al., 2004).

Das LPS wird nach TNM wie folgt eingeteilt (Wagner, 2004) :

TNM: Klinische Klassifikation

TX Primärtumor kann nicht beurteilt werden

TO Kein Anhalt für Primärtumor

T1 Tumor 5 cm oder weniger in größter Ausdehnung

T1a Oberflächlicher Tumor

T1b Tiefer Tumor

T2 Tumor mehr als 5 cm in größter Ausdehnung T2a Oberflächlicher Tumor

T2b Tiefer Tumor

N Regionäre Lymphknoten

NX Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden

- NO Keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N1 Regionäre Lymphknotenmetastasen

M Fernmetastasen

MX Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden MO Keine Fernmetastasen

M1 Fernmetastasen

Als oberflächlich gilt jeder Tumor der oberhalb der Faszie liegt und keine Infiltration zu dieser ausweist. Tiefe Tumore sind entweder unterhalb dieser Faszie lokalisiert oder oberhalb mit Infiltration der Faszie. Ebenfalls gelten Tumore im Retroperitoneum, Mediastinum und im Beckenraum als tiefe Tumore (Wagner, 2004).

Für die individuelle Therapie und Prognose kommen dem histopathologischen Grading und der Stadieneinteilung beim LPS besondere Bedeutungen zu (Coindre et al., 1986). Zum Grading werden Parameter wie Zellmorphologie, Zellteilungsaktivität, Nekrosen, Zellreichtum und das Wachstumsverhalten herangezogen. Im deutschsprachigen Raum wird das FNCLCC System (Fletcher et al., 2013) bevorzugt und wurde auch hier für das Grading verwendet:

Histopathologisches Grading

GX Differenzierungsgrad kann nicht beurteilt werden

G1 gut differenziert

G2 mäßig differenziert

G3 schlecht differenziert

Des Weiteren wird das G1 LPS als *low-grade* und das G2 und G3 LPS als *high-grade* bezeichnet (C.D.M. Fletcher, 2002).

Die Tabelle 1 zeigt die Stadienzuordnung beim Weichteilsarkom nach AJCC (*The American Joint Committee on Cancer:* 8th). Bei Kopf-Hals, Thorax und abdominellen Organen ist aktuell keine Stadieneinteilung empfohlen (Raphael E. Polloek, 2017):

Stadium	т	Ν	Μ	Grading 3-stufig
IA	T1	N0	M0	G1
IB	T2, T3	N0	M0	G1, GX
II	T1	N0	M0	G2, G3
IIIA	T2	N0	M0	G2, G3
IIIB	T3, T4	N0	M0	G2, G3
IIIC	jedes T	N1	M0	jeder
IV	jedes T	jedes N	M1	jeder

Tabelle 1. Stadieneinteilung für Weichteilsarkome modifiziert nach AJCC

Makroskopisch erscheint die Schnittfläche des LPS inhomogen und teilweise septiert. Farblich lassen sich neben dem Lipom-typischen Gelbton auch weiße und glasige Bereiche erkennen. Abhängig vom Subtyp fallen zusätzlich weißliche Septen auf welche das LPS durchziehen (Kuhnen et al., 2004).

Die Mehrzahl der Liposarkome entsteht nicht auf dem Boden eines Lipoms. Jedoch ähneln die Zellen histologisch dem gesunden Fettgewebe oder deren Entwicklungsstadien (Dalal et al., 2008). Während Lipome in der Regel im Unterhautfettgewebe vorkommen, findet man LPS eher in den tiefen Weichteilgeweben des Körpers (Sternberg, 1952). Die Ursachen sind weitgehend ungeklärt und die Mehrzahl der LPS entsteht spontan. Vorausgehende Traumata und ionisierende Strahlung werden als mögliche Ursachen diskutiert. Auch genetische Mutationen werden zunehmend als Ursache aber auch als möglicher Therapieansatz untersucht.

1.1.1 Liposarkom Subtypen

Die WHO-Klassifikation von 2013 unterscheidet 5 Subtypen aufgrund ihrer morphologischen und immunphänotypischen Ausprägung. Das gut differenzierte Liposarkom (WDLPS), dedifferenzierte Liposarkom (DDLPS), myxoid/rundzellige Liposarkom (MLPS/RCL) und das pleomorphe Liposarkom (PLS). Alle anderen Liposarkome werden als nicht weiter spezifiziertes Liposarkom (NOS) bezeichnet (Petersen, 2013, Katenkamp, 2011).

Den häufigsten Subtyp bildet das WDLPS mit circa 40 - 50 %. Es zählt zu den *low-grade* LPS, metastasiert sehr selten und fällt besonders bei retroperitonealer Lage durch eine erhöhte Rezidivwahrscheinlichkeit auf. Die Extremitäten stellen eine weitere häufige Lokalisation dar. Genetisch finden sich hier Aberrationen auf dem Chromosom 12q13-15. Dies führt unter anderem zur Überexpression von MDM2, welches derzeit als pharmakologisches Ziel in der Therapie untersucht wird. Das Outcome wird maßgeblich durch die chirurgische R0-Resektion beeinflusst, da das WDLPS auf aktuelle radio- und chemotherapeutische Ansätze nicht anspricht (Dalal et al., 2008, Crago and Singer, 2011).

Das DDLPS zeichnet sich ebenfalls durch ein schlechtes Ansprechen auf Radio- oder Chemotherapie-Schemata aus. Hier treten Metastasen in bis zu 30 % der Fälle auf, wobei die Lunge am häufigsten betroffen ist. Das DDLPS tritt häufig im Retroperitoneum auf, gefolgt von den Extremitäten und selteneren Lokalisationen wie paratestikulär oder im Mediastinum. Es zählt zu den high-grade LPS und wird als WDLPS mit Transformation in ein nicht fettgewebsähnliches Sarkom definiert (Khin Thway, 2016, Lee et al., 2018). Ähnlich dem WDLPS zeigen sich genetische Mutationen ebenfalls beim retroperitonealem DDLPS. Auch hier kommt es zur Amplifikation des MDM2-Proteins. Beim nicht retroperitonealem DDLPS lässt sich diese Mutation nicht nachweisen. Dafür sind

zahlreiche weitere genetische Mutationen im DDLPS bekannt (A.P. Dei Tos, 2002).

Mit circa 20 - 30 % bildet das myxoide LPS eine Subgruppe, welches im Erwachsenenalter, aber auch in der Kindheit und im Jugendalter auftritt. Am häufigsten tritt das MLPS an den Extremitäten auf und zeichnet sich histologisch durch ein myxoides Stroma mit runden und ovalen Mesenchymzellen aus. In bis zu 40 % der Fälle kommt es zu Rezidiven oder Metastasen, welche häufig im Weichteilgewebe oder im Knochen auftreten (Antonescu, 2002). Das MLPS spricht im Gegensatz zum WDLPS und DDLPS gut auf chemotherapeutische sowie strahlentherapeutische Ansätze an (Jones et al., 2005, Antonescu, 2002). Es konnte eine Translokation [t(12;16)(q13;p11)] nachgewiesen werden die zum sogenannten FUS-CHOP-Fusionsgen führt (Turc-Carel et al., 1986). Dieses spielt in der Tumorgenese eine zentrale Rolle (Rabbitts et al., 1993).

Einen weiteren Subtyp bildet das pleomorphe LPS mit circa 5 %. Es zeichnet sich durch eine hohe Tumor-assoziierte Mortalität von 40 - 50 % aus. In 30 - 50 % der Fälle treten Metastasen auf, welche bevorzugt die Lunge befallen. Ebenso häufig sind lokale Rezidive mit circa 30 - 50 %. Ähnlich wie das MLPS imponiert das PLS als gelblich-weißlicher Tumor mit inhomogener Oberfläche. Zusätzlich lassen sich nekrotische Bereiche erkennen. Dieses *high-grade* LPS zeichnet sich histologisch durch pleomorphes Gewebe mit pleomorphen Lipoblasten aus. Es konnte eine Vielzahl von genetischen Mutationen gefunden werden, die auch innerhalb der Gruppe der PLS sehr variabel sind (T. Mentzel, 2002b). Die Prognose wird durch verschiedene Faktoren wie Tumortiefe und Größe sowie die Anzahl der Mitosen pro HPF beeinflusst. Therapeutisch steht hier ebenfalls die chirurgische R0-Resektion im Vordergrund. Das Ansprechen auf Chemotherapie im PLS ist sehr variabel und ist daher bislang nur eine Ergänzung zur chirurgischen R0-Resektion (Jaques et al., 1990, Lee et al., 2018).

Der fünfte Subtyp, NOS oder Mixed-type LPS präsentiert sich mit histologischen Eigenschaften verschiedener Subtypen. Es ist ein seltener Subtyp, der bevorzugt im höheren Alter auftritt. Klinisch wird diese LPS ebenfalls als schmerzlose Schwellung symptomatisch. Das NOS ist am häufigsten retroperitoneal oder intraabdominell lokalisiert (T. Mentzel, 2002a).

1.3.1 Therapie und Prognose des Liposarkoms

Die Therapie des LPS hängt vom vorliegenden Subtyp sowie vom Tumorstadium ab. Generell kann man zwischen lokalem und fortgeschrittenem Sarkom unterscheiden. Der Fokus der Therapie liegt aufgrund der schlechten Chemo- und Radiosensibilität auf dem chirurgischen Ansatz.

Für das lokal begrenzte LPS gilt die chirurgische R0-Resektion als Goldstandard. Nach Gronchi et al. führt eine großzügige Resektion des retroperitonealen Sarkoms zu einer Reduzierung der Lokalrezidivrate von 49 % auf 28 %. Limitiert ist diese Empfehlung auf Sarkome Grad I und II, Patienten mit Fernmetastasen sind hiervon ausgenommen (Gronchi et al., 2012b). Ähnliche Ergebnisse finden sich auch bei einer isolierten Untersuchung des WDLPS (Mansfield et al., 2018). Weiterhin wird die operative Entfernung von infiltrierten Gefäßen beim retroperitonealem Sarkom empfohlen, was ebenfalls die Prognose verbessert (Tanaka et al., 2017). Auch die Organresektion als zusätzliche chirurgische Option beim retroperitonealem Sarkom sollte individuell von Fall zu Fall geprüft werden. Ein Leitfaden für die Indikation bietet die Arbeit von Fairweather et. al., in der auch Empfehlungen für die präoperative Planung erläutert werden (Fairweather et al., 2018).

Neben den operativen Ansätzen kann auch die perioperative Radiotherapie beim lokal-begrenzten retroperitonealem Sarkom die Lokalrezidivrate senken. Hierzu liegt derzeit nur eine Expertenempfehlung vor (Baldini et al., 2015). Die STRASS-Studie könnte in naher Zukunft neue Daten zu dieser Konstellation liefern (NCT01344018; EORTC 62092-22092). Generell sollten retroperitoneale LPS in dafür qualifizierten Zentren operiert werden. Dies gilt besonders für großvolumige Tumore (Baldini et al., 2015).

Beim tiefen high-grade LS der Extremitäten sollte neben der chirurgischen R0-Resektion eine adjuvante Strahlentherapie zur lokalen Tumorkontrolle erwogen werden (Beane et al., 2014).

Neben den chirurgischen und radiologischen Therapieoptionen gibt es eine Vielzahl von chemotherapeutischen Ansätzen, die sich in unterschiedlichen Stufen der Forschung befinden. Auch hier wird zwischen lokal und fortgeschrittenem Stadium sowie dem Subtyp unterschieden. Besonders die unterschiedliche Sensibilität gegenüber konventioneller Chemotherapeutika sollte bei der Therapieplanung des LPS beachtet werden (Fletcher et al., 2002). Anthracycline bilden derzeit das Standard Chemotherapeutikum in der Behandlung des LPS und Weichteilsarkome (Lee et al.. 2017). anderer Trabectedin, ein Chemotherapeutikum mit Wirkung auf die Transkription, Replikation sowie die DNA Reparaturmechanismen, ist eine vielversprechende Ergänzung der Chemotherapeutika beim LPS (Pommier et al., 1996, Lee et al., 2017). Besonders im MLPS, sowie beim progressiven LPS nach erfolgloser chirurgischer und chemotherapeutischer Therapie, haben Studien ein besseres Outcome zeigen können (Gronchi et al., 2012a, Demetri et al., 2016). Dies beruht auf der Wirkung von Trabectedin, welches die Transkriptionsreprogrammierung durch das FUS-CHOP-Fusionsgen umkehrt (Di Giandomenico et al., 2013).

Bei Subtypen mit Überexpression von MDM2 bieten Antagonisten einen möglichen Therapieansatz. Diese verhindern die Bindung von MDM2 an p53, welches in ungebundener Form zur Apoptose und Zyklusarrest führt. Aktuelle Studien zur Wirksamkeit von MDM2-Antagonisten laufen und haben beispielsweise bei Patienten mit Wildtyp p53 erste positive Effekte zeigen können (Wagner et al., 2017).

Nicht resezierbare Liposarkome sowie LPS mit Fernmetastasen zählen zu den fortgeschrittenen Formen. Bei diesen LPS steht der chemotherapeutische Ansatz im Vordergrund. Auch hier kommen Anthracycline und Kombinationen mit Anthracyclinen zum Einsatz. Neben diesen Substanzen stehen zunehmend auch *new drugs* im Fokus von experimentellen und klinischen Studien (Lee et al., 2017). Eribulin, ein Hemmstoff der Mikrotubuli-Dynamik und somit ein Mitoseinhibitor und Apoptose-induzierendes Zytostatikum, zeigt bei vorbehandelten Patienten mit fortgeschrittenen LPS eine prognoseverbessernde Wirkung (Dybdal-Hargreaves et al., 2015, Schoffski et al., 2016). Beim fortgeschrittenen WDLPS beziehungsweise DDLPS verbessert ein Ansatz mit einem CDK4-Inhibitor namens Palbociclib das progressionsfreie Überleben der Patienten. Diese wurden zuvor erfolglos mit einem anderen Chemotherapeutikum behandelt (Dickson et al., 2016). Neben diesen Beispielen beschreibt die Literatur noch zahlreiche weitere Substanzen, die

potentiell bei einer individuellen Konstellation von Subtyp, Rezeptorexpression und Tumorstadium das Überleben und/oder die Rezidivrate verbessern können.

Generell sind weitere Untersuchungen zu subtyp-spezifischer Therapie beim Liposarkom entscheidend sowie für das Verständnis und die Prognose dieser Tumorart unabdingbar (Lee et al., 2018).

Die Prognose des LPS ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Neben den Subtypen und dem histologischen Grading beeinflusst die Qualität der chirurgischen R0-Resektion die Prognose maßgeblich (Glehr et al., 2009, Singer et al., 2003a). Weiterhin haben die Lokalisation, Symptome und das Alter des Patienten einen Einfluss auf das Überleben. Für die low-grade LPS wird die 5-Jahres Überlebensrate mit circa 90 % angegeben. Bei den high-grade Typen beträgt diese circa 60 % (Dalal et al., 2008).

1.2 Der programmierte Zelluntergang

Der programmierte Zelluntergang, die sogenannte Apoptose, ist eine aktive, physiologische und streng regulierte Stoffwechselleistung der Zellen unseres Körpers. Im Zuge der Apoptose kommt es zum kontrollierten Absterben einer Zelle ohne anschließende Immunreaktion auf freigesetzte Zellbestandteile. Dieses Prinzip wurde 1972 von Kerr et al. erstmals beschrieben und hat seitdem das Verständnis für die verschiedensten physiologischen und pathologischen Vorgänge verbessert (Kerr et al., 1972). Von der Embryonalentwicklung und Selektion der Stammzellen bis zur Erneuerung von Haut und Schleimhaut ist die Apoptose zentraler Bestandteil der Gewebshomöostase. Ein Beispiel ist die ständige Erneuerung des Darmepithels durch Apoptose der obersten Schicht (Bullen et al., 2006).

Neben physiologischen Prozessen spielt der programmierte Zelltod auch in der Tumorentstehung eine zentrale Rolle. Bei Dysregulationen der apoptotischen Signalkaskade können sich neoplastische Zellen dem Apoptosesignal entziehen und ungehemmt proliferieren (Sun and Peng, 2009). Dieser Mechanismus spielt auch bei Resistenzen gegenüber Apoptose-induzierenden Chemotherapeutika eine entscheidende Rolle (Aas et al., 1996).

Kommt es zur Aktivierung der Apoptose, läuft eine Kaskade von Reaktionen ab, die über morphologisch erkennbare Stufen zum Zelltod führt. Initial lässt sich eine Abnahme der Zellgröße mit Abrundung der Zellgrenzen bei intakter Zellmembran erkennen. Im Inneren kommt es zur Verdichtung des Chromatins, woraufhin die Ablösung der Zelle aus dem Zellverband folgt. Anschließend löst sich die Kernmembran auf und der Verlust des Zellkerns durch Fragmentierung folgt. Hier spielt eine erhöhte Aktivität der Endonukleasen eine entscheidende Rolle (Sun and Peng, 2009). Es bilden sich nun sogenannte *apoptotic bodies*. Diese können neben Zytoplasma und kondensierten Zellorganellen auch Zellkernfragmente enthalten (Elmore, 2007). Die weiterhin intakten Zellmembranen der *apoptotic bodies* exprimieren nun Signalmoleküle an ihrer Oberfläche. Dies aktiviert unter anderem Makrophagen, welche anschließend die *apoptotic bodies* phagozytieren (Sambrano and Steinberg, 1995). Die Phagozytose geschieht ohne lokale Freisetzung von Entzündungsmediatoren (Kurosaka et al., 2003).

Grundsätzlich kann man die Aktivierung der Apoptose in ein extrinsisches und intrinsisches System gliedern. Die Systeme werden im Folgenden detailliert beschrieben. Beide Wege enden in einer gemeinsamen Endstrecke, die zum Zelluntergang führt. Die meisten beteiligten Proteine lassen sich vereinfacht den folgenden Gruppen zuordnen:

- Caspasen (cysteinyl-aspartate specific protease) sind Proteasen welche als inaktive Form in jeder Zelle vorhanden sind. Man differenziert weiterhin Initiator und Effektor Caspasen. Letztere sind für die proteolytische Spaltung von Substraten wie DNA oder Zellorganellen verantwortlich (Kurokawa and Kornbluth, 2009).
- Bcl-2 (B-cell *lymphoma* 2) Proteine dienen der Apoptoseregulation. Sie sind entweder pro- oder anti-apoptotisch und befinden sich im Mitochondrium sowie in der mitochondrialen Zellmembran (Debra T. Chaok and Korsmeyer, 1998).

 Inhibitors of Apoptosis Proteins (IAPs) hemmen die Signalkaskade und werden im Verlauf der Arbeit gesondert beschrieben (Jason B. Garrison, 2011).

Der extrinsische Signalweg oder auch die rezeptorvermittelte Apoptose ist in Abb. 1 (linker Bildabschnitt) dargestellt und startet mit der Bindung eines Liganden an den Todesrezeptor. Hierbei handelt es sich beispielsweise um den Liganden TNF- α (*tumor necrosis factor a*), der an den TNFR1 (TNF Rezeptor-1) bindet. Dies löst die Trimerisierung des Rezeptors aus, was zur Verbindung der Todesdomänen führt. Zusammen mit FADD (Fas associated via death domain) und der Procaspase 8 bildet sich der DISC (death-inducing signaling complex). Dieser Komplex führt unter anderem zur Aktivierung der Caspase 8, woraufhin die weitere Signalkaskade folgt. Je nach Stimulus stehen Zellüberleben oder Apoptose am Ende dieser Signalwege (Ashkenazi and Dixit, 1998, Flusberg and Sorger, 2015).

Die intrinsische Kaskade wird durch Veränderungen im Zellinneren ausgelöst (Abb. 1 rechter Bildabschnitt). Hierbei bildet sich ein Ungleichgewicht von anti- und pro-apoptotischen Proteinen. Dieses Ungleichgewicht mit Verlagerung zu den pro-apoptotischen Proteinen kann zum Beispiel durch ionisierende Strahlung, Virusinfektionen, zytotoxische Medikamente oder die Abwesenheit von Wachstumsfaktoren entstehen (Elmore, 2007). Unter diesen Einflüssen kommt es zur Bildung von Poren durch Konformationsänderungen von Proteinen der Bcl-2 Familie an der äußeren Mitochondrienmembran (Adrain et al., 2003). Daraufhin werden weitere pro-apoptotische Proteine ins Zytoplasma freigesetzt (Saelens et al., 2004). Hierzu zählen unter anderem Cytochrom C und second mitochondria-derived activator of caspases (Smac). Uber weitere Komplexe wird die Caspasen-Kaskade in Gang gesetzt sowie IAPs gehemmt (Du et al., 2000, Garrido et al., 2006).

Infolge Aktivierung der Apoptose durch das intrinsische oder extrinsische System kommt es in der Endstrecke unter anderem zur Aktivierung der Effektor-Caspasen 3 und 7. Diese spalten zum einen die Kernmembran, wodurch die DNA ins Zytoplasma freigesetzt wird. Zum anderen kommt es zur Aktivierung von Endonukleasen aus den Mitochondrien sowie zur Aktivierung von Caspase-aktivierter DNase (CAD). Letzteres geschieht durch die Spaltung des ICAD (*Inhibitor of Caspase-activated DNAse*) Proteins, welches das CAD bindet und damit im Normalzustand hemmt (Abb. 1). Zusätzlich werden Proteinkinasen und weitere Zellbestandteile gespalten (Fischer et al., 2003, Nagata, 2004).



Abb.1: Signalkaskade der extrinsischen und intrinsischen Apoptose

Nachdem TNF-α (*tumor necrosis factor α*) an den TNFR (TNF Rezeptor-1) gebunden hat bildet sich der DISC (*death-inducing signaling complex*), welcher die Caspase 8 aktiviert. Daraufhin aktiviert diese im extrinsischen Weg weitere Caspasen wie Caspase 3 und 7. Zusätzlich spaltet sie Bid (*BH3 interacting-domain death agonist*) zu tBid (*truncated Bid*). Dieses Protein führt zur Konformationsänderung der mitochondrialen Bax (*BCL-2-associated X*) und Bak(*Bcl-2 homologous antagonist/killer*), was wiederum zur Freisetzung von Cyt c (Cytochrom C) führt. Zu dieser Freisetzung kommt es auch bei Aktivierung durch das intrinsische System. Auslöser stellen hier zum Beispiel Virusinfektionen oder Hypoxie dar. Nach der Freisetzung von Cyt c bildet sich eine heptamere Struktur aus Cyt c, Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor*) und der Procaspase 9. Durch die Bildung dieses Apoptosoms kommt es zur Aktivierung der Caspase 3 und 7. Es folgt die Substratspaltung durch die Caspasen und die Zelle wird apoptotisch. Die Caspase 3 spaltet den CAD/ICAD Komplex (*Caspase-aktivierte DNasel Inhibitor of Caspase-activated DNAse*), sodass CAD freigesetzt und aktiv wird. CAD kann als Endonukleasen DNA Stränge auftrennen und so DNA abbauen.

Von diesem kontrollierten Abbau von Zellen ist die Nekrose als pathologisches Zellsterben abzugrenzen. Die wichtigsten Unterschiede zeigt Abb. 2.



Apoptose

- physiologisch, kontrolliert
- rezeptorvermittelt
- energieabhängig
- intakte Zellmembran
- Zell-Schrumpfung
- keine Entzündungsreaktion
- Abtragung durch Makrophagen



Nekrose

- pathologisch, unkontrolliert
- durch direkte Schädigung der Zelle (zum Beispiel 0²-Mangel)
- Membranschädigung
- Anschwellen der Zelle
- Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Zellbestandteilen

Abb. 2: Unterschiede zwischen Nekrose und Apoptose

Apoptose versus Nekrose, schematische Darstellung der zellulären Vorgänge (links), Gegenüberstellung der wichtigsten Merkmale (rechts).

Neben diesen beiden Mechanismen des Zelluntergangs wird in der Literatur die sogenannte Nekroptose beschrieben. Hierbei handelt es sich um eine Zwischenform, die Merkmale beider Zelluntergangsarten zeigt. Vermittelt durch Rezeptoren und Signalkaskaden kommt es über nekrotisch morphologische Zellveränderungen zur "geordneten zellulären Explosion" (Vandenabeele et al., 2010).

1.3 Apoptose Hemmer

Neben der Regeneration spielt die Apoptose eine große Rolle in der Regulation der Proliferation der Zellen. Hierzu ist eine feine Signalsteuerung innerhalb der Zellen notwendig. Eine Zelle ist in der Lage, je nach Intensität des Apoptose-initiierenden Stimulus, die Signalkaskade durch endogene Inhibitoren zu stoppen. Die Expression dieser endogenen Inhibitoren oder Apoptose Hemmer wird durch Wachstumshormone gefördert, um eine Proliferation zum Beispiel im Knochenwachstum zu ermöglichen. Andererseits können sie auch unterdrückt werden. Dies geschieht zum Beispiel bei defekten Zellen mitunter durch Proteine aus den Mitochondrien und führt dadurch zur gewünschten Apoptose (Hengartner, 2000). Die Mitglieder der Apoptose Hemmer sind in der Tabelle 2 aufgeführt.

	Gruppe	Mechanismus
Bcl-2	Familie	
•	Bcl-2	Hemmung der Cytochrom C Freisetzung
•	Bcl-xL*	(Kharbanda et al., 1997, Brustugun et al., 1998)
Caspa	aseninhibitoren	
•	cFLIP**	cFLIP verhindert die Aktivierung von Caspase 8
		(Scaffidi et al., 1999)
IAPs		
-	NAIP	
-	XIAP,c-IAP1/2	Caspasenhemmung, Initiierung von Caspasenabbau, Signal
•	Survivin	und Rezeptormodulation
•	Apollon	(Jason B. Garrison, 2011)
•	Livin	
•	Ts-IAP	

Tabelle 2. Apoptose Hemmer und Ihre Funktion in der ZelleÜbersicht über die Gruppen der Apoptose Inhibitoren und deren Vertreter. Rechts kurze

Ubersicht uber die Gruppen der Apoptose Inhibitoren und deren Vertreter. Rechts kurze Erläuterung zum Wirkmechanismus der Proteine. *B-cell lymphoma-extra-large, **cellular FLICE-inhibitory protein

Die Gruppe der Bcl-2 Proteine teilt sich in pro-apoptotische und anti-apoptotische Proteine auf. Bcl-2 und Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra-large*), als Vertreter der anti-apoptotischen Gruppe, können die apoptotische Kaskade durch Blockierung der Cytochrom C Ausschüttung aus den Mitochondrien inhibieren. So bleibt der

Zelluntergang aus und die Zelle kann sich dem "Todessignal" entziehen (Kharbanda et al., 1997, Brustugun et al., 1998). Weiterhin sind direkte Caspaseninhibitoren beschrieben. Das cFLIP Protein konkurriert am FADD des DISC mit der Procaspase 8 und verhindert so die Aktivierung der Caspase 8 (Abb. 3). Auch dies führt zur Unterbrechung der Signalkaskade (Scaffidi et al., 1999). Die wahrscheinlich bedeutsamste Gruppe bilden die Mitglieder der Inhibitor of Apoptosis Protein (IAPs) Familie, welche unter anderem über Caspasenhemmung effektiv die Apoptose verhindern (Jason B. Garrison, 2011). Diese Gruppe nimmt in dieser Arbeit einen zentralen Stellenwert ein und wird im nächsten Kapitel gesondert beschrieben



Abb. 3: Inhibitoren der Apoptose

Das Protein cFLIP (*cellular FLICE-inhibitory protein*) besetzt die Bindungsstelle der Procaspase 9 an FADD (*Fas associated via death domain*). Die Bildung des DISC (*death-inducing signaling complex*) sowie der aktiven Caspase 9 bleibt aus. Die mitochondrialen Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) und Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*) hemmen die Ausschüttung von Cytochrom C (Cyt c) aus dem Mitochondrium. Die IAPs (*Inhibitors of apoptosis Proteins*) hemmen aktive Caspasen und führen über Ubiquitinierung zu deren Abbau. Durch diese Hemmung bleiben substratverwertende Caspasen inaktiv und die Apoptose wird verhindert. *Survivin; **Adenosintriphosphat

1.4 IAPs – Inhibitors of Apoptosis Proteins

Die Proteine der IAP-Familie sind in der Lage inhibitorisch auf die Apoptose Kaskade einzuwirken. Durch diese Hemmung der Apoptose ist die Zelle in der Lage das Apoptosesignal zu stoppen und den Zelluntergang zu verhindern. Bei den IAPs handelt es sich um eine Gruppe von Proteinen mit homologen Grundbausteinen. Ihre ersten Mitglieder wurden 1993 von Crook et al. beschrieben (Crook et al., 1993). Sie sind neben humanen Zellen auch in verschiedenen anderen Organismen beschrieben und spielen in der Tumorentstehung und Entzündungsreaktion eine entscheidende Rolle (LaCasse et al., 1998, Sharma et al., 2017, Dubrez et al., 2013, Krieg et al., 2009, Bertrand et al., 2009). Bis heute sind 8 Mitglieder dieser Familie beschrieben (Tabelle 1). Maßgeblich ist die sogenannte BIR-Domäne (baculoviral IAP repeat), von der jedes Mitglied mindestens eine und maximal drei aufweist. Diese Domänen aus circa 70 Aminosäuren dienen der Proteininteraktion mit Caspasen (Birnbaum et al., 1994, Wei et al., 2008). Je nach IAP kommen weitere Domänen dazu.

Die RING-Domäne (*really interesting new gene*) findet sich am C-terminalen Ende einiger IAPs und bindet die *ubiquitin-conjugating* (UBC) Domäne , welche für die Ubiquitinierung von Proteinen verantwortlich ist und schließlich den Abbau von Zellsubtraten einleitet (Deshaies and Joazeiro, 2009). Es finden sich auch unabhängige UBC-Domänen mit ähnlicher Funktion beim IAP Apollon (Hauser et al., 1998). Die CARD (*caspase activation and recruitment domain*) findet sich in den zellulären IAPs c-IAP1 (*cellular Inhibitor of apoptosis protein-1*) und c-IAP2 (*cellular Inhibitor of apoptosis protein-2*) und dient neben der Autoregulation und Stabilisierung auch der Verstärkung der Inhibition der apoptotischen Kaskade (Lopez et al., 2011).

Weitere Domänen wie die LRR (*leucine-rich repeat*) und NOD (*nucleotide-binding oligomerisation*) finden sich beim NAIP (*neuronal apoptosis inhibitory protein*) oder auch BIRC1 und dienen der angeborenen Immunantwort (Jha and Ting, 2009, Inohara et al., 2005).

Wie in Abb. 3 dargestellt gehen die IAPs eine Bindung mit aktiven Caspasen ein, hemmen diese direkt oder führen über Ubiquitinierung zu deren Abbau.

XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) inhibiert die Effektor-Caspasen 3 und 7 direkt und verhindert die Aktivierung der Caspase 9 (Deveraux et al., 1997, Shiozaki et al.).

C-IAP1 und c-IAP2 binden ebenfalls an die Caspasen 3, 7 und 9 und deaktivieren diese indirekt (Yang et al., 2000). Über NF-KB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) Aktivierung blockieren c-IAP1 und c-IAP2 ebenfalls die Initiator Caspase 8 (Wang et al., 1998).

NAIP bindet ATP-abhängig (*Adenosintriphosphat*) an Caspase 9 und wird durch IAP Hemmer nicht beeinflusst (Davoodi et al., 2004). Es bindet ebenfalls an die aktiven Caspasen 3 und 7 und inaktiviert diese (Maier et al., 2002).

Apollon ist ein membranständiges Protein des Golgi-Apparats und inhibiert auf verschiedene Weise die Apoptosekaskade. Unter anderem bindet es Smac/DIABLO, ein mitochondriales Protein, und verhindert dessen hemmende Wirkung auf IAPs (Bartke et al., 2004). Livin bindet ebenfalls an Caspase 9 und ist vor allem in Karzinomen exprimiert. Ts-IAP (*testis-specific IAP*) wurde bisher hauptsächlich im Gewebe des Hodens nachgewiesen und ist ein bisher wenig erforschtes Mitglied der IAP Familie.

Survivin als zentrales Element dieser Arbeit wird im folgenden Kapitel gesondert beschrieben.

Die IAPs werden durch mitochondriale Proteine gehemmt (Abb. 3). Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspases/ direct IAP binding protein with low pl) und Omi/HtrA2 (high temperature requirement A) sind zwei bekannte Vertreter dieser IAP hemmenden Proteine. Durch die Hemmung von IAPs wird wiederum die Apoptose induziert (Vande Walle et al., 2008, Yang et al., 2003, Verhagen et al., Du et al., 2000). Die Untersuchung von IAPs ist zentraler Bestandteil der Tumorforschung und bietet mögliche Angriffspunkte für pharmakologische Therapien. Daher ist die Forschung der IAPs essentiell für die Entwicklung neuer zielgerichteter Tumortherapien (Straub, 2011).

1.4.2 Survivin

Der molekular kleinste Vertreter der IAP Familie wurde 1997 erstmals von Ambrosini et al. beschrieben. Das auch als BIRC5 bekannte Survivin-Protein ist 16,5 kDa groß und umfasst 142 Aminosäuren (Ambrosini et al., 1997). Das Survivin Gen findet sich beim Menschen auf Chromosom 17q25 und wird vor allem in der G2/M Phase des Zellzyklus exprimiert (Li et al., 1998).

Das Protein lässt sich in embryonalem und fetalem Gewebe sowie in neoplastischen Zellen nachweisen. Im adulten Gewebe findet man es unter anderem noch im Thymus und der Plazenta (Schmidt et al., 2003). Es sind derzeit 5 Splice-Varianten und der Wildtyp (*Wt*) beschrieben (Sah and Seniya, 2015). Die verschiedenen Varianten zeigen eine selektive Verteilung innerhalb der Zelle. Während Survivin Wt und Survivin-2B am höchsten im Zytoplasma konzentriert sind, findet sich Survivin- Δ EX-3 eher im Zellkern. Die Variante Survivin-2a ist nahezu gleichmäßig in den Kompartimenten verteilt. Durch diese Verteilung wird angenommen, dass eine feine Regulation zwischen Apoptose und Apoptose Hemmung möglich ist (Mahotka et al., 2002).

Das Survivin Protein setzt sich aus einer BIR-Domäne, zwei Dimerisierungsdomänen (DD) und einer weiteren Domäne am C-terminalen Ende zusammen. Letztere dient der Protein Interaktion sowie dem Export aus dem Zellkern. Über die BIR-Domäne bindet Survivin an weitere IAPs wie das XIAP oder auch an Proteine wie Smac/DIABLO. Survivin liegt über Proteinbindungen der α -Helix als hydrophobes Homodimer vor (Peery et al., 2017) (Abb. 4).

Neben dem Zytoplasma und dem Zellkern findet sich ein Teil der Survivin Proteine auch in den Mitochondrien. Kommt es durch intrinsische oder extrinsische Signale zur Aktivierung der Apoptose wird Survivin aus den Mitochondrien ausgeschleust und die anti-apoptotische Wirkung freigesetzt. Das Survivin im Zellkern geht mit Auroa Kinase B, INCEP (*inner centromere protein*) und Borealin in den CPC (*chromosomal passenger complex*) ein (Carmena et al., 2012).



Abb. 4: Survivin Aufbau, Struktur und Funktionen

Aufbau und Struktur von Survivin a) Proteinaufbau aus BIR-Domäne (*baculoviral IAP repeat*) und α-Helix. b) Molekulare Struktur modifiziert nach Sun et al. (Sun et al., 2005) zeigt Survivin als Homodimer aus zwei Monomeren (blau und grün) sowie die Zink Atome (violett) c) Detaillierter struktureller Aufbau mit Dimerisierungsdomänen DD (gelb), BIR-Domäne (orange) und der Domäne für die Proteininteraktion sowie die Domäne für den nukleären Export (grün).d) Übersicht über zytoplasmatische und nukleäre Funktionen von Survivin. *HBXIP (*hepatitis B X-interacting protein*), **CPC (*chromosomal passenger complex*).

Die genauen Mechanismen der Apoptose-Hemmung sind noch unklar und es liegen widersprüchliche Daten zu einzelnen Theorien vor. Es wird angenommen, dass Survivin zusammen mit dem Protein HBXIP (*hepatitis B X-interacting protein*) die Procaspase 9 bindet und somit dessen Aktivierung verhindern kann.

Des Weiteren geht Survivin eine Proteininteraktion mit XIAP ein. Dies führt zur Stabilisierung des XIAP Proteins und damit zur Inaktivierung der Caspase 9 (Marusawa et al., 2003, Dohi et al., 2004). Die IAP Hemmer Smac/DIABLO werden ebenfalls von Survivin inhibiert und die Apoptose so zusätzlich gehemmt (Abb. 3) (Du et al., 2000).

Neben der Apoptose Hemmung ist Survivin auch in der Regulation und dem Ablauf der Mitose aktiv. Hier bindet es während der Zellteilung an Mikrotubuli und beeinflusst deren Dynamik und Bildung in der Zelle. Als Teil des CPC ist es mit weiteren Proteinen im Zellkern an der Trennung der Chromosomen während der Zellteilung beteiligt. Der Komplex korrigiert Fehler bei der Anheftung der Mikrotubuli, kontrolliert die Spindelanordnung und ist im Aufbau und in der Regulierung des kontraktilen Apparats zur Zellteilung involviert (Rosa et al., 2006, Terada, 2001, Carmena et al., 2012). Eine weitere Rolle spielt Survivin in Bindung mit XIAP. Hier stimuliert es als XIAP-Survivin-Komplex das invasive Tumorwachstum sowie die Ausbildung von Metastasen (Mehrotra et al., 2010).

IAPs, speziell XIAP und Survivin, werden als prognostischer Biomarker und mögliches therapeutisches Ziel zunehmend interessant. Die prognostische Wertigkeit von Survivin konnte bereits in verschiedensten Tumoren gezeigt werden. Es korreliert mit einer signifikant schlechteren Überlebensrate (Werner et al., 2016, Krieg et al., 2013b, Byun et al., 2007, Krieg et al., 2013a). Durch diese untersuchten Korrelationen kann Survivin als prognostischer Marker für Risikoeinschätzung, Progression und Überleben genutzt werden. Die bisherigen Studien belegen auch, dass Survivin nicht als alleiniger Faktor die Prognose bestimmt, sondern im Zusammenhang mit anderen Daten wie Tumorgröße und Grading betrachtet werden muss. Zudem konnte Survivin bei Patienten mit Blasentumoren im Urin nachgewiesen und auch hier prognostische Korrelationen zum Überleben verifiziert werden (Span et al., 2004, Weikert et al., 2005).

Neben der prognostischen Wertigkeit von Survivin in Tumoren konnte gezeigt werden, dass Survivin auch bei der Konversion von Vorläuferstufen zum Karzinom eine Rolle spielen kann. Allen et al. konnten am Mausmodell belegen, dass Survivin die Konversion vom Hautpapillom zum SCC (squamous cell carcinoma) beeinflusst.

Ein weiterer und ebenfalls prognostisch wichtiger Ansatzpunkt der Forschung ist die Korrelation zwischen Survivin Expression und der Ansprechrate auf Chemotherapeutika. Die pharmakologische Wirkung der meisten Chemotherapeutika soll die Apoptose induzieren. Durch ihre Apoptose hemmenden Eigenschaften können IAPs diese Wirkung vermindern oder aufheben. Daher können Tumorzellen mit einer hohen Konzentration an IAPs eine Resistenz gegenüber diesen Substanzen ausbilden.

Neben einigen anderen Arbeiten die diese These stützen zeigten Zaffaroni et al. eine gesteigerte Taxol (Paclitaxel)/Platin Resistenz bei Patienten mit hoher Survivin Expression beim Ovarialkarzinom (Zaffaroni et al., 2002, Kato et al., 2001). Neben der pharmakologischen Resistenz beeinflusst Survivin auch die Strahlensensibilität von Tumoren (Grdina et al., 2013).

Die genauen Funktionen, Wirkungen und Subtypen des Survivin sind noch nicht vollständig geklärt. Auch bei den verschiedenen Tumorentitäten sind unterschiedliche Effekte zu erkennen (Voges, 2016).

Da Survivin bis auf wenige Ausnahmen im nicht-neoplastischem, humanen Gewebe nicht exprimiert wird, ist es als pharmakologisches Ziel zur Tumortherapie zunehmend interessant. Arbeiten der letzten Jahre konnten zeigen, dass Survivin in nahezu allen Tumoren überexprimiert ist (Kanwar et al., 2013). Somit stehen Hemmstoffe gegen Survivin im Fokus von Studien und Forschungsprojekten.

Generell lassen sich die Mechanismen dieser Hemmstoffe in drei Wirkungsgruppe zusammenfassen. Zum einen Substanzen die die Survivin Expression beeinflussen, zum anderen niedermolekulare Stoffe, die zur Behinderung der Proteininteraktion an der Bindungsstelle des Survivin Moleküls führen. Der dritte Mechanismus verhindert die Homodimerisierung von Survivin (Qi et al., 2016).

Zur ersten Gruppe gehört die Substanz Sepantronium Bromide oder auch YM155. Diese wird im Folgenden näher beschrieben. Ein Vertreter der Interaktionshemmer ist das Withanone, welches über die Bindung an die BIR-Domäne die Apoptose hemmende Wirkung des Survivin aufhebt (Wadegaonkar and Wadegaonkar, 2013).

Teil der aktuellen Forschung ist ein neuer Mechanismus, Survivin als Vakzine oder zur Immuntherapie einzusetzen. Dies beruht auf der Erkenntnis, dass Survivin in normalen, adulten Zellen nicht exprimiert wird. Eine Übersicht über den derzeitigen Forschungsstand bietet die Arbeit von Peery et al. (Peery et al., 2017).

1.4.3 YM155

Sepantronium Bromid wird zu den *small molecule inhibitors* gezählt und ist seit 2007 auf dem Markt. Die Entwicklung und Prüfung erfolgte durch die Firma *Astellas* aus Japan. Abb. 5. zeigt neben den wichtigsten Daten von YM155 die chemische Strukturformel, in der die Imidazol-Basis zu erkennen ist. YM155 ist

eine Verbindung mit einem molekularen Gewicht von 443,29 g/mol und bis zu einer Dosis von 4,8 mg/m² über 7 Tage verträglich (Nakahara et al., 2007, Tolcher et al., 2008).

Es liegen verschiedene Theorien zur Wirkweise von YM155 vor. Derzeit gilt die Substanz als Hemmer der Survivin Transkription. Die Hemmung geschieht über die Bindung des Transkriptionsfaktors Sp1 (*specificity protein 1*), welcher normalerweise die Promotorregion markiert und so die Transkription initiiert. Sp1 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher in allen humanen Zellen exprimiert wird. Zusätzlich ist bekannt, dass Sp1 in vielen Tumoren fehlreguliert ist und somit in der Tumorgenese eine Rolle spielt (Li and Davie, 2010). Sp1 ist notwendig, da der Survivin Promotor keine typischen Startsequenzen wie die TATA-Box aufweist. Durch die verminderte Transkription von Survivin kann die Apoptose, zum Beispiel durch Chemotherapeutika induziert, ungehemmt ablaufen. Dies führt selektiv in Tumorzellen zum Zelluntergang und Reduzierung des Tumorwachstums. Darüber hinaus konnte bereits gesichert werden, dass YM155 keinen direkten Einfluss auf die anderen IAPs hat (Cheng et al., 2012, Sachita et al., 2014).

Die GI_{50} (Growth Inhibition) wird mit 15 nM und die IC_{50} (mittlere inhibitorische Konzentration) mit 0.54 nM/L angegeben. Hierunter zeigt sich YM155 gut verträglich ohne typische Nebenwirkung der Chemotherapeutika (Nakahara et al., 2011, Nakahara et al., 2007).



YM155

Entwicklung: Astellas - Japan (2007)

Chem. Bezeichnung: Sepantronium Bromid (1-(2-Methoxyethyl)-2methyl-4,9-dioxo-3-(pyrazin-2-ylmethyl)-4,9dihydro-1H-naphtho[2,3-d] imidazolium bromid)

Molekulargewicht: 443,29 g/mol

MTD*: 4,8 mg/m² GI₅₀: 15 nM

Wirkung: Bindung von Sp1→ Hemmung der Transkription von Survivin

Forschung: Experimentell, Phase I und II Studien

Abb. 5: YM155

Chemische Strukturformel (li.) modifiziert (Cayman-chemical, 2015) und die wichtigsten Daten zu YM155 inklusive chemische Bezeichnung (re.) *maximum tolerated dose

Studien konnten unterschiedliche Effekte in verschiedenen Tumoren zeigen. Beispielsweise konnte bei Patienten mit vorbehandeltem Prostatakarzinom in einem Viertel der Fälle eine *stable disease* erreicht werden. Hierbei kommt es weder zur Progression noch zur Remission (Tolcher et al., 2012). Andererseits konnten in einer Studie mit 19 Patienten mit fortgeschrittenen NSCLC (*non-small-cell lung cancer*) in Kombination mit Paclitaxel und Carboplatin keine positiven Effekte beobachtet werden (Kelly et al., 2013).

Somit spiegeln sich Komplexität von Survivin und dessen Splice-Varianten sowie die teilweise noch nicht geklärten Effekte in diesen Ergebnissen wieder. Daher sind zusätzliche individuelle Studien sowie weitere Grundlagenforschungen notwendig um diesen Angriffspunkt in Tumoren therapeutisch optimal auszunutzen.

1.5 Ziele der Arbeit

Im Mittelpunkt der Arbeit steht die Beurteilung der Wertigkeit von Survivin im Liposarkom. Wie eingangs beschrieben ist die Therapie in vielen Fällen auf die chirurgische R0-Resektion beschränkt und auch pharmakologische Ansätze zeigen nur eingeschränkte Erfolge. Daher besteht ein anhaltender Bedarf an neuen Therapeutika die supportiv genutzt werden können. Einer dieser Ansätze wäre es die Chemoresistenz der Liposarkome zu verstehen und hier die Ansprechrate zu verbessern.

Ein mögliches Modell bildet die Hemmung von Survivin. Dies würde dem Tumor die Fähigkeit entziehen dem Apoptosesignal durch Chemotherapeutika zu entgehen. In diesem Kontext sollte Survivin auch als Prognosefaktor untersucht werden um die Rolle im Liposarkom zu erfassen. Ergänzend soll diese Arbeit die Wirkung von Chemotherapeutika im Liposarkom analysieren und mögliche günstige Kombinationen mit YM155 identifizieren.

Somit fokussieren wir uns auf 3 wichtige Ziele:

- Erfassung der prognostische Wertigkeit von Survivin bei Patienten mit Liposarkom mittels statistischer Analysen eines Patientenkollektivs
- Expressionsanalyse von Survivin im Zellkulturmodell
- Wirkung von Survivin Antagonist YM155 im Liposarkom

2. Material und Methoden

2.1 Material

Im Folgenden werden die verwendeten Materialien mit Angabe des Herstellers und Ort des Firmensitzes aufgelistet. Zusätzlich werden die histologischen Proben beschrieben, die genutzten Zelllinien und die verwendete Software zur Datenverwaltung und Analyse aufgezählt.

2.1.1 Laborgeräte

Laborgerät	Herstellerfirma	Firmensitz
Analog Vortex Mixer		Pennsylvania LISA
BD FACSCanto™	BD Biosciences	New Jersey, USA
Bio-Photometer [®]	Eppendorf	Hamburg, DE
BIOSAFE® MD	Cryotherm	NRW, DE
Criterion Blotter	Bio-Rad	Kalifornien, USA
Dyad Disciple qPCR	Bio-Rad	Kalifornien, USA
Fresco™ 17 Mikrozentrifuge	Heraeus™	Hessen, DE
Gefrierschrank Komfort	Liebherr	Freiburg, CHE
Heizblock	HLC	Niedersachsen, DE
Infinite® M200	Tecan	Zürich, CHE
Kühlzentrifuge Universal 30 RF	Hettich	BW, DE
Magnetrührer IKA IKAMAG RCT	IKA-Werke	BW, DE
Mikrozentrifuge Galaxy	VWR™	Pennsylvania, USA
Mikroskop Wilovert	Helmut Hund	Hessen, DE
Mini Trans-Blot [®] Cell	Bio-Rad	Kalifornien, USA
Mini-PROTEAN [®] Comb, 10-well	Bio-Rad	Kalifornien, USA
Mini-PROTEAN® Tetra	Bio-Rad	Kalifornien, USA
Molecular Imager VersaDoc™	Bio-Rad	Kalifornien, USA
MTA-1 Manual Tissue Arrayer	Estigen	Tartu County, EST
Neubauer Zählkammer	Brand	BW, DE
Eppendorf™ Pipette	Thermo Fisher	MA, USA
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad	Kalifornien, USA
-----------------------------------	-----------------	------------------
Premium NoFrost -20°C	Liebherr	Freiburg, CHE
Quick-Pak Mikrozentrifuge	Labnet Int.	New Jersey, USA
Rollenmischer RM5	Hecht Assistent	Bayern, DE
Spark Free Laboratory Freezer	Thermo Electron	MA, USA
Sterilbank Herasafe KS	Heraeus™	Hessen, DE
Sunlab® Rollenmischer SU 1400	Sunlab	Bayern, DE
Thermo Heraeus HeraCell Inkubator	Heraeus™	Hessen, DE
WBS Thermostatic Wasserbad	Fried Electric	Haifa, ISR

2.1.2 Chemikalien und Stoffe

Chemikalie/ Stoff	Herstellerfirma	Firmensitz
Acrylamide (30 %)	Bio-Rad	Kalifornien, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck	Hessen, DE
Aqua dest.	Gibco (Life Tech.)	Kalifornien, USA
Beta-Mercaptoethanol	Merck	Hessen, DE
Bio-Rad Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad	Kalifornien, USA
Bromphenolblau	Merck	Hessen, DE
CellTiter 96® (MTT)	Promega	Wisconsin, USA
Clarity Max™ Western ECL	Bio-Rad	Kalifornien, USA
cOmplete [™] , Mini Protease Inhibitor	Roche	Basel, CHE
Corbit-Balsam (Eukitt®)	I. Hecht	SH, DE
DMEM 1x GlutaMax [™]	Gibco (Life Tech.)	Kalifornien, USA
DMSO	Gibco (Life Tech.)	Kalifornien, USA
DNase/RNase-Free Distilled Water	Gibco (Life Tech.)	Kalifornien, USA
dNTPs (10 nM)	Roche	Basel, CHE
DPBS	Gibco (Life Tech.)	Kalifornien, USA
Ethanol absolut ≥ 99.8 %	VWR™	Pennsylvania, USA
FastStart TaqMan [®] Probe Master	Roche	Basel, CHE
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco (Life Tech.)	Kalifornien, USA
Glycerol	Merck	Hessen, DE
Glycin	Merck	Hessen, DE

H ₂ O ₂	Merck	Hessen, DE
Liquid Blocker Super Pap Pen	MBTec-Brand	Bayern, DE
Mayers Hämalaunlösung	Merck	Hessen, DE
Methanol	Merck	Hessen, DE
Milchpulver Gloria	Nestlé	Waadt, CHE
MinElute Spin Columns	QIAGEN N.V.	Limburg, NLD
Oligo(dT) _{12 - 18} Primer	Thermo Fisher	MA, USA
PBS Tabletten	Gibco (Life Tech.)	Kalifornien, USA
PCR Nucleotide Mix	Roche	Basel, CHE
Penicillin/ Streptomycin, flüssig	Biochrom GmbH	Berlin, DE
Ponceau S Lösung	Merck	Hessen, DE
Precision + Protein™WesternC™	Bio-Rad	Kalifornien, USA
Precision Protein™StrepTactin-HRP	Bio-Rad	Kalifornien, USA
Protektor RNAse Inhibitor	Roche	Basel, CHE
RIPA Puffer	Merck	Hessen, DE
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™	Gibco (Life Tech.)	Kalifornien, USA
RT-Puffer (5x)	Roche	Basel, CHE
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Merck	Hessen, DE
Target Retrieval Solution	Dako	Bayern, DE
Temed	Merck	Hessen, DE
Transkriptor Reverse Transcriptase	Roche	Basel, CHE
Transkriptor RT Reaktion Buffer 5x	Roche	Basel, CHE
Tris-Borate-EDTA Puffer	Merck	Hessen, DE
Trypanblau 0,4 %	Gibco (Life Tech.)	Kalifornien, USA
Trypsin/EDTA-Lsg. (0,05 / 0,02 %)	Gibco (Life Tech.)	Kalifornien, USA
TWEEN® 20	Merck	Hessen, DE
Verdünnungspuffer für	Zytomed Systems	Berlin, DE
Primärantikörper ZUC025		
Xylol	Merck	Hessen, DE

lew York, USA
DÖ, AUT
IRW, DE
lew Jersey, USA
DÖ, AUT
lew York, USA
IA, USA
lessen, DE
alifornien, USA
BW, DE
lamburg, DE
DÖ, AUT
lamburg, DE
Cent, UK

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

2.1.4 Kommerzielle molekularbiologische Test-Kits

-

2.1.5 Zytostatika und Hemmstoffe

Zytostatikum/ Hemmstoff	Herstellerfirma	Firmensitz
Doxorubicin A4361,0010	AppliChem	Hessen, DE
Etoposid 341205	Merck	Hessen, DE
YM155 S1130	Selleckchem	Bayern, DE

2.1.6 Antikörper, Primer, Sonden und RNA

Antikörper primär	Herstellerfirma	Firmensitz
Survivin antibody NB500-201 (rabbit)	Novos Biologicals	Colorado, USA
Anti-GAPDH 6C5 (mouse)	abcam	Cambridge, UK
Antikörper sekundär		
Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody	Cell Signaling	Cambridge, UK
Anti-mouse IgG Peroxidase antibody	Merck	Hessen, DE
Antikörper zur Isotypenkontrolle		
Negative Control Rabbit IgG Fraction	Dako	Kalifornien, USA
Primer/ Sonden		
Survivin Primer forward	Eurofins	Luxemburg, LUX
5' GCC CAG TGT TTC TTC TGC TT 3'		
Survivin Primer revers	Eurofins	Luxemburg, LUX
5' AAC CGG ACG AAT GCT TTT TA 3'		
GAPDH Primer forward	Roche	Basel, CHE
5' AGC CAC ATC GCT CAG ACA C 3'		
GAPDH Primer reverse	Roche	Basel, CHE
5' GCC CAA TAC GAC CAA ATC C 3'		
 Universal Probe Library Set, Human Sonde 11 (Survivin) Sonde 60 (GAPDH) 	Merck	Hessen, DE

qPCR human reference total RNA Stratagene Kalifornien, USA

2.1.7 Zusammensetzung der Lösungen/ Puffer

Lösung/ Puffer	Bestandteile
10x SDS Laufpuffer	1,9 M Glycin
	10 g SDS
	250 mM Tris
	auf 1 I Aqua dest.
10x Transferpuffer	192 M Glycin
	25 mM Tris
	auf 1,8l Aqua dest.
10x TBS Waschpuffer 1 pH 7,5	1,5 M NaCl
	100 mM Tris
	auf 1 I Aqua dest.
1x TBS-T Waschpuffer	1x TBS
	0,1 % Tween20
1,5 M Tris pH 8,8	181,65 g Tris
	auf 1 I Aqua dest.
1 M Tris pH 6,8	60,55 g Tris
	auf 500 ml Aqua dest.
Laemmli-Puffer 6x	3 ml beta-Mercaptoethanol
	Spatelspitze Bromphenolblau
	3 ml Glycerol
	1 g SDS
	3,75 ml 1M Tris pH 6.8
5 % Milchlösung	5 g Milchpulver Gloria
	100 ml TBS-Puffer

2.1.8 Histologische Proben

Bei den histologischen Proben handelte es sich um Gewebeproben aus Liposarkomen von 89 Patienten. die im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf (UKD) aufbereitet und in Paraffin eingebettet wurden. Die ausgewählten Liposarkome wurden im Zeitraum zwischen 2001 und 2014 in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie des UKD reseziert. Es handelte sich um Proben von 69 primären Liposarkomen sowie 20 Proben von Liposarkomrezidiven. Zusätzlich wurden 15 Lipome und 13 Fettgewebsproben sowie verschiedene Fremdgewebe zur Kontrolle verwendet. Aus diesen Proben wurden mittels Manueller Tissue Arrayer mehrere Tissue micro-arrays (TMA) erstellt, die anschließend immunhistochemisch gefärbt und ausgewertet wurden (Packeisen et al., 2003).

Initial wurden alle histopathologisch bestätigten Liposarkome ins Kollektiv eingeschlossen. Zur weiteren Untersuchung folgte eine Kategorisierung in Primärtumore und Rezidive. Tabelle 3 zeigt die histopathologischen sowie klinischen Datengruppen. Zur statistischen Auswertung des Merkmals Lokalisation wurden zwei neue Gruppen gebildet:

- oberflächlich = Kopf, Extremitäten und Thorax
- tief = abdominal und Retroperitoneum

Die Überlebensdaten wurden im November 2015 erfasst. Alle Berechnungen beziehen sich auf diesen Abfragezeitpunkt. Das Überleben in Monaten wurde zwischen Operation und Analysezeitpunkt berechnet, wobei Patienten mit einer perioperative Mortalität (Überleben < 30 Tage) ausgeschlossen wurden. Die Todesursache spielte für die Analysen keine Rolle.

Histopathologische/ klinische Gruppen	Ausprägungen
Geschlecht	männlich, weiblich
Alter	≤ Mittelwert 58,58 Jahre,
	> Mittelwert 58,58 Jahre
Kategorie	Primärtumor, Rezidiv
Lokalisation	Kopf, Extremitäten, Retroperitoneum,
	Abdomen, Thorax, unbekannt
Subtyp	gut differenziert, myxoid, pleomorph,
	dedifferenziert, unbekannt
Grading	G1, G2, G3, unbekannt
T-Status	T1, T2
Überleben in Monaten*	≤ Mittelwert 50,64,
	> Mittelwert 50,64
Größe in cm	≤ Mittelwert 12,85,
	> Mittelwert 12,85
IRS**	IRS ≤ 2,
	IRS > 2
	unbekannt
Mitoseindex (Mitosen/ HPF***)	Mitoseindex ≤ 0,65,
	Mitoseindex > 0,65,
	unbekannt
Status****	lebend, verstorben

Tabelle 3. Übersicht der histologischen und klinischen Daten

Die Tabelle zeigt die Kriterien für die statistische Auswertung des Patientenkollektivs sowie deren mögliche Ausprägungen. *Berechnung zwischen Operation und Analysezeitpunkt (Nov. 2015); **Immunreaktiver Score ; ***High-power-fields; ****Status zum Analysezeitpunkt

Alle Analysen und Untersuchungen am Patientenmaterial wurden nach den Vorgaben der Deklaration von Helsinki durchgeführt (World Medical, 2013). Die Patientendaten wurden nach Aufnahme in das Kollektiv anonymisiert. Des Weiteren wurden die Regeln der *good clinical practice* sowie allgemeine ethische Grundlagen gewahrt. Die Untersuchungen erhielten ein positives Ethikvotum der medizinischen Ethikkommission der Heinrich Heine Universität in Düsseldorf (Nr. 3821).

2.1.9 Zellkultur – verwendete Zelllinien

Um die Rolle von Survivin im LPS genauer zu analysieren und die Wirkung von YM155 auf die Survivin Expression im LPS zu erforschen wurden drei verschiedene LPS-Zelllinien kultiviert. Die Tabelle 4 zeigt die wichtigsten Eigenschaften dieser Zelllinien.

Bezeichnung	Subtyp	Herkunft	Referenz
Lipo DUE1	DDLPS	Peritoneale Sarkomatose	(Mersch et al., 2015)
Lipo 246A	DDLPS	Retroperitoneum	(Peng et al., 2011)
PLS-1	PLS	Extremität	(Lahat et al., 2010)

Tabelle 4. Übersicht der verwendeten Zelllinien für die Zellkulturversuche

Die Tabelle zeigt eine Übersicht der Zelllinien. Bei der Lipo DUE1 Zelllinie handelte es sich um G3 dedifferenzierte Liposarkomzellen eines malignen Aszites im Rahmen einer peritonealen Sarkomatose. Die Isolierung und Kultivierung erfolgte am Universitätsklinikum Düsseldorf. Die Lipo 246A Linie stammt ebenfalls von einem retroperitonealem Liposarkom und wurde von Peng et al. etabliert. Die PLS-1-Linie wurde aus einem pleomorphen Liposarkomrezidiv eines 80-jährigen Mannes gewonnen und kultiviert.

2.1.10 Verwendete Software

Software	Herstellerfirma	Firmensitz
FACS Diva Version 8.01	BD	New Jersey, USA
Graph Pad Prism 5	Graph Pad	Kalifornien, USA
i-control [™] Microplate Reader	Tecan	Zürich, CHE
IBM SPSS-Software 17.0	IBM	New York, USA
Microsoft® Excel Version 14	Microsoft	Washington, USA
Opticon Monitor	Bio-Rad	Kalifornien, USA
Quantity One Basic Version 4.6	Bio-Rad	Kalifornien, USA

2.2 Methoden

In diesem Abschnitt werden die Methoden zur Kultivierung der Zellen, die durchgeführten Versuche sowie die statistische Auswertung beschrieben. Die Versuche wurden nach den aktuell gültigen Protokollen der Hersteller beziehungsweise der chirurgischen Forschung der Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie am UKD durchgeführt.

2.2.1 Zellkultur

Zur Kultivierung der Zelllinien wurden Nährmedien der Firma Gibco verwendet. Die PLS-1 und die Lipo 246A Zellen erhielten DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), die Lipo DUE1 Linie RPMI Medium. Beide Nährmedien wurden mit 10 % FBS (Fetal Bovine Serum) und 1 % Penicillin/ Steptomycin ergänzt. Die Anzucht erfolgte bei 37°C sowie 5 % CO₂. Die Kultivierung fand an sterilen Werkbänken in 75 cm² Zellkulturflaschen von Greiner Bio-One statt. Die Zellen wurden bei ausreichender Konfluenz circa alle 4 – 5 Tage passagiert. Hierzu wurde 0,05 % Trypsin/ EDTA zum Ablösen der Zellen und PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) als Waschlösung von Gibco verwendet. Die PLS-1 und Lipo 246A Linien wurden stets 1 zu 3 passagiert und die Lipo DUE1 aufgrund langsameren Wachstums 1 zu 2. Bei Verwendung der 125 cm² Flaschen für Versuche mit größerem Zellbedarf wurde standardmäßig ein Mediumswechsel nach drei Tagen durchgeführt. Das Passagieren erfolgte bei circa 80 % nach etwa 7 Tagen.

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die Zählkammer nach Neubauer sowie der Farbstoff Trypanblau 0,4 % von Gibco genutzt. Nach Ablösung der Zellen und Waschung mit PBS wurden die Zellen in neues Medium aufgenommen. Anschließend wurde 20 µl Zelllösung mit 60 µl Trypanblau versetzt und vermischt (Verdünnung 1:4). Dann erfolgte die Beimpfung der Zählkammer mit 10 µl des Zell-Farbstoff-Gemisches. Es wurden alle Zellen in den 4 Eckquadraten eines Zählkreuzes ausgezählt. Unter Berücksichtigung der Verdünnung und des Kammerfaktors konnte die Zellzahl pro ml wie folgt berechnet werden:

Zellen/ml = $\left[\frac{\text{Zellzahl}}{4 \text{ (Anzahl der Quadrate)}}\right] \times 4 \times 10^4$

33

2.2.2 Proteinisolation

Für die Gewinnung von Gesamtproteinen wurden die Zelllinien in 25 cm² Flaschen ausgesät und bis zur 80 % Konfluenz inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgelöst Die Resuspendierung und gewaschen. erfolgte mit einer Protease-Inhibitor/ RIPA-Puffer-Lösung (Roche/Merck). Die Proben wurden anschließend 15 Minuten (Min.) auf Eis inkubiert und alle 5 Min. mittels Vortex (VWR[™]) gemischt. Nach Zentrifugierung (30 Min., 13.000 rpm, 4°C) erfolgte die Messung der Proteinkonzentration photometrisch mittels Bio-Rad Dye Reagent Concentrate (Bradford, 1976). Aus diesen Messwerten wurde, unter Zugabe von Laemmli Puffer und dH₂O, der fertige Proteinmix erstellt und anschließend mit dem Heizblock (HLC) für 5 Min. bei 95°C gekocht. Die Proteine wurden bei - 20°C in sterilen Eppendorf Tubes gelagert.

2.2.3 Gelelektrophorese und Western Blot (WB)

Zur Expressionsanalyse wurden die Proteine zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels WB (Tank-Blotting) übertragen.

Für die Gelelektrophorese kamen SDS-haltige Gele zum Einsatz. Die Zusammensetzung zeigt die Tabelle 5.

Substanz		Trenngel (15 %)	Sammelgel (5 %)
dH ₂ O	(Gibco)	2,3 ml	2,7 ml
1,5 M Tris	(Merck)	2,5 ml (pH 8,8)	0,5 ml (pH 6,8)
10 % SDS*	(Merck)	0,1 ml	0,04 ml
30 % Acrylamid	(Bio-Rad)	5,0 ml	0,67 ml
10 % APS**	(Merck)	0,1 ml	0,04 ml
TEMED***	(Merck)	0,004 ml	0,004 ml

Tabelle 5. Zusammensetzung der Elektrophorese GeleDie Tabelle zeigt die Mengenangaben für Trenn- und Sammelgel. Für Survivin (16,5kDa) wurde das 15 %ige Trenngel verwendet. *Sodium dodecyl sulfate;**Ammoniumpersulfat; ***N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

Nach Reinigung der Gelgießständer und Gießplatten wurde das Trenngel gegossen und mit Ethanol (VWR[™]) versiegelt. Nach Aushärtung (circa 20 Min.) und Abfiltration des Ethanols wurde das Sammelgel gegossen und mittels

Gelkamm (Bio-Rad Lab) in 10 getrennte Kammern unterteilt. Nach weiteren 20 Min. Aushärtungszeit folgte das Beladen der Gelkammern mit den vorbereiteten Proteinproben. Als Referenzbande wurde Precision Plus Protein[™] WesternC[™] Blotting Standards (Bio-Rad) verwendet. Die Elektrophorese wurde in einer mit 1x-SDS-Laufpuffer gefüllten Kammer für 30 Min. bei 90 V und anschließend für 60 Min. bei 115 V durchgeführt. Der Transfer erfolgte als Tank-blotting (Criterion Blotter, Bio-Rad) oder auch Nassblotting Verfahren auf eine Nitrocellulose Membran (Thermo Fisher). Die Kammer wurde hierzu mit 1x Transferpuffer gefüllt. Der Transfer wurde unter Kühlung bei 90 V für 90 Min. durchgeführt. Zur Detektion des erfolgreichen Proteintransfers wurde Ponceau S Lösung (Merck) verwendet, die nach Markierung der Proteinbanden mit Waschpuffer entfernt wurde.

Das Abblocken erfolgte mit 5 % Milchlösung (Nestlé) in 50 ml Falcon-Röhrchen (Greiner Bio-One) auf dem Rollenmischer (Sunlab) für eine Stunde. Nach anschließender Waschung folgte die Detektion mittels Primärantikörper für 16 Stunden. Hierzu wurde der Survivin Antikörper NB500-201 von Novus Biologicals in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Nach Inkubation folgte die Waschung der Membran mit TBS-T. Als Sekundärantikörper wurde Anti-rabbit IgG (Cell Signaling) genutzt und für 1 Stunde mit 1,3 µl Precision Protein™StrepTactin-HRP Rollmischer inkubiert. Die (Bio-Rad) auf dem Verdünnung des Sekundärantikörpers betrug ebenfalls 1:1000. Nach Ablauf der Inkubationszeit und anschließender Reinigung folgte die Analyse der Banden mittels Molecular Imager VersaDoc[™] (Bio-Rad) und Clarity Max[™] Western ECL Substrate (Bio-Rad).

Zur *housekeeping* Kontrolle wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) detektiert. Die Primär- sowie Sekundärantikörper (abcam) wurden 1:5000 verdünnt.

Die Behandlung der Liposarkom-Zelllinien für eine anschließende Proteindetektion mittels WB erfolgte mit YM155 in verschiedenen Konzentrationen (Tabelle 6).

Compound	Konzentrationen (nM)	Inkubationszeit (h)
YM155	1000300; 10030	12

 Tabelle 6. Verwendete Konzentration und Inkubationszeit von YM155 im Western Blot

2.2.4 RNA Isolierung

Zur Isolierung der RNA für die cDNA (komplementäre DNA) Synthese wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet. Zur Vorbereitung wurden die Zellen nach Entfernung des Mediums zunächst zwei Mal mit PBS gewaschen und anschließend abgelöst. Nach Zentrifugation folgte die Resuspendierung der Zellpellets mit 350 µl RLT-Puffer. Zum homogenisieren wurde das Zell-Puffer Gemisch mit einer Spritze durch eine Kanüle nochmals resuspendiert. Als Nächstes erfolgte die Zugabe von 350 µl Ethanol (70 %) und anschließend eine Durchmischung mittels Pipette. Die Lösung wurde dann auf die Säulen des RNeasy Mini Kits geladen und bei 8000 rpm für 15 Sekunden (Sek.). zentrifugiert. Nach Abgießen der Flüssigkeit wurden die Säulen mit 350 µl RW-1 Puffer (Qiagen) beladen und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Anschließend folgte die Hydrolyse der DNA mittels DNase/ RDD-Puffer Mix (10 µl DNase I Stock Solution + 70 µl RDD Puffer) bei Raumtemperatur für 15 Min. Im Anschluss daran wurde erneut 350 µl RW-1 Puffer auf die Säulen pipettiert und die Proben für 15 Sek. bei 8000 rpm zentrifugiert. Die Waschung der Säulen erfolgte zweimal mit 500µl RPE Puffer (Qiagen) mit einem Zentrifugationsgang für 15 Sek. bzw. 2 Min. bei 8000 rpm. Nach Überführen der Säule in ein neues Eppendorf Tube wurden die Säulen mit 40 µl RNase freiem Wasser (Gibco) beladen und bei 8000 rpm für 1 Min. zentrifugiert.

Die Messung der RNA Konzentration wurde photometrisch mit dem Infinite® M200 von Tecan durchgeführt. Hierzu wurde nach Kalibrierung mittels *blank* Probe je 1,5 µI der Proben auf die Testfelder aufgetragen und anschließend gemessen. Die Auswertung erfolgte mit i-control[™] Microplate Reader (Tecan).

2.2.5 cDNA Synthese

Zur Analyse der gewonnenen RNA wurde diese für die anschließende Real-Time PCR in cDNA umgeschrieben. Hierzu wurde maximal 5 µg RNA (Volumenberechnung nach RNA Menge) mit dH₂O auf 11 µl Volumen pipettiert. Des Weiteren wurden *house-keeping* Kontrollen, Lösungsmittelkontrollen, no-template (ohne RNA) und No Amplifikation-Kontrollen (ohne Reverse

Transcriptase) mitgeführt. Zu allen Proben wurden 2 μ l Oligo dT-Primer (Invitrogen) mit einer Konzentration von 0,25 μ g/ μ l gegeben und anschließend für 10 Min. bei 65°C inkubiert. Der nun benötigte Mastermix (MM) wurde wie folgt pipettiert:

•	RT-Puffer	(4 µl) [–]	7
•	Protector RNase Inhibitor	(5 µl)	
•	dNTP-Mix	(2 µl)	Roche
•	Reverse Transkriptase	(0,5 µl)	

Zur inkubierten RNA-Lösung wurden nun 7 µl vom MM gegeben und mit dem Vortex (VWR[™]) verrührt. Die Inkubation erfolgte für 30 Min. bei 55°C auf dem Heizblock (HLC). Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurden die Proben für 5 Min. auf 85°C erhitzt. Die fertige cDNA-Lösung wurde bei - 20°C in sterilen Tubes gelagert.

2.2.6 Real-Time PCR

Die gewonnene cDNA konnte anschließend mittels Real-Time PCR amplifiziert und quantitative gemessen werden. Hierzu wurden je 3 Ansätze pro cDNA Probe erstellt sowie *blank*- und *housekeeping*-Kontrollen mit GAPDH. Die Ansätze pro well setzten sich wie folgt zusammen:

•	FastStart TaqMan [®] Probe Master	(12,5 µl)	Roche
•	Sonde	(0,25 µl)	Merck
•	Primer forward	(0,25 µl)	Eurofins/Roche
•	Primer reverse	(0,25 µl)	Eurofins/Roche
•	dH ₂ O	(9,25 µl)	Gibco

Zu diesem Mix wurden dann 2,5 µl der entsprechenden cDNA Probe hinzu pipettiert und die fertige Platte mit Deckeln (Bio-Rad) verschlossen. Nach kurzer Zentrifugation wurde die Platte in den Dyad Disciple qPCR (Bio-Rad) gegeben und das Opticon Monitor Programm (Bio-Rad) gestartet. Die Amplifikation der DNA erfolgte nach folgendem Protokoll:

- Schritt 1: 95°C für 10 Min.
- Schritt 2: 95°C für 15 Sek.
- Schritt 3: 60°C für 1 Min.
- Schritt 4: Messung
- Schritt 5: Wiederholung der Schritte 2-4 für 39 weitere Zyklen
- Schritt 6: Beendigung

Bei unauffälligen *blank*-Kontrollen erfolgte die Auswertung der C_T- Werte (*Cycle of Threshold*) in Bezug auf GAPDH sowie auf die Referenz RNA (Stratagene) mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode von Livak et al. (Livak and Schmittgen, 2001). Die graphische Darstellung wurde mit Graph Pad Prism 5 durchgeführt.

Zur Bestimmung der optimal einzusetzenden cDNA Menge wurden vorrausgehend Effizienzkurven mit der humanen Referenz RNA erstellt. Abb. 6 zeigt die Effizienzkurve für Survivin und GAPDH. Nach diesen Ergebnissen wurden für die Versuche 6,25 ng cDNA eingesetzt.



Konzentration der cDNA (logarithmisch aufgetragen).

2.2.7 FACS-Analysen

Die Durchflusszytometrie oder auch FACS (*fluorescence-activated cell scanning*) dient der Erfassung großer Zellmengen in kurzer Zeit. Es können verschiedenste Parameter wie Absorption, Volumen oder Granularität von einzelnen Zellen erfasst werden. Dazu werden die Zellen einzeln durch eine Kapillare an verschiedenen Lasern vorbeigeführt und somit individuell erfasst (Rothe, 2007).

Für die Analyse wurde das FITC Annex./ Dead Cell Apopt. Kit von Thermo Fisher verwendet. Das verwendete Propidium iodide (PI) reichert sich ausschließlich in toten Zellen an. Apoptotische und vitale Zellmembranen sind undurchlässig für PI und bleiben somit ungefärbt. Das FITC Annexin hingegen färbt apoptotische Zellen grün, tote Zellen rot/ grün und vitale Zellen nicht an. Die unterschiedliche Aufnahme der Farbstoffe beruht auf Veränderungen der Zellmembran während der Apoptose beziehungsweise Nekrose.

Zur Analyse wurden 1x10⁶ Zellen pro FACS-Röhrchen (BD Biosciences) ausgesät. Diese wurden zuvor 48 Stunden mit YM155 (300 nM, 100 nM; 30 nM) behandelt. Nach einem Waschschritt und Abzentrifugierung der Flüssigkeit wurde 100 µl Annexin hinzugegeben. Zusätzlich wurden zu den Proben 5 µl FITC Annexin V sowie 1 µl *PI work solution* hinzugefügt. Neben den Proben wurden auch *blank*-Kontrollen und Kalibrierungsproben mitgeführt. Nach 15 Min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde je 400 µl 1x Annexin Bindungspuffer hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Analyse im BD FACSCanto[™] (BD Biosciences).



Annexin V FITC-A

Abb. 7:. FACS Analyse - blank-Kontrolle - Kalibrierung

Repräsentative *blank-Kontrolle* der PLS Zellen in der FACS Analyse. P1 zeigt die abgestorbenen Zellen (Propidium iodide pos.; FITC neg.). P2 zeigt die apoptotischen Zellen, die FITC und PI positiv gefärbt sind. Gate P3 zeigt lebende vitale Zellen die weder FITC noch PI gefärbt sind. Im P4 Gate finden sich früh-apoptotische Zellen die bereits FITC pos. aber noch PI neg. sind. Diese früh-apoptotischen Zellen würden sich am rechten P4 Gate Rand zeigen. Die hier dargestellte Population (hellgrün) zählt zu den vitalen Zellen.

Bei diesen FACS Analysen erfolgte die Kalibrierung mit Fokus auf das P2 Gate der apoptotischen Zellen (Abb. 7). Die dunkelgrüne (P3); hellgrüne (P4) und blaue Zellpopulation wird hier nach *blank*-Kontrollen als vitale Population gesehen und gewertet. Früh-apoptotische Zellen lagerten sich am rechten Bildrand, getrennt von der vitalen Population an. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem P2 Gate, um die Anzahl der definitiv apoptotischen Zellen zu erfassen.

2.2.8 MTS Assay

Die Messung der Zellaktivität erfolgte kolorimetrisch mittels CellTiter 96® von Promega. Grundlage dieser Messung ist ein stoffwechselabhängiger Farbumschlag des verwendeten Reagenz. Somit kann die Absorptionmessung

proportional zur Anzahl der lebenden Zellen gestellt werden. Diese Methode dient ebenfalls dazu die Wirkung eines *Compounds* auf die Zellen zu testen.

Hierzu wurden 1x10⁴ Zellen pro Well ausgesät und inkubiert. Dann folgte die Behandlung mit einem *Compound* in verschiedenen Konzentrationen und unterschiedlich langer Inkubationszeit (Tabelle 7), wobei pro Konzentrationsstufe mindestens 3 Wells angesetzt wurden. Zusätzlich kamen zeitgleich angesetzte Kontrollen zum Einsatz um eine Toxizität des Lösungsmittels auszuschließen. Nach Behandlung erfolgte die Zugabe von 20 µl der Reagenzlösung (Promega). Die Messung der Stoffwechselaktivität der Zellen startete nach 30 Min. und folgte dann alle 30 Min. Zwischen den Messungen erfolgte die Inkubation bei 37°C im Brutschrank. Die Analyse wurde im Infinite® M200 (Tecan) mittels MTS Protokoll durchgeführt. Als Messwellenlänge wurde 490 nm und als Referenzwellenlänge 630 nm verwendet. Zur weiteren Berechnung wurden Differenzwerte zwischen Mess- und Referenzwellenlänge genutzt.

Compound	Konzentrationen (µM)	l) Inkubationszeit (h	
YM155*	 10 3; 1 0,3; 0,1 0,03; 0,01 0,003; 0,001 		
Doxorubicin*	 10 3; 1 0,3; 0,1 0,03; 0,01 	96	
Etoposid*	 100 30; 10 3; 1 0,3; 0,1 		

Compound Kombinationen

Doxorubicin + YM155 Etoposid + YM155	10 + • 0,1 • 0,03 • 0,01	72
---	-----------------------------------	----

 Tabelle 7. Compounds für MTS Assays mit Konzentration und Inkubationszeiten

 *Lösungsmittel DMSO Gibco (Dimethyl sulfoxide)

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit Microsoft® Excel Version 14. Hier wurden die Mittelwerte der Proben für jede Konzentrationsstufe berechnet. Anschließend wurden die gemittelten Werte der Lösungsmittelkonzentrationen dividiert und mal 100 multipliziert. Als Ergebnis erhält man die Prozentangaben, die das Überleben der Zellen der verschiedenen Konzentrationsstufen widerspiegelten. Bei den kombinierten Versuchsansätzen erfolgte die Berechnung des FP-Wertes (*fractional product*) (Webb, 1963):

FP-Wert = Erwartetes Überleben – Gemessenes Überleben

Die FP-Werte galten ab einem Wert von > 0,1 als signifikant und somit als Marker für eine Sensibilisierung der Zellen.

2.2.9 Tissue Mikroarray (TMA)

Für die Auswertung der histologischen Proben wurden zunächst die Tumorareale auf den Schnitten markiert. In diesem Bereich wurde dann die Stanze aus dem Probenblock entnommen und in ein vorgetanztes Loch im Empfängerblock übertragen. So konnten 5 TMAs mit folgenden Proben pro TMA erstellt werden:

- Liposarkomproben (je zwei Stanzen pro Liposarkom)
- 5 Fettgewebsproben
- 5 Lipome
- 3 Fremdgewebe (Anordnungskontrolle)

Nach Fertigstellung wurden die TMAs mit Paraffin versiegelt und für die immunhistochemische Färbung geschnitten.

2.2.10 Immunhistochemie

Die Immunhistochemische Analyse der Survivin Expression wurde mit Hilfe des Zyto-Chem-PlusHRP Kit (Zytomed Systems) durchgeführt. Die vorbereiteten TMA Schnitte wurden zunächst mit Xylol entparaffiniert. Es folgte eine absteigende Alkoholreihe zur Entwässerung der Schnitte mit anschließender Reinigung in dH₂O. Die Demaskierung der Epitope erfolgt durch Kochen der Schnitte für 30 Min. in einem Bad aus Natrium-Citrat-Puffer. Nach Abkühlung wurden die Schnitte gewaschen, getrocknet und mit dem Super Pap Pen (MBTec-Brand) markiert. Die weiteren Schritte sind im Folgenden zusammengefasst. Zwischen den Schritten erfolgte das Reinigen der Schnitte mit PBS und Tween20:

- 1. Inhibierung der endogene Peroxidase: H₂O₂-PBS (3 %) für 10 Min
- 2. Blockierung: Blockierlösung für 10 Min
- Primärantikörper: Survivin NB500-201- rabbit (Novos Biologicals) Verdünnung 1:750 für 60 Min.
- 4. Sekundärantikörper: biotinlylated-antibody 15 Min.
- 5. Visualisierung: DAB-Substrat 10 Min. in Dunkelkammer
- 6. Kernfärbung: Mayers Hämalaun für 15 Sek. dann 15 Min. wässern
- 7. Aufsteigende Alkoholriehe: 70 %, 80 % und 90 % für je eine Min.
- 8. Abschließend zwei Min. im Xylolbad
- 9. Eindeckeln mit Corbit-Balsam (Eukitt®)

Neben den TMA Schnitten wurden auch negativ Kontrollen gefärbt. Hierzu wurden Tonsillen und Colongewebe verwendet. Zur Isotypenkontrolle wurde der Negative Control Rabbit Immunglobulin Fraction Antikörper von Dako verwendet.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung erfolgte mit Hilfe des IRS (Immunoreactive Remmele Score) nach Remmele et al. (Remmele and Stegner, 1987). Dies erfolgte lichtmikroskopisch nach Farbintensität und Menge der gefärbten Zellen einer Probe. Daraus ergaben sich die IRS-Werte, die für die weiteren Berechnungen verwendet worden sind (Tabelle 8). Für die weitere statistische Auswertung wurde eine hohe Survivin Expression als IRS > 2 und eine geringe Survivin Expression als IRS \leq 2 definiert. Der *cut-off* Wert wurde nach dem mittleren IRS-Wert der gefärbten Proben gewählt.

Keine Schwache Mäßige Starke Pos. Zellkerne (%) Reaktion Reaktion Reaktion Reaktion IRS = 00 % IRS = 0IRS = 0IRS = 0< 10 % IRS = 0IRS = 1 IRS = 2 IRS = 310 - 50 % IRS = 4IRS = 0IRS = 2IRS = 651 - 80 % IRS = 0IRS = 3IRS = 6IRS = 9IRS = 4> 80 % IRS = 0**IRS = 8** IRS = 12

Farbintensität

 Tabelle 8. Modifizierter Immunreaktiver Score (IRS) nach Remmele

Grau schattierter Bereich zeigt den verwendeten cut-off Wert für die statistischen Analysen. Quelle: (Remmele and Stegner, 1987).

2.2.11 Statische Datenauswertung

Alle Messergebnisse wurden stets mindestens dreifach erhoben. Hieraus wurden Mittelwert sowie Standartabweichung errechnet, die dann in die Analysen und Graphiken eingeflossen sind. Bei den Ergebnissen der Western Blot-Analysen wurde ein repräsentatives Beispiel der drei unabhängigen Versuche zur bildlichen Darstellung gewählt.

Zur Datenverwaltung und Darstellung der Messergebnisse wurde Microsoft® Excel Version 14 (Microsoft), IBM SPSS-Software 17.0 (IBM) sowie Graph Pad Prism 5 (Graph Pad) verwendet. Tabelle 9 zeigt die durchgeführten statistischen Analysen mit den zugrundeliegenden Statistischen Mittel

Analysen	Statistisches Mittel	
Überlebensanalysen	Kaplan-Meier-Kurven, log rank Test	
Korrelations- /Verteilungsanalysen	Chi ² -Test (<i>Fisher-exact test</i>), CC*, Cramers V	
	Kruskal-Wallis Test; Dunn´s Test,	
	Mann-Whitney-U Test	
Uni-/ multivariate Analysen	Cox-Regression mit HR** und CI***	
Tabelle 9 Statistische Tests		

*Kontingenzkoeffizient; **Hazard Ratio; ***Konfidenzintervall (95 %)

Der Signifikanzwert p wurde bei allen Test mit p < 0,05 angesetzt. Bei der Interpretation des Cramers V wurde ein Wert < 0,2 als schwacher, > 0,2 - 0,5 als mittelstarker und > 0,5 als starker Zusammenhang gewertet. Zur weiteren

Datenbeschreibung wurde die *Hazard Ratio* (HR) mit Konfidenzintervall 95 % (CI) berechnet. Das Gesamtüberleben definierte sich als die Zeit vom Zeitpunkt der Operation bis zum Tod unabhängig von der Todesursache (Gesamtüberleben). Überlebende wurden zum Zeitpunkt des letzten *follow-up* zensiert.

3. Ergebnisse

3.1 Liposarkom – statistische Auswertung

Im Rahmen der statistischen Auswertung der histologischen und klinischen Daten wurden zunächst Korrelationen zwischen den Ausprägungsmerkmalen analysiert. Anschließend wurden die Daten auf prognostische Wertigkeit im Rahmen von Überlebensanalysen untersucht. Die Beurteilung auf die Wertigkeit als Prognosefaktor wurde unter Beachtung der REMARK-Kriterien (REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies) durchgeführt (McShane et al., 2005). Es folgten weitere Auswertungen der Survivin Expression im LPS. Abschließend wurde das Rezidivkollektiv analysiert und beschrieben.

3.1.1 Patientenkollektiv

Das Kollektiv der verwendeten Tumorproben umfasste insgesamt Proben von 69 Patienten mit primärem LPS sowie 20 Proben von Patienten mit Rezidivtumoren. Alle Proben wurden im Zeitraum zwischen 2001 und 2014 chirurgisch reseziert und im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf aufbereitet. Die folgenden Analysen beziehen sich zunächst auf die Gruppe der Primärtumoren. Untersuchungen zum Rezidivkollektiv werden im Anschluss gesondert beschrieben.

Im Vergleich zu Referenzarbeiten, sowie zum aktuellen Forschungsstand, zeigte sich eine repräsentative Verteilung der von uns untersuchten Merkmale (Lee et al., 2018, C. D.M. Fletcher, 2002). Mit 59,4 % waren Männer häufiger betroffen als Frauen (40,6 %). Das mittlere Alter beider Geschlechter zum Zeitpunkt der Operation betrug 58.58 Jahre (29 - 93 Jahre) und der Median lag bei 59 Jahren. Diese Altersverteilung findet sich auch in anderen Analysen zum LPS wieder (Kuhnen et al., 2004). In unserem Kollektiv waren die Frauen bei Operation circa 3,3 Jahre jünger als die Männer (Abb. 8).



Abb. 8: Geschlechtergetrennte Altersverteilung der Patienten mit primärem Liposarkom Die Abbildung zeigt die Altersverteilung bei Männern und Frauen sowie die Mittelwerte und den Median in Jahren zum Zeitpunkt der Operation.

Die Lokalisation der Primärtumore zeigte eine repräsentative Verteilung. Am häufigsten trat der Tumor an den Extremitäten (37,7 %) und dem Retroperitoneum (36,2 %) auf. Innerhalb der Gruppe der Extremitäten wurde nicht zwischen oberer und unterer Extremität differenziert. Seltenere Lokalisationen waren der Kopfbereich mit einem Fall (1,4 %), das Abdomen mit 12 Fällen (17,4 %) und der Thorax mit 4 Fällen (5,8 %) (Tabelle 10).

Kategorie

Fälle	
	69 (100)
Geschlecht	
männlich	41 (59,4)
weiblich	28 (40,6)
Alter	
≤ Mittelwert 58,58 Jahre	33 (47,8)
> Mittelwert 58,58 Jahre	36 (52,2)
Lokalisation*	<u> </u>
Kopf	1 (1,4)
Extremitäten	26 (37,7)
Retroperitoneum	25 (36,2)
Abdomen	12 (17,4)
Thorax	4 (5,8)
unbekannt	1 (1,4)
Subtyp	
gut differenziert	28 (40,6)
myxoid	21 (30,4)
pleomorph	6 (8.7)
dedifferenziert	14 (20,3)
Grading	
G1	30 (43.5)
G2	19 (27.5)
G3	16 (23.2)
unbekannt	4 (5.8)
T-Status	
T1	12 (17.4)
T2	57 (82.6)
Überleben in Monaten	
≤ Mittelwert 50.64	43 (62.3)
> Mittelwert 50,64	26 (37.7)
Tumoraröße in cm	
≤ Mittelwert 12.85	29 (42.0)
> Mittelwert 12,85	40 (58.0)
Survivin	
niedria (IRS** \leq 2)	28 (40.6)
hoch (IRS > 2)	32 (46 4)
unbekannt	9 (13 0)
Mitoseindex (Mitosen/HPF***)	
\leq Mittelwert 0.65	39 (56 5)
> Mittelwert 0.65	11 (15 9)
unbekannt	19 (27 5)
lebend	42 (60 9)
verstorhen	
VEISIOIDEII	LI (UU,I)

Tabelle 10. Merkmalsverteilung im Primärtumorkollektiv*weitere Gruppierung in oberflächlich (Kopf, Extremitäten und Thorax) und tiefe (Abdomen und
Retroperitoneum) Tumore; **Immunreaktiver Score; ***high-power-fields

Den häufigsten Subtyp im Kollektiv bildete das gut differenzierte LPS mit 40,6 %, gefolgt vom myxoiden LPS mit 30,4 % der Fälle. Bei 14 Patienten (20,3 %) wurde ein DDLPS diagnostiziert. Am seltensten trat das PLS mit 8,6 % der Fälle auf.

Beim Grading konnten 30 Proben (43,5 %) als G1 definiert werden, 19 (17,5 %) als G2 und 16 (23,2 %) als G3 Tumore. Bei 4 Proben (5,8 %) war keine Zuordnung möglich. Beim T-Status erfolgte die Unterscheidung zwischen T1 (17,4 %) und T2 (82,6 %). Beim Überleben erfolgte eine Kategorisierung mittels *cut-off* zum Mittelwert von 50,64 Monaten. 43 Patienten (62,3 %) überlebten weniger oder gleich 50,64 Monate nach Operation und 26 (37,7 %) länger als 50,64 Monate.

Zur Analyse von Survivin im LPS erfolgte die Quantifizierung der Survivin-Menge mittels immunhistologischer Färbung und einer anschließenden Auswertung mit dem IRS nach Remmele. Aufgrund des errechneten Mittelwertes der gefärbten Proben wurde ein *cut-off* Wert von 2 gewählt. Die Auswertung ergab bei 28 Proben (40,6 %) einen IRS Wert von 2 oder kleiner und bei 32 Proben (46,4 %) einen IRS größer als 2. Bei 9 Tumorproben (13,0 %) konnte der IRS nicht erhoben werden.

Unter den 69 primären Liposarkomen waren zum Analysezeitpunkt 42 Patienten (60,9 %) am Leben und 27 (39,1 %) verstorben (Tabelle 10).

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Merkmalen wurden die Mitosen pro HPF (*high-power field*) erhoben und ebenfalls in zwei Subgruppen eingeteilt. Der *cut-off* lag hier beim Median von 0,65 (Mitosen/HPF).

Im Rahmen der Analysen konnte eine Korrelation zwischen dem Subtyp und der Lokalisation (tief vs. oberflächlich) ermittelt werden (p = 0,012; CC = 0,373; Cramers V = 0,402). Hierbei zeigte sich, dass die DDLPS vorwiegend in den tiefen Lokalisationen auftraten. Außerdem wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Lokalisation und dem Grading (p = 0,012; CC = 0,349; Cramers V = 0,373) festgestellt. Die G2 und G3 Tumore traten häufiger in den tiefen Lokalisationen auf als die LPS mit G1 Status.

Abb. 9 stellt die Verteilung der Subtypen in Bezug auf das histopathologische Grading dar. Hier zeigte sich eine signifikante Korrelation im Chi²-Test (p < 0,001;

CC = 0,637; Cramers V = 0,584). Wie dargestellt waren die WDLPS häufig G1 Tumoren, während die DDLPS eher als G2 oder G3 klassifiziert wurden.

Des Weiteren bestand eine Assoziation zwischen dem Mitoseindex und den zugrundeliegenden Subtypen (p < 0,001; CC = 0,567; Cramers V = 0,689). Die WDLPS zeigten in 100 % der Fälle einen Mitoseindex \leq 0,65, die MLPS in 89% der Fälle. Bei den PLS konnte in 3 von 3 Fällen ein Mitoseindex über dem *cut-off* ermittelt werden. Bei den DDLPS zeigte sich eine annähernd gleiche Verteilung um den *cut-off* von 0,65 Mitosen/ HPF.

Neben den Subtypen korreliert das Grading auch mit der Tumorgröße zum Mittelwert 12,85 cm (p = 0,002; CC = 0,404; Cramers V = 0,442). Hierbei zeigte sich, dass eine zunehmende Tumorgröße mit einem schlechteren Grading assoziiert ist.



Abb. 9: Häufigkeit des histopathologischen Grading innerhalb der Subtypen

3.1.2 Survivin im Liposarkom

Die Survivin Proteine der histologischen Proben wurden immunhistochemisch gefärbt und mittels IRS ausgewertet. Abb. 12 zeigt repräsentative Schnitte der TMA-Stanzen. Hier lassen sich die unterschiedlichen Intensitäten der Färbungen erkennen. Anhand der Intensität wurde dann der IRS bestimmt. Es konnten 60 verwertbare Proben für die Analyse genutzt werden. Nach Gruppierung zum *cut-off* 2 wurden Korrelationsanalysen durchgeführt. Hierzu wurde der Chi²-Test mit einem Signifikanzniveau von p < 0,05 verwendet. Die unbekannten Fälle wurden bei der Berechnung ausgeschlossen und sind zur Vollständigkeit unter den Kategorien aufgeführt.



Abb. 10: Repräsentative Schnitten der TMA-Tumorstanzen nach immunhistochemischer Färbung

Dargestellt sind lichtmikroskopische Übersicht- und Detailaufnahmen der gefärbten Tumorstanzen des TMA. *gut differenziertes Liposarkom; **Dedifferenziertes Liposarkom; ***Myxoid/Rundzelliges Liposarkom; ****Pleomorphes Liposarkom

Zusätzlich zu den Patientenproben wurden 13 Fettgewebe Kontrollen sowie 15 Lipom-Proben gefärbt. Weder die Lipome noch das Fettgewebe zeigten eine messbare Färbung und wurden daher mit IRS = 0 klassifiziert. Im Unterschied zu den Primärtumoren ist Survivin im Fettgewebe und im Lipom nicht exprimiert (p < 0,001; CC = 0,459; Cramers V = 0,516).

Die Tabelle 12 zeigt die Verteilungen und die ermittelten p-Werte des Chi²-Tests. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem IRS und dem Subtyp aufgezeigt werden (p < 0,001). Die WDLPS fielen durch eine niedrige Survivin Expression (IRS ≤ 2) auf. Im Gegensatz dazu konnte bei den übrigen Subtypen eine hohe Expression von Survivin (IRS > 2) nachgewiesen werden. Darüber hinaus bestand ein Zusammenhang zwischen der Survivin Expression und dem Grading (p = 0,001) sowie der Tumorgröße (p = 0,011). Die *low-grade* LPS (G1) zeigen im Gegensatz zu den high-grade (G2 und G3) LPS eine geringere Survivin Expression. Zwischen G2 und G3 ließ sich kein signifikanter Expressionsunterschied feststellen. Hinsichtlich der Tumorgröße zum cut-off 12,85 cm zeigte sich eine erhöhte Survivin Expression mit zunehmender Tumorgröße. Weiterhin konnte eine Korrelation zwischen Mitoseindex und Survivin Expression gezeigt werden. Hier ist ein hoher Mitoseindex mit einer erhöhten Survivin Menge assoziiert (p = 0,002).

Im Rahmen der univariaten Überlebensanalyse (Tabelle 11 und Abb. 11) konnte erwiesen werden, dass Survivin signifikant mit dem Outcome korreliert (p = 0,014; HR = 2,828 [1,178 - 6,790]). Dieser Zusammenhang bestätigte sich im Chi²-Test mit dem Überleben zum *cut-off* 50,64 Monate mit einem p-Wert von 0,045 (Tabelle 13). Die Überlebensrate innerhalb der ersten 5 Jahre nach Operation betrug 78,6 % für Patienten mit einer niedrigen Survivin Expression. Die Patienten mit einem hohem IRS Wert und somit einer hohen Survivin Expression zeigten nur eine 5J-ÜL von 43,8 %.

	Survivin		
	niedrig	Hoch	Ch:2 Test
	IRS* ≤ 2	IRS* > 2	
			(p-wert)
Fälle n (%)	28 (46,7)	32 (53,3)	
Geschlecht			
männlich	18 (30,0)	16 (26,7)	0.265
weiblich	10 (16,7)	16 (26,7)	0,205
Alter			
≤ Mittelwert 58,58 Jahre	15 (25,0)	14 (23,3)	0 1 1 0
> Mittelwert 58,58 Jahre	13 (21,7)	18 (30,0)	0,440
Lokalisation			
Oberflächlich	13 (21,7)	15 (25,0)	
(Kopf, Extremitäten, Thorax)			0 022
Tief	14 (23,3)	17 (28,3)	0,922
(Retroperitoneum, Abdomen)			
unbekannt	1 (1,7)	-	
Subtyp			
gut differenziert	22 (36,7)	2 (3,3)	
Myxoid	2 (3,3)	16 (26,7)	< 0.001
Pleomorph	-	5 (8,3)	< 0,001
Dedifferenziert	4 (6,7)	9 (15)	
Grading			
G1	18 (30,0)	8 (13,4)	
G2	4 (6,7)	11 (18,34)	0,001
G3	2 (3,3)	13 (21,7)	
unbekannt	4 (6,7)	-	
T-Status			
T1	5 (8,3)	5 (8,3)	0.017
T2	23 (38,3)	27 (45,0)	0,817
Überleben in Monaten			
≤ Mittelwert 50,64	14 (23,4)	24 (40,0)	0.045
> Mittelwert 50,64	14 (23,4)	8 (13,4)	0,045
Tumorgröße in cm			
≤ Mittelwert 12,85	17 (28,3)	9 (15,0)	0.011
> Mittelwert 12,85	11 (18,3)	23 (38,3)	0,011
Mitoseindex (Mitosen/ HPF**)			
≤ Mittelwert 0,65	18 (30,0)	15 (25,0)	0,002
> Mittelwert 0,65	-	10 (16,7)	
unbekannt	10 (16,7)	7 (11,7)	

 Tabelle 11. Korrelationsanalysen zwischen IRS und klinischen Parametern mittels Chi ²-Test

 *Immunreaktiver Score; **high-power field

3.1.3 Überlebensanalysen beim primären Liposarkom

Für die Überlebensanalysen im Patientenkollektiv der Primärtumoren wurden uniund multivariate Analysen durchgeführt. Die univariaten Analysen wurden mit Kaplan-Meier Kurven und dem Log-Rank Test durchgeführt. Die Berechnung der multivariaten Analyse erfolgte mittels Cox-Regression zur Ermittlung von HR und CI. Bei allen Analysen wurde ein Signifikanzniveau von p < 0,05 gewählt und die folgenden Variablen eingebunden:

- Geschlecht
- Patientenalter
- Lokalisation
- Subtyp
- Grading
- T-Status
- Tumorgröße
- Survivin Expression (IRS)
- Mitoseindex

Für diese Analysen 69 Patienten primären Liposarkom konnten mit betrug eingeschlossen werden. Das mittlere Überleben 50.64 Monate (0 - 167 Monate, Median 30 Monate) und die 5-Jahres Überlebensrate (5J-ÜL) lag bei 60,87 %.

Bei den Kriterien Geschlecht, Alter und T-Status zeigten sich keine signifikanten Korrelationen zum Überleben (Tabelle 11). Bei der Tumorlokalisation konnte ein schlechteres Outcome der tiefen Tumoren gezeigt werden (p = 0,021; HR = 2,585 [1,116 - 5,987]). Im Vergleich zeigten die tiefen Tumoren ein kürzeres 5J-ÜL von 51,35% im Vergleich zu den oberflächlichen Tumoren (74,19%). Ein signifikanter Unterschied stellte sich ebenfalls bei der Subtypenanalyse dar. Hier ergaben die Berechnungen, dass das DDLPS und das PLS geringere Überlebenszeiten zeigten als das MLPS oder WDLPS (p < 0,001; HR = 1,874 [1,348 - 2,605]). Die berechneten 5J-ÜL Raten für die verschiedenen Subtypen betrugen:

- WDLPS 78,57 %
- DDLPS 28,57 %
- MLPS 66,67 %
- PLS 33,34 %

Beim Grading korrelierte ein höherer G-Status mit einem kürzeren Gesamtüberleben. Das Signifikanzniveau lag hier bei p = 0,003 (HR = 2,002 [1,263 - 3,173] und das 5J-ÜL bei 83 % für die G1 Tumore, 42,1 % für die G2 Tumore sowie 37,5 % für die G3 Tumore.

Die Größe der Tumore betrug im Mittel 12,85 cm (2 cm – 33 cm) und ging bei zunehmender Tumorausdehnung ebenfalls mit einem schlechteren Outcome einher (p = 0,040; HR = 2,343 [0,990 - 5,547]). Auch hier zeigten sich Unterschiede im 5J-ÜL:

Tumorgröße ≤ 12,85 cm = 5J-ÜL 75,86 % Tumorgröße > 12,85 cm = 5J-ÜL 50,00 %

Des Weiteren zeigte sich eine Korrelation zwischen hohem Survivin Expressionswerten (IRS > 2) und einem schlechteren Outcome (p = 0,014; HR = 2,828 [1,178 - 6,790]. Das 5J-ÜL betrug hier:

niedrige Survivin Expression (IRS \leq 2) = 5J-ÜL 78,60 % hohe Survivin Expression (IRS > 2) = 5J-ÜL 43,80 %

Abschließend korreliert ein hoher Mitoseindex (Mitosen/HPF) mit einem kürzeren Gesamtüberleben im Kollektiv mit einem p-Wert von 0,031 (HR = 2,735 [1,054 - 7,097]). Die 5J-ÜL betrug hier ca. 72 % für Tumore mit einem niedrigen Mitoseindex, und 36,4 % für Tumore mit einem hohen Mitoseindex (Tabelle 11).

Somit konnten die Parameter Lokalisation, Subtyp, Grading, Tumorgröße, Survivin Expression (IRS-Wert) und Mitoseindex als potentielle prognostische Faktoren identifiziert werden. Abb. 10 sowie Abb. 11 zeigen die zugehörigen Überlebenskurven der statistisch signifikanten Parameter nach Kaplan Meier.

Zur Prüfung der Unabhängigkeit der prädiktiven Faktoren wurden multivariate Analysen mittels Cox Regression als Schrittweise rückwärts ausschließendem Modell durchgeführt. Hier ergaben die Analysen, dass der Subtyp und die Tumorgröße unabhängige Prognosefaktoren für das Überleben darstellen.

	HR	95 % CI	p-Wert
Geschlecht	0,880	0,403 - 1,923	0,104
Alter	2,075	0,932 - 4,622	0,065
Lokalisation*	2,585	1,116 - 5,987	0,021
Subtyp	1,874	1,348 - 2,605	< 0,001
Grading	2,002	1,263 - 3,173	0,003
T-Status	1,161	0,401 - 3,359	0,780
Tumorgröße	2,343	0,990 - 5,547	0,040
Survivin	2,828	1,178 - 6,790	0,014
Mitoseindex	2,735	1,054 - 7,087	0,031

Univariate Analyse

 Tabelle 12. Univariate Analysen der primären Liposarkome

 *Differenzierung zwischen oberflächlich und tiefer Lokalisation

Multivariate Analyse

	HR	95 % CI	p-Wert
Geschlecht	1,257	0,392 - 4,034	0,700
Alter	1,755	0,611 – 5,042	0,296
Lokalisation*	1,788	0,644 - 4,964	0,265
Subtyp	2,259	1,423 – 3,586	0,001
Grading	1,585	0,693 – 3,626	0,275
T-Status	3,845	0,809 - 18,274	0,090
Tumorgröße	3,041	1,059 – 8,737	0,039
Survivin	2,000	0,439 – 9,121	0,370
Mitoseindex	0,627	0,172 – 2,283	0,479

 Tabelle 13. Multivariate Analysen der primären Liposarkome

 *Differenzierung zwischen oberflächlich und tiefer Lokalisation



Abb. 11. Kaplan Meier Kurven für Überlebensanalysen

Überlebensanalysen der klinischen und histopathologischen Merkmale mittels Kaplan Meier Kurven und log-rank Test mit p < 0,05. a) Korrelation zwischen oberflächlicher (Kopf, Extremitäten und Thorax) und tiefer (Abdomen und Retroperitoneum) Lokalisation b) Vergleich des Gesamtüberlebens unter den verschiedenen Subtypen des Liposarkoms





Überlebensanalysen der klinischen und histopathologischen Merkmale mittels Kaplan-Meier Kurven und log-rank Test mit p < 0,05. a) Analyse von G-Status vs. Outcome b) Vergleich zwischen Tumorgröße \leq 12,85 cm und > 12,85 cm c) Korrelation zwischen Survivin Expression (IRS) und Überleben d) Vergleich zwischen Mitoseindex zum *cut-off* 0,65 in Bezug zum Überleben in Monaten. *Mitosen/high-power field

3.1.4 Rezidivkollektiv des Liposarkoms

Das Kollektiv der Rezidivtumore umfasste 20 Patientenproben, die ebenfalls immunhistochemisch gefärbt wurden. Auch hier erfolgte die Erhebung der histopathologischen und klinischen Daten und die anschließende Auswertung. Tabelle 14 zeigt die Verteilungen innerhalb des Kollektivs sowie die Mittelwerte für Alter, Überleben in Monaten, Mitoseindex und Tumorgröße in cm.

Das Alter der Patienten mit Rezidivtumoren betrug im Mittel 61,6 Jahre (33 - 86 Jahre, Median 62,5 Jahre). Das mittlere Überleben in Monaten bei den Rezidivpatienten betrug 35,90 Monate (0 - 128 Monate, Median 15 Monate). Die Größe der Rezidivtumore betrug im Mittel 9,39 cm (1,2 - 44 cm, Median 3,75 cm). 16 Proben (80,0 %) zeigten eine hohe Survivin Expression (IRS > 2) und 4 Proben (20,0 %) ein IRS-Wert \leq 2 und somit eine geringe Survivin Expression. Von den eingeschlossenen Fällen im Rezidivkollektiv waren zum Erhebungszeitpunkt 8 (40,0 %) der Patienten am Leben und 12 (60,0 %) verstorben.

Im Vergleich zum Kollektiv der primären LPS, zeigten sich bei den Pateinten mit Rezidiven mehr Tumore im Abdomen (PT = 17,4 %; Rezidiv = 45,0 %). Auch bei der Häufigkeit der Subtypen zeigten sich Unterschiede zum Kollektiv der Primärtumore. Während der gut differenzierte Subtyp prozentual mit 40,6 % unter den Primärtumoren am häufigsten auftrat, machte er bei dem Rezidiv Kollektiv nur noch 10,0 % aus. Andersherum verhielt es sich mit den MLPS, die bei den primären Tumoren noch 30,4 % der Fälle ausmachten und bei den Rezidiven 40,0%.

Kategorie

Fälle	
	20 (100)
Geschlecht	
männlich	8 (40,0)
weiblich	12 (60,0)
Alter zum Mittelwert	
≤ Mittelwert 61,60 Jahre	8 (40,0)
> Mittelwert 61,60 Jahre	12 (60,0)
Lokalisation*	
Kopf	-
Extremitäten	5 (25,0)
Retroperitoneum	3 (15,0)
Abdomen	9 (45,0)
Thorax	2 (10.0)
unbekannt	1 (5.0)
Subtyp	
aut differenziert	2 (10.0)
myxoid	8 (40.0)
pleomorph	4 (20.0)
dedifferenziert	5 (25.0)
unbekannt	1 (5.0)
Grading	. (0,0)
G1	5 (25 0)
G2	8 (40 0)
G3	6 (30 0)
unbekannt	1 (5 0)
T-Status	1 (0,0)
T1	12 (60.0)
T2	8 (40 0)
Überlehen zum Mittelwert	0 (+0,0)
< Mittelwert 35 90 Monate	12 (60 0)
> Mittelwert 35 90 Monate	8 (40 0)
Tumoraröße in cm	0 (10,0)
< Mittelwert 9 39 cm	15 (75 0)
> Mittelwert 9,30 cm	5 (25 0)
	5 (25,0)
niedria (IRS** < 2)	4 (20.0)
Heathy (IRS ≥ 2)	16 (80 0)
Mitosoindox (Mitoson/HDE***)	10 (00,0)
$\frac{1}{10000000000000000000000000000000000$	8 (10 0)
\geq Wittelwort 0.73	6 (30 0)
viniterwert 0,75	0 (30,0) 6 (30,0)
	0 (30,0)
Johond	9 (40 0)
	0 (40,0) 12 (60 0)
verstorden	T∠ (0U,U)

Tabelle 14. Merkmalsverteilung im Rezidivkollektiv*weitere Gruppierung in oberflächlich (Kopf, Extremitäten und Thorax) und tiefe (Abdomen und
Retroperitoneum) Tumore; **Immunreaktiver Score; ***high-power fields
Unter den Rezidivtumoren zeigten sich die Korrelationen ähnlich derer im Primärtumorkollektiv. Hinsichtlich des Subtyps und dem histopathologischen Grading wurde deutlich, dass auch bei den Rezidiven besonders das WDLPS ausschließlich als G1 Tumor eingestuft wurde, während nahezu alle Proben der MLPS, DDLPS und PLS den high-grade Sarkomen zugeordnet wurden (p = 0,046; CC = 0,645; Cramers V = 0,597). Weiterhin zeigte sich eine Tendenz zwischen dem Subtyp und der Survivin Expression. Hier fielen besonders die MLPS und DDLPS durch eine erhöhte Survivin Expression auf. Aufgrund der kleinen Kollektivgröße wurde bei einigen Korrelationen eine statistische Signifikanz verpasst.

Im Rahmen der Überlebensanalysen konnte der T-Status (p = 0,02; HR = 7,958 [2,079 – 30,465] sowie die Tumorgröße (p = 0,007; HR = 5,895 [1,636 – 21,246] als Faktor für das Outcome der Rezidivgruppe ermittelt werden. Weitere Korrelationen waren nicht signifikant.

3.2 Liposarkom im Zellkulturmodell

Zur Analyse der molekularen Strukturen und Interaktionen im LPS nutzten wir drei Zellkulturlinien. Es handelte sich um zwei DDLPS- und eine PLS-Zelllinie. In einem weiteren Schritt wurde die Wirksamkeit von YM155 untersucht. Anschließend führten wir ein *drug-screen* durch bei dem gängige Chemotherapeutika sowie *Compounds* der Apoptosekaskade zum Einsatz kamen.

3.2.1 Survivinexpression

Die Survivinexpression im Zellkulturmodell wurde mittels WB- und qPCR-Analysen bestimmt. Die Zelllinien Lipo DUE1, Lipo246A und PLS-1 wurden hierzu unter den oben beschriebenen Bedingungen kultiviert. Die Bestimmung der RNA-Expression erfolgte als relative Veränderung der Genexpression in Bezug auf Referenz und *house-keeping* Kontrolle mit GAPDH ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

Die höchste RNA-Konzentration von Survivin zeigte die Lipo DUE1 Zelllinie mit einem Mittelwert (MW) von 5,86 und einer Standartabweichung (SD) von +/- 2,47. Bei der Zelllinie Lipo 246A zeigten sich deutlich geringere Expressionswerte (MW = 0,73; SD = 0,32).





Links dargestellt sind Ergebnisse der qPCR der drei Liposarkom Zelllinien. Die Berechnung erfolgte nach Livak et al. Das Diagramm zeigt die relativen Veränderungen der Genexpression (2^{-ΔΔCT}) im Bezug zur Referenz und *house-keeping* Kontrolle mit GAPDH. Rechts ist ein repräsentatives Beispiel der Western-Blot Ergebnisse dargestellt. *p < 0,05; **Survivin

Die PLS Zellen zeigten einen MW von 2,63 bei einer SD von +/- 1,22 (Abb. 13). Zur Signifikanzkontrolle der Survivinexpression zwischen den Zelllinien wurden der Kruskal-Wallis Test und der Dunn's multipler comparison Test durchgeführt. Im Kruskal-Wallis Test zeigte sich eine statistische Signifikanz der Mittelwerte (p < 0,0001). Im Rahmen des Dunn's multiple comparison Test konnte diese Signifikanz in einem Unterschied zwischen Lipo DUE1 und Lipo 246A (p < 0,05) bestätigt werden.

Die Proteinexpression wurde mithilfe des Nass-blotting Verfahrens gemessen. Anschließend wurde zu Darstellung ein repräsentatives Beispiel von drei Messungen gewählt (Abb. 13). Es ließ sich eine schwache Survivin Expression in der Lipo DUE1 Zelllinie erkennen. Im Vergleich dazu ließ sich eine stärkere Survivin Expression bei den Lipo 246A Zellen nachweisen. Die stärkste Expression zeigte die pleomorphe Zelllinie. Alle WB-Versuche wurden mit GAPDH auf gleichmäßige Proteinverteilung kontrolliert (oberer Blot).

3.2.2 Wirkung von YM155 auf das Liposarkom

Zur Untersuchung der Wirkung von YM155 auf das Liposarkom wurden Protein- sowie FACS-Analysen durchgeführt. Die Zellviabilität wurde mithilfe des CellTiter 96®-Assay von Promega gemessen. Zuvor wurden die Zellen mit YM155 in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt.

Die Proteinanalysen erfolgten nach 12 Stunden Inkubation mit YM155 in den Konzentrationen 30, 100, 300 und 1000 nM. Zusätzlich wurden DMSO Kontrollen mit gleicher Konzentration angesetzt. Die Ladungskontrolle mit GADPH zeigte unter diesen Bedingungen keine Expressionsschwankungen.



Abb. 14: Wirkung von YM155 im Western-Blot und MTS-Assay

a) Western Blot Ergebnisse der Survivin Expression von drei Liposarkom Zelllinien nach 12 Stunden Inkubation mit YM155 sowie DMSO Kontrollen und GAPDH Ladungskontrollen. *Survivin b) MTS-Assay Ergebnisse nach 96 Stunden Inkubation mit YM155. Berechnung in Bezug auf DMSO Kontrollen sowie Angabe der IC50 Werte in μ M.

Die Lipo DUE1-Linie zeigte bei diesen Konzentrationen und der Inkubationszeit von 12 Stunden keinen Effekt auf die Survivin Proteinmenge (Abb. 14 a). Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch bei der dedifferenzierten Lipo 246A-Linie. Bei der pleomorphen PLS-1-Linie zeigte sich eine Reduktion der Survivin Expression bei 1000 nM.

Abb. 14 b stellt die MTS Assay Analysen nach 96 Stunden Inkubation mit YM155 dar. Bei allen drei Zelllinien zeigte sich unabhängig vom Lösungsmittel DMSO eine Abnahme der Zellviabilität bei steigender YM155 Konzentration. Bei den Lipo DUE1 Zellen lag die IC50 (mittlere inhibitorische Konzentration) bei 0,1481 μM. Unter 0,1498 μM YM155 waren 50 % der Lipo 246A Zellen nicht mehr stoffwechselaktiv. Bei der PLS-1-Zelllinie betrug dieser Wert 0,0197 μM.

Für die FACS Analysen wurden die Zellen 48 Stunden mit YM155 behandelt und anschließend mit dem FITC Annex./Dead Cell Apoptose Kit von Thermo Fisher gefärbt und ausgewertet. Neben einer DMSO Kontrolle wurden hier die YM155-Konzentrationen 30, 100 und 300 nM verwendet. Die Gates wurden nach Kalibrierungsversuchen eingestellt und erfassen vornehmlich die apoptotische Zellpopulationen (pink, Abb. 15).

Lipo DUE1



Abb. 15: FACS Analysen nach Behandlung mit YM155 für 48 Stunden Darstellung repräsentativer FACS Analysen für die drei Liposarkom Zelllinien. Je eine DMSO Kontrolle (300 nM) sowie YM155 Behandlungen (30, 100 und 300 nM).

Bei der dedifferenzierten Lipo DUE1 Linie zeigte sich, dass DMSO und YM155 in einer Konzentration von 30 nM nur geringfügig Effekte auf die Zellpopulation haben. Bei 100 nM waren bereits 17,3 % der Zellpopulation apoptotisch (Tabelle 15). Wie in Abb. 15 dargestellt waren bei 300 nM YM155 circa die Hälfte der Lipo DUE1-Zellen (54,83 %) apoptotisch.

Bei der Lipo 246A Zelllinie ließen sich keine signifikanten Effekte von YM155 auf den apoptotischen Zelltod erkennen. Auch bei der Konzentration von 300 nM YM155 wiesen nur 2,43 % der Zellen apoptotische Zellveränderungen auf. Neben der statistischen Auswertung (Tabelle 15) zeigt auch die graphische Analyse, dass es nur geringfügige Veränderungen der vitalen Population gibt (Abb. 15).

Bei der pleomorphen Linie zeigten sich hingegen deutliche Effekte bereits bei 100 nM. Bei 300 nM waren über 80 % der Liposarkomzellen apoptotisch (Tabelle 15).

			y)	
	DMSO		YM155	
		30 nM	100 nM	300 nM
Lipo DUE1	6,4	4,87	17,30	54,83
(DDLPS)	(2,97)	(0,71)	(2,72)	(6,99)
Lipo 246A	0,93	1,13	1,07	2,43
(DDLPS)	(0,40)	(0,29)	(0,21)	(0,67)
PLS-1	2,57	5,73	65,65	89,97
(PLS)	(0,96)	(1,36)	(8,45)	(3,11)

Apoptotische Zellen in % Mittelwert (Standardabweichung)

 Tabelle 15. Auswertung FASC Analyse nach Behandlung mit YM55

Auswertung der FACS Analysen nach 48 Stunden Inkubation mit YM155 beziehungsweise DMSO. Gezeigt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung in %. Grundlage der Daten ist die Anzahl der apoptotischen Zellen bezogen auf die Gesamtanzahl der gewerteten Zellen aus 3 unabhängigen Versuchen.

Zur Prüfung auf statistische Signifikanz wurde zunächst der Kruskal-Wallis Test durchgeführt. Hier präsentierte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen bei der Lipo DUE1 Zelllinie (p = 0,0237). Bei der Lipo 246A Zelllinie konnte kein statistisch signifikanter Unterschied analysiert werden. Bei den Konzentrationen der PLS-1-Zelllinie konnte ein signifikanter Unterschied errechnet werden (p = 0,0156).

Weitere Analyse mittels Dunn's Test zeigten, dass die Unterschiede innerhalb der Zelllinie PLS-1 zwischen DMSO und YM155 300 nM signifikant waren (p < 0,05). Ebenfalls signifikant war der Unterschied zwischen YM155 30 nM und YM155 300 nM bei der dedifferenzierten Lipo DUE1-Zelllinie (Abb. 16).



Abb. 16: Apoptoserate nach Behandlung mit YM155 für 48 Stunden Graphische Darstellung der statistischen Auswertung (Tabelle 14). *Dunn´s Test p < 0,05

3.2.3 Wirkung Chemotherapeutika auf Liposarkom-Zelllinien

Zur Analyse der Chemosensitivität beziehungsweise Resistenz der Liposarkome wurden zunächst MTS- Versuche mit verschiedenen Compounds durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test und Dunns Test. Der Dunns Test diente Analyse Viabilitätsunterschiede der der zwischen den Konzentrationen. Im Anschluss wurden dann Kombinationen mit YM155 mittels Mann-Whitney-U Test analysiert um signifikante Unterschiede zwischen erwarteten und gemessenen Werten innerhalb einer Konzentration zu identifizieren. In Tabellenform dargestellt sind ausschließlich die signifikanten Ergebnisse zum p-Wert von 0,05 bzw. 0,01.

Doxorubicin:

Doxorubicin gehört zu den Anthracyclinen und wird als Zytostatikum bei soliden Tumoren wie dem Mammakarzinom oder Bronchialkarzinom eingesetzt. Auch beim Liposarkom kommt es als Chemotherapeutikum zum Einsatz (Tacar et al., 2013).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Doxorubicin die Zellviabilität nach 96-stündiger Inkubation reduziert und somit das Zellwachstum hemmt. Bei den DDLPS lagen die IC50 Werte bei 0,31 μ M für die Lipo DUE1 und bei 0,45 μ M für die Lipo 246A Zelllinie. Bei der pleomorphen Zelllinie wurde ein IC50 Wert von 0,41 μ M gemessen (Abb. 17).

Wie in Tabelle 16 dargestellt, zeigten alle drei Zelllinien im Dunns Test statistisch signifikante Unterschiede zwischen den aufgelisteten Konzentrationen bei ebenfalls signifikantem Kruskal-Wallis Test (Lipo DUE1 = p < 0.05; Lipo 246A = p < 0.001; PLS-1 = p < 0.001).

Lipo DUE1		Lipo 246A		PLS-1	
μM	Signifikanz	μM	Signifikanz	μM	Signifikanz
0,01 vs. 3	p < 0,05	0,03 vs. 3	p < 0,01	0,01 vs. 3	p < 0,01
0,01 vs. 10	p < 0,05	0,03 vs. 10	p < 0,05	0,01 vs. 10	p < 0,05
				0,03 vs. 3	p < 0,05

Tabelle 16. Signifikante Viabilitätsunterschiede zwischen den Doxorubicin Konzentrationen nach 96-stündiger Inkubation



Abb. 17: Zellviabilität nach 96 Stunden Inkubation mit Doxorubicin Zellaktivität nach 96 Stunden Behandlung mit Doxorubicin (10; 3; 1; 0,3; 0,1; 0,03; 0,01 μ M). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von je drei unabhängigen Versuchen. Der berechnete IC50-Wert ist in der linken Diagrammecke in μ M angegeben. Die Messwerte wurden in Bezug auf das Lösungsmittel ausgewertet.

Etoposid:

Etoposid ist ein Topoisomerase II Hemmer und wird als Chemotherapeutikum bei verschiedenen soliden Tumoren eingesetzt (Montecucco et al., 2015).

Die Analyse der Lipo DUE1-Zellen ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Konzentrationen (p < 0,005). Tabelle 17 stellt die Auswertung mittels Dunn Test dar. Die ebenfalls dedifferenzierte LPS-Zelllinie Lipo 246A zeigte eine signifikante Abnahme der Zellviabilität unter zunehmender Konzentration von Etoposid (p < 0,001). Die IC50 lag bei diesen Zellen bei 2,724 μ M. Auch bei den PLS-1 Zellen war eine Reaktion auf das Chemotherapeutikum erkennbar (p < 0,001). Die IC50 lag bei dieser Zelllinie bei 12,82 μ M (Abb. 18).

Lipo DUE1		Lipo 246A		PLS-1	
μM	Signifikanz	μM	Signifikanz	μM	Signifikanz
0 vs. 100	p < 0,05	0,1 vs. 100	p < 0,05	0 vs. 30	p < 0,05
0,1 vs. 100	p < 0,05	0,3 vs. 100	p < 0,01	0 vs. 100	p < 0,01
				0,3 vs. 100	p < 0,05

Tabelle 17. Signifikante Viabilitätsunterschiede zwischen den Etoposid Konzentrationen.



Abb. 18: Zellviabilität nach 96 Stunden Inkubation mit Etoposid. Zellaktivität nach 96 Stunden Behandlung mit Etoposid (100; 30; 10; 3; 1; 0,3; 0,1 μM) logarithmisch aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von je drei unabhängigen Versuchen. Die Messwerte wurden in Bezug auf das Lösungsmittel ausgewertet.

YM155 und Doxorubicin:

der Kombinationsversuche wurden die Zellen Im Rahmen mit YM155 (0,1 µM - 0,01 µM) und Doxorubicin (10 µM) behandelt und für 72 Stunden inkubiert. Die Auswertung der FP-Werte zeigte bei keiner der drei Zelllinien eine signifikante Sensibilisierung gegenüber den Einzelbehandlungen. Zwar gab es **FP-Werte** jedoch > 0.1 wurde eine statistische Signifikanz im Mann-Whitney-U Test verpasst (Abb.19).

YM155 und Etoposid:

In gleicher Weise erfolgte die Kombination von YM155 (0,1 μ M – 0,01 μ M) und dem Topoisomerase II Hemmer Etoposid (10 μ M). Auch hier erfolgte die Inkubation für 72 Stunden. Hier zeigten sich ebenfalls signifikante FP-Werte bei einzelnen Konzentrationen. Jedoch konnte bei diesen keine statistische Signifikanz erreicht werden (Abb. 20).



Abb. 19: Kombination Doxorubicin + YM155 Dargestellt sind die Ergebnisse der MTS Kombinationsversuche von 10 μM Doxorubicin und 0,1; 0,03; 0,01 μM YM155 nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden.





4. Diskussion

Das Liposarkom bildet den häufigsten Tumor unter den Weichteilsarkomen und tritt vermehrt um das sechzigste Lebensjahr auf. Die Prognose hängt unter anderem stark vom zugrundeliegenden Subtyp ab. So beträat die Gesamtmortalität beim DDLPS circa 28 %. Beim PLS wird diese mit circa 40 - 50 % beschrieben (Gebhard et al., 2002, Henricks et al., 1997). Im Vergleich dazu zeigt das WDLPS, abhängig von der primären Lokalisation des Tumors, eine bessere Prognose mit einem 5 Jahres Überleben (5J-ÜL) von 77 - 86 % (Smith et al., 2012). Den therapeutischen Goldstandard für das lokal begrenzte LPS stellt die chirurgische Entfernung mit tumorfreien Schnitträndern (R0 Resektion) dar. In fortgeschrittenen Stadien werden chemotherapeutische und radiotherapeutische Ansätze alleine oder ergänzend zur onkologischen Resektion gewählt (Lee et al., 2018).

Trotz der therapeutischen Möglichkeiten kommt es beim Liposarkom häufig zu Rezidiven und zur Fernmetastasierung, was die Prognose negativ beeinflusst.

Vor allem die chemoresistenten DDLPS und PLS bilden hier eine besondere Gruppe mit aktuell begrenzten Therapiemöglichkeiten. Grund dafür ist unter anderem, dass die molekularen und genetischen Besonderheiten dieser Subtypen bisher nicht hinreichend erforscht und verstanden sind. Weiterhin ist das infiltrative Wachstumsverhalten der LPS Teil der aktuellen chirurgischen Forschung mit dem Ziel betroffene Organe und Stützgewebe im Schnellschnitt zu erkennen und dann eine R0 Resektion zu erzielen (Lu et al., 2018). Dies könnte langfristig in Kombination mit adjuvanten und/ oder neo-adjuvante Therapieansätzen die Rezidivrate der LPS senken.

Derzeit sind alternative Therapieansätze Teil von Studien, um die besonderen molekularen Mechanismen des Tumors zu verstehen und als Zielstruktur nutzen zu können (Lee et al., 2018).

Einer dieser potentiellen Therapieansätze bildet die Familie der IAPs. Eine Gruppe von Proteinen, die seit ihrer Entdeckung 1993 in verschiedenen Tumoren untersucht wurden (Crook et al., 1993). Zu den bekanntesten Vertretern zählen XIAP, cIAP-1, cIAP-2 und Survivin, die alle als regulatorische Proteine in die Apoptosekaskade eingreifen. Neben dem therapeutischen Ansatz stehen IAPs auch im Fokus von Prognoseanalysen. Hier konnte Survivin bereits als unabhängiger prognostischer Marker bei Patienten mit gynäkologischen Tumoren wie dem Mammakarzinom ermittelt werden (Span et al., 2004, Braný et al., 2017). Ebenso zeigte sich XIAP als potentieller Prognosefaktor unter anderem beim Oesophaguskarzinom oder Nierenkarzinom (Ramp et al., 2004, Dizdar et al., 2018).

Beim therapeutischen Ansatz geht es darum Survivin pharmakologisch zu supprimieren und somit unter anderem die Chemoresistenz der Tumore zu durchbrechen. YM155 ist eines der potentiellen *Compounds*, welches unter anderem die Survivin Expression unterdrückt und so die Apoptose-Blockade durch Survivin verhindern kann. YM155 hat sich bereits in verschiedenen Tumoren als wirksames Mittel zur Kontrolle der Chemoresistenz bewiesen (Koike et al., 2014, Nitta et al., 2017).

Somit gilt es die Survivin Expression auch im LPS detailliert zu analysieren und anschließend die Effektivität von YM155 in den verschiedenen Subtypen zu untersuchen. Dies könnte neue therapeutische Optionen erschließen, welche die Prognose von Liposarkomen in Zukunft verbessert.

4.1 Korrelationen und Prognosefaktoren beim Liposarkom

Zur Analyse von Prognosefaktoren im Liposarkom liegen bereits verschiedene Studien vor, die unter anderem den Subtyp, die Lokalisation, tumorfreie Resektionsränder und das Grading als unabhängige Prognosefaktoren identifiziert haben (Dalal et al., 2006, Knebel et al., 2017). Eine Analyse von Survivin als möglichen prädiktiven Faktor beim LPS gibt es nach unserem Kenntnisstand aktuell nicht.

Zur Analyse von potentiellen Prognosefaktoren untersuchten wir 69 Primärtumorproben mittels TMA und immunhistochemischer Färbung von Survivin. Des Weiteren haben wir Korrelationen zwischen Survivin und klinischpathologischen Parameter analysiert.

Die Verteilung der histopathologischen und klinischen Parameter des Kollektivs zeigte sich repräsentativ in Bezug auf vorhandene Analysen in der Literatur. Durch die Erfassung der Survivin Expression mit Hilfe des IRS und der anschließenden Korrelation mit klinischen Parametern sollten neue prädiktive Faktoren gefunden werden. Weiterhin sollten die bereits bekannten Prognosefaktoren in unserem Kollektiv untersucht werden.

4.1.1 Korrelationen zwischen klinischen Parametern

Bei der Analyse der gewählten Parameter mittels Chi²-Test zeigte sich, dass die Lokalisation ein wichtiger klinischer Marker ist. So besteht eine Korrelation zwischen der Lokalisation und dem Subtyp. Besonders die DDLPS kommen in der Mehrzahl der Fälle in den tiefen Lokalisationen vor. Ebenso zeigte die Mehrzahl der tiefen Tumore einen höheren G-Status als die oberflächlichen LPS.

Dass das Grading mit der Tumorgröße assoziiert ist, führen wir wiederum auf die späte Diagnose der tieferen Tumoren zurück. Diese tiefen und demnach großen Tumore sind häufig dem dedifferenzierten Subtyp zuzuordnen, welche insgesamt mit einem höheren Grading assoziiert sind.

Zusammengefasst zeigen diese Daten den Bedarf an einer verbesserten Diagnostik und Früherkennung von tiefen Liposarkomen. Da besonders diese Subgruppe direkt oder indirekt mit negativen prognostischen Faktoren wie hohem Grading, zunehmender Tumorgröße oder ungünstigerem Subtyp assoziiert ist, würde eine Früherkennung das Outcome verbessern. Zusätzlich zeigt es den Bedarf an neuen Therapieansätzen für die tiefen und oft dedifferenzierten LPS.

4.1.2 Potentielle Prognosefaktoren beim LPS

Derzeit sind verschiedene klinische Parameter als unabhängige Prognosefaktoren im LPS bekannt. Zur Analyse von potentiellen prädiktiven Faktoren innerhalb unseres Kollektivs führten wir univariate Analysen mittels Kaplan-Meier Kurven und dem log rank Test durch.

Die Analysen zeigten die Lokalisation, den Subtyp, das Grading, die Tumorgröße sowie die Survivin Expression als auch den Mitoseindex als potentiellen prognostischen Faktor beim primären LPS. Die Survivin Expression und der Mitoseindex ausgenommen, liegen bereits mehrere Studien vor, die diese Assoziationen zwischen den genannten Parametern und dem Outcome bestätigen (Knebel et al., 2017). Die Korrelation zwischen Survivin Expression und dem Outcome wurde nach unserem Wissensstand im LPS bisher nicht analysiert. Auf diesen Aspekt wird im nächsten Kapitel gesondert eingegangen.

Betrachtet man die Lokalisation als prognostischen Faktor, so lag das 5J-ÜL für die Patienten mit tiefen Tumoren (51,35 %) deutlich unter dem derer mit oberflächlichen Lokalisationen (74,19 %). Dies lässt sich durch die späten Symptome und die damit verbundene verzögerte Diagnose erklären. Zusätzlich treten die DDLPS, die generell mit einem schlechteren Outcome assoziiert sind, in 93 % der Fälle in den tiefen Lokalisationen auf, was die geringere 5J-ÜL für die tiefen Tumore zusätzlich bedingt. Weiterhin liegt die Vermutung nahe, dass bei den tiefen Lokalisationen und der damit verbundenen verzögerten Diagnose und Therapie, die Größe der Tumore das Outcome zusätzlich negativ beeinflusst. Eine entscheidende Rolle spielt dabei vermutlich auch die Organinfiltration mit zunehmender Tumorgröße. In unserem Kollektiv konnten wir die Annahme, dass die Lokalisation die Tumorgröße beeinflusst, statistisch nicht hinreichend bestätigen. Dennoch zeigten etwa 65 % der Tumore mit einer Größe > 12,85 cm eine tiefe Lokalisation. So stellt die Lokalisation einen entscheidenden Prognosefaktor beim LPS dar.

Dass der Subtyp bei LPS eine zentrale Rolle für Prognose und Therapie spielt ist bereits bekannt. Die individuelle Betrachtung der Subtypen mit allen Besonderheiten stand auch bei unseren Analysen im Fokus. So konnten wir beispielsweise die unterschiedlichen 5J-ÜL Werte der Literatur annähernd bestätigen.

Das deutlich schlechtere Outcome der DDLPS und PLS hängt vor allem mit der hohen Rate an Metastasen (circa 30% der Fälle) und der Rezidivneigung (circa 40% der Fälle) zusammen. Das bessere Outcome der MLPS, die ebenfalls eine Rezidiv- und Metastasenrate von ca. 40 % aufzeigen, erklärt sich am ehesten durch die deutlich bessere Chemo- und Radiosensitivität der myxoiden Zellen. Die hohe 5J-ÜL Rate der WDLPS lässt sich durch die geringe Rezidivrate und die fehlende Metastasierung erklären (Lee et al., 2018).

Ebenfalls entscheidend für die Prognose des LPS ist die Analyse der Chemosensitivität der unterschiedlichen Subtypen. Die Literatur beschreibt die DDLPS und PLS als chemoresitent beziehungsweise sehr individuell chemosensibel (Italiano et al., 2012a, Jones et al., 2005). Im Rahmen unserer Zellkulturversuche zeigte sich bei den DDLPS sowie bei der PLS Zelllinie eine gute Chemosensitivität gegenüber gängiger Chemotherapeutika. Auch gegenüber YM155 zeigten sich deutliche Effekte auf die Zellaktivität und Apoptoserate.

Das histopathologische Grading korrelierte in unserem Kollektiv ebenfalls signifikant mit dem Subtyp. Die WDLPS wurden in der Mehrzahl der Fälle (91,7 %) als G1 Tumore klassifiziert, während 83,3 % der PLS als G3 und 92,8 % der DDLPS als G2 oder G3 eingestuft worden sind. Somit spielt das Grading eine entscheidende Rolle bei der Prognose der einzelnen Subtypen.

Zusätzlich konnten wir zeigen, dass das Grading unabhängig vom zugrundeliegenden Subtyp ein prädiktiver Faktor beim LPS ist. So beträgt die 5J-ÜL Rate bei G1 Tumoren circa 83 %, bei G2 Tumoren 42,1 % und bei G3 klassifizierten Tumoren noch 37,5 %.

Unabhängig von der Lokalisation zeigte sich die Größe des Tumors als wichtiger Prognosefaktor beim LPS. Im untersuchten Kollektiv wurde eine Gruppierung zum Mittelwert von 12,85 cm gewählt. Wir konnten die Tumorgröße als signifikanten Prognosefaktor bestätigen. Das 5J-ÜL betrug 75,86 % für Patienten mit Tumoren ≤ 12,85 cm, während solche mit Tumoren > 12,85 cm ein 5J-ÜL von 50% aufwiesen. Hingegen zeigten publizierte Untersuchungen unter Festlegung eines *cut-off* von 5 cm für die Tumorgröße diesen als prognostischen Marker im LPS (Knebel et al., 2017). Bei einer Analyse unseres Kollektivs zu diesem cut-off von 5 cm konnten wir jedoch diese Signifikanz weder im Gesamtkollektiv noch in der differenzierten Subtypenanalyse bestätigen.

In den univariaten Analysen zeigte sich der Mitoseindex als prognostischer Einflussfaktor für das Gesamtüberleben. Die Anzahl der Mitosen korreliert mit der Proliferationsgeschwindigkeit und gilt so als ein Maß für die Aggressivität eines Tumors. Das 5J-ÜL für LPS mit einem niedrigen Mitoseindex betrug ca. 72 %, wohingegen LPS mit einer hohen Mitoserate ein Gesamtüberleben von 36,4 % nach 5 Jahren aufwiesen. Auch hier bestand ein Zusammenhang mit den Subtypen. Besonders die PLS zeigten einen hohen Mitoseindex, welcher ein weiterer Faktor für die schlechte Prognose durch aggressives Wachstum darstellt. Es bleibt zu klären ob der Mitoseindex bei den PLS als Prognosefaktor und Marker für Therapieoptionen geeignet ist.

Die abschließende multivariate Analyse der eingebundenen Faktoren zeigte den Subtyp als unabhängigen prognostischen Marker im LPS. Auch die Tumorgröße zum *cut-off* 12,85 cm konnte als unabhängiger Prognosefaktor identifiziert werden.

Die geschilderten Ergebnisse unterstreichen den Bedarf an einer individuellen Betrachtung der LPS-Subtypen bei der Therapie und Prognose. Ebenso wichtig ist eine frühzeitige Diagnose, um die Therapie bei einer möglichst geringen Tumorgröße beginnen zu können. Beide Aspekte könnten zukünftig das Outcome der LPS-Patienten verbessern.

Neben den therapeutischen Fortschritten rücken Prognosefaktoren zunehmend in den Fokus von Studien. Diese sollen die Lebenserwartung der Patienten individuell und möglichst genau einschätzen können. Die Genauigkeit einer Prognoseeinschätzung ist für die verbleibende Zeit der Betroffenen lebensverändernd und sollte so zuverlässig wie möglich sein. Ein wichtiges Instrument zur Einschätzung der Prognose sind klinisch gesicherte Marker, die in großen Kollektiven statistisch analysiert worden sind. Auch zur Erfolgseinschätzung einer speziellen Therapie können Prognosefaktoren herangezogen werden und so die Behandlung individueller und zielgerichtet gestaltet werden. So stellt diese Arbeit ein Kollektiv vor welches in Zukunft im Rahmen von Metaanalysen zum Liposarkom eingeschlossen werden kann.

4.2 Survivin im Liposarkom

Survivin ist der molekular kleinste Vertreter der IAP-Familie. Seit seiner Entdeckung 1997 durch G. Ambrosini ist Survivin fester Bestandteil von Projekten zur Grundlagenforschung und Studien der Tumorgenese (Ambrosini et al., 1997). Auf der einen Seite greift es als regulatorisches Protein in den Apoptoseweg ein, auf der anderen Seite spielt es bei der Zellteilung eine modulatorische Rolle und induziert die Metastasierung (Chu et al., 2011, Garg et al., 2016). Neben der eingangs beschriebenen prognostischen Wertigkeit von Survivin in anderen Tumorentitäten steht Survivin selbst als therapeutisches Zielprotein im Zentrum von experimentellen Forschungsprojekten.

Park et al. konnten zeigen, dass die Hemmung von Survivin die Chemosensitivität von Leukämiezellen steigert und dadurch die Rezidivrate gesenkt wird (Park et al., 2011). Carrasco et al. zeigten, dass die Survivin Expression mithilfe der Substanz LY2181308 im Maus-Modell gehemmt wird und so die Ansprechrate auf Chemotherapeutika gesteigert werden kann. Zusätzlich kam es unter LY2181308 zur Hemmung des Tumorwachstums (Carrasco et al., 2011). Neben diesen Effekten konnte auch gezeigt werden, dass es unter YM155 zur Survivin Suppression und dadurch unter anderem zur geringeren Invasionsrate von Glioblastom Zellen kommt (Guo et al., 2015).

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei neuen *Compounds* zur Chemotherapie ist die Verträglichkeit der Substanzen. Hier konnte bereits bestätigt werden, dass YM155 eine akzeptable Verträglichkeit hat und potentiell in der Chemotherapie eingesetzt werden kann (Church and Talbot, 2012).

Im Rahmen unserer Primärtumoranalysen haben wir erstmals zeigen können, dass Survivin im direkten Vergleich zum Fettgewebe und zu Lipomen in allen primären LPS-Tumoren hochreguliert ist. Die Arbeit von de Graaff et al. zeigte im Zellkulturmodell sowie in einer Kohorten Analyse von 32 MLPS eine starke Expression von Survivin im MLPS. Diese Ergebnisse konnten wir bei unseren 18 MLPS ebenfalls beobachten (de Graaff et al., 2017). Allerdings konnten wir die beschriebene starke Survivin Expression in allen MLPS nicht bestätigen. So zeigten zwar 89 % unserer MLPS einen IRS > 2 aber auch 11% einen IRS \leq 2. Dies könnte auf die leicht abweichenden Parameter bei der Auswertung der Färbung zurückzuführen sein.

Die Auswertung der Rezidivtumore zeigte ebenfalls eine deutliche Überexpression von Survivin im Vergleich zum Fettgewebe oder Lipom.

Eine anschließende Analyse ergab, dass besonders die entdifferenzierten Subtypen mit einer erhöhten Survivin Expression einhergehen, wohingegen die WDLPS eher geringere IRS-Werte aufwiesen. Die Ergebnisse bestätigen nochmals die Notwendigkeit einer subtypen-spezifischen Forschung und Therapie für das LPS, sowie die weiteren molekulargenetischen Analysen der einzelnen Subtypen.

4.2.1 Survivinexpression als prognostischer Faktor beim Liposarkom

Dass Survivin sich als unabhängiger prognostischer Marker eignet, ist bereits in verschiedenen Tumorentitäten gezeigt worden (Salman et al., 2016, II Yu et al., 2016, Zhang et al., 2018). Eine Analyse bezüglich der prognostischen Wertigkeit von Survivin im Liposarkom liegt derzeit nicht vor und wurde durch unsere Arbeit erstmals untersucht.

Dazu nutzten wir 69 Tumorproben und werteten die Survivin Expression mit Hilfe des IRS nach Remmele aus. Die statische Analyse erfolgte mittels log-rank Test und Kaplan-Meier Überlebenskurven. Die multivariate Analyse wurde mit Hilfe der Cox-Regression durchgeführt.

Bei diesen Analysen konnten wir zeigen, dass ein IRS-Wert > 2, also eine hohe Survivin-Expression, mit einem kürzeren Gesamtüberleben einhergeht. So betrug das 5J-ÜL bei Patienten mit einem IRS \leq 2 circa 78,6 % während bei der Gruppe mit einem IRS > 2 das 5J-ÜL nur 43,8 % betrug. Innerhalb der Subgruppen zeigten sich Tendenzen die diese Korrelation ebenfalls bestätigen jedoch war eine statistische Analyse aufgrund der kleinen Subgruppenkollektive nicht möglich.

Im Rahmen der multivariaten Analysen zeigte sich die Survivin Expression nicht als unabhängiger prognostischer Marker (p = 0,370). Dies könnte an der geringen Fallgröße unseres Kollektives liegen aber auch durch die Assoziation von Survivin mit klinisch-pathologischen Variablen, wie z.B. dem Subtyp und der Tumorgröße, erklärbar sein, die in der multivariaten Analyse als unabhängige prognostische Parameter identifiziert werden konnten. Somit halten wir Survivin für einen möglichen prädiktiven Faktor, dessen Unabhängigkeit in größeren Kohorten noch untersucht werden muss.

4.2.2 Survivin als potentielles therapeutisches Ziel im Liposarkom

Neben der prognostischen Wertigkeit konnte sich Survivin bei einigen Tumorentitäten schon als potentielles Ziel in der Chemotherapie etablieren. Es zeigten sich Effekte bei der Überwindung von Chemoresistenzen sowie auch eine Reduzierung des Tumorwachstums (Cheung et al., 2010, Weiss et al., 2012). Neben diesen Erkenntnissen konnten verschiedene Studien auch einen Einfluss von Survivin auf die Radiosensitivität von Tumorgewebe nachweisen (Rhodes and Hillen, 2016, Hu et al., 2015).

Um eine potentiell therapeutische Wertigkeit von Survivin im Liposarkom zu prüfen, untersuchten wir zwei DDLPS- und eine PLS-Zelllinie. Neben der Grundexpression von Survivin bewerteten wir den Effekt von YM155 auf RNA- und Proteinebene. Zusätzlich analysierten wir die Wirkung von YM155 auf die Zellviabilität und die Apoptoserate. Diese Analysen stellen nach unserem Kenntnisstand die ersten Versuche zum Thema Survivin und YM155 im pleomorphen- und dedifferenzierten-LPS dar.

Die Analyse der Survivin RNA zeigte, dass zwischen den beiden DDLPS-Zelllinien signifikante Expressionsunterschiede bestehen. So konnten wir bei den Lipo-DUE1 Zellen eine deutlich gesteigerte Survivin Expression im Bezug zur Referenz-DNA feststellen, während die Lipo 246A eher geringere Mengen an Survivin RNA exprimierten.

Im Kontrast dazu zeigten beide DDLPS-Zelllinien in den WB-Analysen ein inverses Ergebnis. Die Lipo-DUE1 Zelllinie präsentierte sich mit der geringsten Survivin Proteinmenge im Vergleich zur Lipo 246A. Diese Diskrepanz zwischen RNA- und Proteinexpression könnten durch Modifikationen nach der Transkription beziehungsweise Translation erklärt werden. Die Unterschiede innerhalb des Subtyps der DDLPS zeigten sich auch bei unserem Primärtumorkollektiv. Hier variierten die ermittelten IRS Werte von starker Survivin Expression bis hin zur schwachen Expression (MW = 3,154, 1-6). Ähnliche Ergebnisse waren auch bei den Rezidivtumoren nachweisbar (MW = 4,200; 3- 6).

Die PLS-1 zeigte in der Real-Time-PCR wie auch im WB hohe Survivin Expressionswerte, was mit den Untersuchungen unseres Patientenkollektivs übereinstimmt. Hier lagen alle IRS-Werte der PLS Proben > 2 (MW = 4,4; 3,5 - 6). Die 4 auswertbaren pleomorphen Rezidivtumore präsentierten ebenfalls alle einen IRS > 2 (MW = 4; 3-6). Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse eine homogene Überexpression von Survivin im PLS. Aufgrund der kleinen Fallzahl von insgesamt 9 Proben sollten diese Ergebnisse noch in größeren Analysen zum PLS bestätigt werden.

Im Folgenden haben wir den Einfluss von YM155 auf Survivin im LPS erstmalig untersucht. Bei YM155 handelt es sich primär um einen Transkriptionshemmer der Survivin Expression. Der zugrunde liegende Mechanismus erklärt sich über eine Bindung von YM155 mit dem Transkriptionsfaktor Sp1, welches für die Survivin Expression essentiell ist (Cheng et al., 2012, Sachita et al., 2014).

Die Effektivität von YM155 in der Tumortherapie ist derzeit nicht hinreichend belegt. So liegen erste positive Ergebnisse bei Patienten mit einem Prostatakarzinom vor, wohingegen eine Studie mit NSCLC Patienten keinen Effekt von YM155 auf die Tumorzellen gezeigt hat (Tolcher et al., 2012, Kelly et al., 2013). Hou et al. konnten bei Patienten mit Ovarialkarzinom zeigen, dass YM155 über die Suppression der Survivin Expression in Kombination mit Docetaxel das Tumorwachstum hemmt. Auch kam es unter dieser Kombination zum Zellzyklusarrest und zur gesteigerten Apoptoserate in den Ovarialkarzinomzellen (Hou et al., 2018). Neben den von uns untersuchten DDLPS und PLS liegen bereits Untersuchungen beim MLPS vor. Hier stellte sich im Rahmen eines *drugscreens* YM155 als effektives *Compound* zur Wachstumshemmung der Tumorzellen beim MLPS heraus (de Graaff et al., 2017).

Zur Untersuchung der Wirksamkeit von YM155 auf dedifferenzierte und pleomorphe LPS-Zellen führten wir WB-Versuche, MTS-Assays und FACS-Analysen durch.

Bei den DDLPS-Zelllinien konnte keine signifikante Reduktion der Survivin Proteinmenge beobachtet werden. In den MTS Viabilitäts-Assays hingegen zeigten die DDLPS eine Reduzierung der Zellviabilität. In den FACS-Analysen beobachteten wir eine Zunahme der Apoptoserate mit steigender YM155 Konzentration bei den Lipo-DUE1 Zellen. Die Lipo 246A Zellen zeigten hingegen keine signifikante Zunahme der Apoptoserate. Hier sind weitere Analysen zur Identifikation von Faktoren notwendig, die die Abnahme der Zellviabilität durch YM155 ohne Zunahme der Apoptoserate erklären könnten. Bei der Lipo-DUE1 Zelllinie ist die Abnahme der Zellviabilität am ehesten über eine gesteigerte Apoptoserate erklärbar. Ob die Wirkung ausschließlich über eine Survivin Hemmung erfolgt bleibt zu Untersuchen und konnte in unseren WB-Analysen nicht eindeutig gezeigt werden.

Auch die Effektivität von YM155 könnte sich von Zelltyp zu Zelltyp unterscheiden, was die Ergebnisse von Studien in unterschiedlichen Tumorentitäten bereits vermuten lassen. Überdies ist zu berücksichtigen, dass bei geringer Survivin Expression die Wirksamkeit von YM155 möglicherweise eingeschränkt ist und somit nur zu geringen Effekten auf die Apoptoserate der Zellen führt. Weiterhin könnte der unterschiedliche Effekt von YM155 auf die Apoptoseinduktion ein Hinweis dafür sein, dass dieses Compound möglicherweise auch andere Proteine im Liposarkom inhibiert und somit unterschiedliche Signalwege beeinflusst .In diesem Zusammenhang zeigen verschiedene Arbeiten die Komplexität der Wirkung von YM155. So beschreiben Tao et al., dass über 85 Gene durch YM155 in Zellen eines Wilms Tumors beeinflusst werden. Es kam unter anderem zur hoch Regulation des TNF Gens, Caspase 7 und Caspase 9 Gens, welche in der Apoptoseinduktion eine wichtige Rolle spielen (Tao et al., 2012). Weiterhin ist unabhängig von Survivin eine gesteigerte Aktivität der Caspase 3 unter YM155 beschreiben. Diese führt über einen gesteigerten DNA Abbau in den Zellen zur Apoptose (Sachita et al., 2014). Somit ist auch beim Liposarkom eine Survivin unabhängige Apoptose induzierende Wirkung von YM155 denkbar. Dies vermuten wir beispielsweise auch in unseren Ergebnissen zum DDLPS wo es Survivin

unabhängig zur Abnahme der Zellviabilität unter YM155 gekommen ist. Hier sind weitere Gen und Proteinanalysen notwendig um die Wirkung von YM155 im Liposarkom zu präzisieren.

Bei der pleomorphen Linie PLS-1 zeigte sich im WB bereits eine signifikante Abnahme der Survivin Menge mit zunehmender YM155 Konzentration. Die Viabilitätsuntersuchungen konnten eine starke Abnahme der Zellviabilität nachweisen und die FACS-Analyse zeigte eine deutliche Zunahme der Apoptoserate auf circa 90 %.

Somit konnten wir erstmals die Wirkung von YM155 vor allem im PLS nachweisen. Es kommt unter YM155 (30 nM – 1000 nM) zur Abnahme der Survivin Proteinexpression, zur Reduzierung der Stoffwechselaktivität und zur gesteigerten Apoptoserate. Aufgrund dieser Ergebnisse könnte YM155 eine potentielle Ergänzung zur Therapie vor allem im PLS mit hoher Survivin Expression (IRS > 2) darstellen und sollte zunächst durch weitere Analysen auf Zellkulturebene untersucht werden. Besonders eine Survivin unabhängige Wirkung von YM155 auf PLS Zellen sollte in weiteren Versuchen ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend zeigte sich die bereits vermutete Individualität innerhalb und unterhalb der LPS-Subtypen. Insgesamt schätzen wir YM155 als potentiell wirksame Ergänzung der Therapie bei einigen LPS-Subgruppen ein. Es bedarf allerdings einer genauen Analyse der Subtypen und der Survivin Expression. Auch müssen weitere Mechanismen in der Apoptosekaskade identifiziert werden, die zum Beispiel die gesteigerte Apoptoserate ohne signifikante Abnahme der Survivin Expression unter YM155 erklären.

4.3 Chemosensitivität und Resistenz beim Dedifferenzierten und Pleomorphen Liposarkom

Aktuell ist bekannt, dass sich besonders die DDLPS durch ein schlechtes Ansprechen auf eine Chemo- oder Radiotherapie auszeichnen. Bei den PLS ist dagegen eine sehr variable Chemosensitivität nachgewiesen (Jones et al., 2005). Im Rahmen unserer Analysen untersuchten wir zwei DDLPS- und eine PLS-Zelllinie auf Chemosensitivität gegenüber gängigen Chemotherapeutika. Das Mittel der Wahl beim LPS sind Vertreter der Anthrazykline wie zum Beispiel das Doxorubicin, welches wir ebenfalls in unsere Analysen eingebunden haben.

4.3.1 Chemosensibilität gegenüber Anthracyclinen und Etoposid

Als Mittel der Wahl kommen derzeit Anthrazykline beim fortgeschrittenen LPS zum Einsatz. Neben Doxorubicin als Vertreter der Anthrazykline führten wir auch Versuche mit Etoposid durch. Hierbei handelt es sich um ein Topoisomerase II Hemmer, der vor allem bei soliden Tumoren zum Einsatz kommt.

Die MTS-Analysen zeigten bei allen drei Zelllinien eine signifikante Abnahme der Zellviabilität mit steigender Konzentration des *Compounds*. So konnten wir die in der Literatur beschriebene Chemoresistenz gegenüber Anthrazykline in unseren Zelllinien nicht reproduzieren (Italiano et al., 2012a, Italiano et al., 2012b). Auch hier vermuten wir die hohe Individualität der LPS-Zellen als mögliche Ursache. Die unterschiedlichen Ansprechraten der LPS Subtypen stehen seit Längerem im Fokus von Studien, um die subtypenspezifische Therapie zu verbessern (Jones et al., 2005).

4.3.2 Chemosensibilisierung durch Kombinationen von Compounds

Dass die Kombination von Chemotherapeutika die Ansprechrate verbessert, sowie die benötigte Dosis und die Nebenwirkungen verringert, ist seit Längerem bekannt. Besonders zur Überwindung von Chemoresistenzen kommen Kombinationsversuche zum Einsatz, um das Outcome der Patienten zu verbessern (Wang et al., 2016). Pink et al. beschreiben beispielsweise ein verbessertes Outcome bei Patienten mit Epitheloidsarkomen, die mit einer Kombination aus Gemcitabine und Docetaxel behandelt wurden (Pink et al., 2014). Unsere Kombinationsversuche zeigten keine additiven Effekte durch die Kombination von YM155 mit Doxorubicin beziehungsweise Etoposid. So blieb die erwartete Sensibilisierung durch eine Kombination aus. Eine mögliche Erklärung liegt in der Effektivität von Doxorubicin und Etoposid, welche bereits in den Einzelversuchen deutliche Wirkung auf die Zellen zeigten. So war das berechnete Erwartete-Überleben der Zellen bei der Kombination mit anderen Chemotherapeutika durch die bereits gering und wurde Gemessene-Überlebensrate nicht weiter unterschritten. Unabhängig davon zeigten sich bei einzelnen Konzentrationen Tendenzen die eine Sensibilisierung der Zellen durch die Kombination nahelegen. Beispielsweise lag der FP-Wert bei den PLS-1 Zellen bei der Konzentration 0,01 µM YM155 + 10 µM Doxorubicin bei FP= 0,42 dennoch ergab der Mann-Whitney-U Test einen p-Wert von 0,057, welcher in unseren Analysen als nicht signifikant gewertet wurde.

Dennoch ist eine Sensibilisierung durch die verwendeten Kombinationen nicht ausgeschlossen und sollte an Zellen mit primärer Resistenz gegenüber Doxorubicin, Etoposid sowie getestet werden. Ein weiterer Punkt wäre die Identifikation von spezifischen Konstellationen von Subtyp und molekularen Eigenschaften in Bezug auf Chemosensibilität. So beschreibt Dr. Siegmund-Schultze die Entwicklung zur Deeskalation von Therapiemaßnahmen in der Onkologie um negative und unnötige Behandlungen zu minimieren (Siegmund-Schultze, 2018). Die sollte auch bei der Analyse von neuen Therapeutika wie YM155 stets berücksichtig werden um unnötige Kombinationen mit Chemotherapeutika zu verhindern. Dies kann neben den Grundlagen der Zellkulturforschung beispielsweise im Rahmen kontrollierter Studien erfolgen.

4.4 Schlussfolgerung

Diese Arbeit beschreibt erstmals den Stellenwert von Survivin im LPS und bewertet die prognostischen und therapeutischen Eigenschaften von Survivin. Der Fokus dieser Analysen liegt auf dem dedifferenzierten und pleomorphen LPS, die im Rahmen der Zellkulturversuche untersucht wurden. Die erhöhte Survivin Expression in allen LPS-Subtypen wurde durch diese Arbeit erstmalig beschrieben. Weiterhin konnten der Subtyp sowie die Tumorgröße als unabhängige prognostische Faktoren im LPS identifiziert werden. Diese Ergebnisse werden stellenweise durch die bereits bestehende Literatur bestätigt aufgrund des repräsentativen LPS-Kollektivs für weitere und können Metaanalysen genutzt werden. Neben erfolgreichen Phase-II-Studien zur Wirkung von YM155 in anderen Tumorentitäten konnte erstmals die Wirkung von YM155 auf LPS-Zellen gezeigt werden. Besonders entscheidende Ergebnisse zeigten den mit YM155 behandelten pleomorphen Liposarkomzellen. sich bei Zusammenfassend bilden die pharmakologischen Untersuchungen dieser Arbeit neue potentielle Ansätze für die individualisierte Therapie des LPS. Weitere Grundlagenforschungen und Analysen in größeren Kohorten sind für den Transfer zum wirksamen Medikament unabdingbar. Besonders Survivin und dessen Splice-Varianten sollten in weiteren Kollektiven analysiert werden. Der Fokus dieser anschließenden Arbeiten sollte dabei auf einer subtypenspezifischen Analyse liegen. Zellkulturuntersuchungen mit den WDLPS und MLPS sind ergänzend zu dieser Arbeit notwendig. Unabhängig davon besteht auch weiterhin ein anhaltender Bedarf an der Untersuchung der genauen Wirkung und Zielstrukturen von YM155 im LPS.

In einem folgenden präklinischen Schritt wären Survivin *knock-down* Zelllinien eine sinnvolle Fortführung dieser Ergebnisse. Interessant wäre besonders die Untersuchung von resistenten LPS-Zelllinien im Survivin *knock-down* Modell, um eine durch Survivin vermittelte Chemoresistenz zu analysieren.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen von Survivin im LPS können in Zukunft als Grundlage für eine Survivin-spezifische pharmakologische Therapie dienen. So könnten speziell für die prognostisch ungünstigeren DDLPS und PLS weitere therapeutische Optionen geschaffen werden. Zusätzlich besteht durch Medikamentenkombination die Möglichkeit, Chemoresistenzen zu durchbrechen und Rezidivraten zu senken.

Ein weiterer Aspekt zukünftiger Analysen wäre es im Rahmen von prospektiven Studien sowie in Bezug auf Metaanalysen Faktoren zu identifizieren die eine Deeskalation der pharmakologischen Therapie ermöglichen beziehungsweise fordern.

Zusammenfassend bildet diese Arbeit einen weiteren Schritt zur individuellen und subtypenspezifischen Forschung beim LPS. Die Analyse von Prognose und Therapieansätzen auf spezielle molekulare Tumoreigenschaften rückt zunehmend in den Fokus der Tumorforschung. So orientiert sich diese Arbeit an dem Konzept der modernen Tumorforschung und greift die Entwicklungen der innovativen Krebstherapie auf.

VII. Literaturverzeichnis

- A.P. DEI TOS, F. P. 2002. Dedifferentiated liposarcoma. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone: World Health Organization (WHO), 38-39.
- AAS, T., BORRESEN, A. L., GEISLER, S., SMITH-SORENSEN, B., JOHNSEN, H., VARHAUG, J. E., AKSLEN, L. A. & LONNING, P. E. 1996. Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med*, 2, 811-4.
- ADRAIN, C., CREAGH, E. M. & MARTIN, S. J. 2003. Defying death: showing Bcl-2 the way home. *Nature Cell Biology*, 5, 9.
- AHMED, Z., SHAH, H. U., YAQOOB, N. & MUZAFFAR, S. 2004. Pleomorphic liposarcoma in a ten year old child. *J Pak Med Assoc*, 54, 533-4.
- AMBROSINI, G., ADIDA, C. & ALTIERI, D. C. 1997. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*, 3, 917-21.
- ANTONESCU, C., M. LADANYI 2002. Myxoid Liposarcoma. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone: World Health Organization (WHO), 40-43.
- ASHKENAZI, A. & DIXIT, V. M. 1998. Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science*, 281, 1305.
- BALDINI, E. H., WANG, D., HAAS, R. L., CATTON, C. N., INDELICATO, D. J., KIRSCH, D. G., ROBERGE, D., SALERNO, K., DEVILLE, C., GUADAGNOLO, B. A., O'SULLIVAN, B., PETERSEN, I. A., LE PECHOUX, C., ABRAMS, R. A. & DELANEY, T. F. 2015. Treatment Guidelines for Preoperative Radiation Therapy for Retroperitoneal Sarcoma: Preliminary Consensus of an International Expert Panel. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 92, 602-12.
- BARTKE, T., POHL, C., PYROWOLAKIS, G. & JENTSCH, S. 2004. Dual Role of BRUCE as an Antiapoptotic IAP and a Chimeric E2/E3 Ubiquitin Ligase. *Molecular Cell*, 14, 801-811.
- BEANE, J. D., YANG, J. C., WHITE, D., STEINBERG, S. M., ROSENBERG, S. A. & RUDLOFF, U. 2014. Efficacy of adjuvant radiation therapy in the treatment of soft tissue sarcoma of the extremity: 20-year follow-up of a randomized prospective trial. *Ann Surg Oncol*, 21, 2484-9.
- BERTRAND, M. J. M., DOIRON, K., LABBÉ, K., KORNELUK, R. G., BARKER, P. A. & SALEH, M. 2009. Cellular Inhibitors of Apoptosis cIAP1 and cIAP2 Are Required for Innate Immunity Signaling by the Pattern Recognition Receptors NOD1 and NOD2. *Immunity*, 30, 789-801.
- BIRNBAUM, M. J., CLEM, R. J. & MILLER, L. K. 1994. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *Journal of Virology*, 68, 2521-2528.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- BRANÝ, D., DVORSKÁ, D., SLÁVIK, P., ŠKOLKA, R. & ADAMKOV, M. 2017. Survivin and gynaecological tumours. *Pathology - Research and Practice*, 213, 295-300.
- BRUSTUGUN, O. T., FLADMARK, K. E., DOSKELAND, S. O., ORRENIUS, S. & ZHIVOTOVSKY, B. 1998. Apoptosis induced by microinjection of cytochrome c is caspase-dependent and is inhibited by Bcl-2. *Cell Death Differ*, 5, 660-8.

- BULLEN, T. F., FORREST, S., CAMPBELL, F., DODSON, A. R., HERSHMAN, M. J., PRITCHARD, D. M., TURNER, J. R., MONTROSE, M. H. & WATSON, A. J. M. 2006. Characterization of epithelial cell shedding from human small intestine. *Laboratory Investigation*, 86, 1052.
- BYUN, S. S., YEO, W. G., LEE, S. E. & LEE, E. 2007. Expression of survivin in renal cell carcinomas: association with pathologic features and clinical outcome. *Urology*, 69, 34-7.
- C. D.M. FLETCHER, K. K. U., FREDRIK MERTENS 2002. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. *World Health Organization (WHO)*, 35-46.
- C.D.M. FLETCHER, A. R., S. SINGER, M. SUNDARAM, J.M. COINDRE 2002. Soft tissue tumours: Epidemiology, clinical features, histopathological typing and grading. *Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone: World Health Organization (WHO)*, 12-18.
- CARMENA, M., WHEELOCK, M., FUNABIKI, H. & EARNSHAW, W. C. 2012. The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, 789.
- CARRASCO, R. A., STAMM, N. B., MARCUSSON, E., SANDUSKY, G., IVERSEN, P. & PATEL, B. K. 2011. Antisense inhibition of survivin expression as a cancer therapeutic. *Mol Cancer Ther*, 10, 221-32.
- CAYMAN-CHEMICAL 2015. YM-155, Item No. 11490. Product information: https://www.caymanchem.com/pdfs/11490.pdf.
- CHENG, Q., LING, X., HALLER, A., NAKAHARA, T., YAMANAKA, K., KITA, A., KOUTOKU, H., TAKEUCHI, M., BRATTAIN, M. G. & LI DR, F. 2012. Suppression of survivin promoter activity by YM155 involves disruption of Sp1-DNA interaction in the survivin core promoter. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3, 179-197.
- CHEUNG, C. H. A., SUN, X., KANWAR, J. R., BAI, J.-Z., CHENG, L. & KRISSANSEN, G. W. 2010. A cell-permeable dominant-negative survivin protein induces apoptosis and sensitizes prostate cancer cells to TNF-α therapy. *Cancer Cell International*, 10, 36-36.
- CHU, X.-Y., CHEN, L.-B., WANG, J.-H., SU, Q.-S., YANG, J.-R., LIN, Y., XUE, L.-J., LIU, X.-B. & MO, X.-B. 2011. Overexpression of survivin is correlated with increased invasion and metastasis of colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 105, 520-528.
- CHURCH, D. N. & TALBOT, D. C. 2012. Survivin in Solid Tumors: Rationale for Development of Inhibitors. *Current Oncology Reports*, 14, 120-128.
- COINDRE, J. M., TROJANI, M., CONTESSO, G., DAVID, M., ROUESSE, J., BUI, N. B., BODAERT, A., MASCAREL, I. D., MASCAREL, A. D. & GOUSSOT, J. F. 1986. Reproducibility of a histopathologic grading system for adult soft tissue sarcoma. *Cancer*, 58, 306-309.
- CORVINO A, R. G., SENSINI M, GARZARO M, PECORARI G. 2016. Liposarcomas of the hypopharynx: a systematic review of the literature. *Journal of Health and Social Sciences*, 1 (1), 57-66.
- CRAGO, A. M. & SINGER, S. 2011. Clinical and molecular approaches to well differentiated and dedifferentiated liposarcoma. *Curr Opin Oncol*, 23, 373-8.
- CROOK, N. E., CLEM, R. J. & MILLER, L. K. 1993. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol*, 67, 2168-74.
- DALAL, K. M., ANTONESCU, C. R. & SINGER, S. 2008. Diagnosis and management of lipomatous tumors. *Journal of Surgical Oncology*, 97, 298-313.

- DALAL, K. M., KATTAN, M. W., ANTONESCU, C. R., BRENNAN, M. F. & SINGER, S. 2006. Subtype specific prognostic nomogram for patients with primary liposarcoma of the retroperitoneum, extremity, or trunk. *Ann Surg*, 244, 381-91.
- DAVOODI, J., LIN, L., KELLY, J., LISTON, P. & MACKENZIE, A. E. 2004. Neuronal apoptosis-inhibitory protein does not interact with Smac and requires ATP to bind caspase-9. *J Biol Chem*, 279, 40622-8.
- DE GRAAFF, M. A., MALU, S., GUARDIOLA, I., KRUISSELBRINK, A. B., DE JONG, Y., CORVER, W. E., GELDERBLOM, H., HWU, P., NIELSEN, T. O., LAZAR, A. J., SOMAIAH, N. & BOVEE, J. 2017. High-Throughput Screening of Myxoid Liposarcoma Cell Lines: Survivin Is Essential for Tumor Growth. *Transl Oncol*, 10, 546-554.
- DEBRA T. CHAOK & KORSMEYER, S. J. 1998. BCL-2 FAMILY: Regulators of Cell Death. *Annual Review of Immunology*, 16, 395-419.
- DEMETRI, G. D., VON MEHREN, M., JONES, R. L., HENSLEY, M. L., SCHUETZE, S. M., STADDON, A., MILHEM, M., ELIAS, A., GANJOO, K., TAWBI, H., VAN TINE, B. A., SPIRA, A., DEAN, A., KHOKHAR, N. Z., PARK, Y. C., KNOBLAUCH, R. E., PAREKH, T. V., MAKI, R. G. & PATEL, S. R. 2016. Efficacy and Safety of Trabectedin or Dacarbazine for Metastatic Liposarcoma or Leiomyosarcoma After Failure of Conventional Chemotherapy: Results of a Phase III Randomized Multicenter Clinical Trial. J Clin Oncol, 34, 786-93.
- DESHAIES, R. J. & JOAZEIRO, C. A. 2009. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem*, 78, 399-434.
- DEVERAUX, Q. L., TAKAHASHI, R., SALVESEN, G. S. & REED, J. C. 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, 388, 300-4.
- DI GIANDOMENICO, S., FRAPOLLI, R., BELLO, E., UBOLDI, S., LICANDRO, S. A., MARCHINI, S., BELTRAME, L., BRICH, S., MAURO, V., TAMBORINI, E., PILOTTI, S., CASALI, P. G., GROSSO, F., SANFILIPPO, R., GRONCHI, A., MANTOVANI, R., GATTA, R., GALMARINI, C. M., SOUSA-FARO, J. M. F. & D'INCALCI, M. 2013. Mode of action of trabectedin in myxoid liposarcomas. Oncogene, 33, 5201.
- DICKSON, M. A., SCHWARTZ, G. K., KEOHAN, M. L., D'ANGELO, S. P., GOUNDER, M. M., CHI, P., ANTONESCU, C. R., LANDA, J., QIN, L. X., CRAGO, A. M., SINGER, S., KOFF, A. & TAP, W. D. 2016. Progression-Free Survival Among Patients With Well-Differentiated or Dedifferentiated Liposarcoma Treated With CDK4 Inhibitor Palbociclib: A Phase 2 Clinical Trial. JAMA Oncol, 2, 937-40.
- DIZDAR, L., JÜNEMANN, L. M., WERNER, T. A., VERDE, P. E., BALDUS, S. E., STOECKLEIN, N. H., KNOEFEL, W. T. & KRIEG, A. 2018. Clinicopathological and functional implications of the inhibitor of apoptosis proteins survivin and XIAP in esophageal cancer. *Oncology Letters*, 15, 3779-3789.
- DOHI, T., BELTRAMI, E., WALL, N. R., PLESCIA, J. & ALTIERI, D. C. 2004. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 114, 1117-1127.
- DU, C., FANG, M., LI, Y., LI, L. & WANG, X. 2000. Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c–Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition. *Cell*, 102, 33-42.
- DUBREZ, L., BERTHELET, J. & GLORIAN, V. 2013. IAP proteins as targets for drug development in oncology. *Onco Targets Ther*, 9, 1285-304.

- DWORAK, D. P., PATEL, S. A., CHENNURI, R. & FALCO, D. 2018. Primary Atypical Lipomatous Tumor of the Orbit: A Case Report. *Journal of Ophthalmic & Vision Research*, 13, 78-80.
- DYBDAL-HARGREAVES, N. F., RISINGER, A. L. & MOOBERRY, S. L. 2015. Eribulin Mesylate: Mechanism of Action of a Unique Microtubule Targeting Agent. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 21, 2445-2452.
- ELMORE, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic* pathology, 35, 495-516.
- FAIRWEATHER, M., WANG, J., JO, V. Y., BALDINI, E. H., BERTAGNOLLI, M. M. & RAUT, C. P. 2018. Surgical Management of Primary Retroperitoneal Sarcomas: Rationale for Selective Organ Resection. *Annals of Surgical Oncology*, 25, 98-106.
- FISCHER, U., JANICKE, R. U. & SCHULZE-OSTHOFF, K. 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*, 10, 76-100.
- FLETCHER, C. D. M., BRIDGE, J. A., HOGENDOORN, P. & MERTENS, F. 2013. WHO Classification of Tumours. 5.
- FLETCHER, C. D. M., UNNI, K. K. & MERTENS, F. 2002. Adipocytic tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone: World Health Organization (WHO), 35-46.
- FLUSBERG, D. A. & SORGER, P. K. 2015. Surviving apoptosis: life-death signaling in single cells. *Trends Cell Biol*, 25, 446-58.
- GARG, H., SURI, P., GUPTA, J. C., TALWAR, G. P. & DUBEY, S. 2016. Survivin: a unique target for tumor therapy. *Cancer Cell Int*, 16, 49.
- GARRIDO, C., GALLUZZI, L., BRUNET, M., PUIG, P. E., DIDELOT, C. & KROEMER, G. 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*, 13, 1423-33.
- GEBHARD, S., COINDRE, J. M., MICHELS, J. J., TERRIER, P., BERTRAND, G., TRASSARD, M., TAYLOR, S., CHATEAU, M. C., MARQUES, B., PICOT, V. & GUILLOU, L. 2002. Pleomorphic liposarcoma: clinicopathologic, immunohistochemical, and follow-up analysis of 63 cases: a study from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. *Am J Surg Pathol*, 26, 601-16.
- GLEHR, M., LEITHNER, A., SCHEIPL, S., ZACHERL, M., QUEHENBERGER, F., MAURER-ERTL, W., GRUBER, G., BEHAM, A. & WINDHAGER, R. 2009. Liposarcomas: treatment and outcome, a retrospective single-center study. *European Surgery*, 41, 163-169.
- GRDINA, D. J., MURLEY, J. S., MILLER, R. C., MAUCERI, H. J., SUTTON, H. G., LI, J. J., WOLOSCHAK, G. E. & WEICHSELBAUM, R. R. 2013. A survivinassociated adaptive response in radiation therapy. *Cancer Res*, 73, 4418-28.
- GRONCHI, A., BUI, B. N., BONVALOT, S., PILOTTI, S., FERRARI, S., HOHENBERGER, P., HOHL, R. J., DEMETRI, G. D., LE CESNE, A., LARDELLI, P., PEREZ, I., NIETO, A., TERCERO, J. C., ALFARO, V., TAMBORINI, E. & BLAY, J. Y. 2012a. Phase II clinical trial of neoadjuvant trabectedin in patients with advanced localized myxoid liposarcoma. *Ann Oncol*, 23, 771-6.
- GRONCHI, A., MICELI, R., COLOMBO, C., STACCHIOTTI, S., COLLINI, P., MARIANI, L., SANGALLI, C., RADAELLI, S., SANFILIPPO, R., FIORE, M. & CASALI, P. G. 2012b. Frontline extended surgery is associated with improved survival in retroperitoneal low- to intermediate-grade soft tissue sarcomas. *Ann Oncol*, 23, 1067-73.

- GUO, H., WANG, Y., SONG, T., XIN, T., ZHENG, Z., ZHONG, P. & ZHANG, X. 2015. Silencing of Survivin Using YM155 Inhibits Invasion and Suppresses Proliferation in Glioma Cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 71, 587-593.
- HAUSER, H. P., BARDROFF, M., PYROWOLAKIS, G. & JENTSCH, S. 1998. A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *J Cell Biol*, 141, 1415-22.
- HENGARTNER, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. Nature, 407, 770.
- HENRICKS, W. H., CHU, Y. C., GOLDBLUM, J. R. & WEISS, S. W. 1997. Dedifferentiated liposarcoma: a clinicopathological analysis of 155 cases with a proposal for an expanded definition of dedifferentiation. *Am J Surg Pathol*, 21, 271-81.
- HESLIN, M. J., LEWIS, J. J., WOODRUFF, J. M. & BRENNAN, M. F. 1997. Core needle biopsy for diagnosis of extremity soft tissue sarcoma. *Ann Surg Oncol*, 4, 425-31.
- HOU, L.-J., HUANG, X.-X., XU, L.-N., ZHANG, Y.-Y., ZHAO, N., OU, R.-Y., LI, W.-F., ZHANG, W.-J., JIANG, Q.-W., YANG, Y., WEI, M.-N., HUANG, J.-R., WANG, K., YUAN, M.-L., XING, Z.-H., SHI, Z. & YAN, X.-J. 2018. YM155 enhances docetaxel efficacy in ovarian cancer. *American Journal of Translational Research*, 10, 696-708.
- HU, J., PAN, J., LUO, Z. & TAO, Z. 2015. Downregulation of Survivin by shRNA Inhibits Invasion and Enhances the Radiosensitivity of Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 72, 251-257.
- IL YU, J., LEE, H., PARK, H. C., CHOI, D. H., CHOI, Y.-L., DO, I.-G., KIM, H. C., LEE, W. Y., YUN, S. H., CHO, Y. B., HUH, J. W., PARK, Y. A., PARK, Y. S., PARK, J. O., KIM, S. T. & PARK, W. 2016. Prognostic significance of survivin in rectal cancer patients treated with surgery and postoperative concurrent chemoradiation therapy. *Oncotarget*, 7, 62676-62686.
- INOHARA, N., CHAMAILLARD, M., MCDONALD, C. & NUÑEZ, G. 2005. NOD-LRR PROTEINS: Role in Host-Microbial Interactions and Inflammatory Disease. *Annual Review of Biochemistry*, 74, 355-383.
- ITALIANO, A., GARBAY, D., CIOFFI, A., MAKI, R. G. & BUI, B. 2012a. Advanced pleomorphic liposarcomas: clinical outcome and impact of chemotherapy. *Annals of Oncology*, 23, 2205-2206.
- ITALIANO, A., TOULMONDE, M., CIOFFI, A., PENEL, N., ISAMBERT, N., BOMPAS, E., DUFFAUD, F., PATRIKIDOU, A., LORTAL, B., LE CESNE, A., BLAY, J. Y., MAKI, R. G., SCHWARTZ, G. K., ANTONESCU, C. R., SINGER, S., COINDRE, J. M. & BUI, B. 2012b. Advanced welldifferentiated/dedifferentiated liposarcomas: role of chemotherapy and survival. Ann Oncol, 23, 1601-7.
- JAQUES, D. P., COIT, D. G., HAJDU, S. I. & BRENNAN, M. F. 1990. Management of primary and recurrent soft-tissue sarcoma of the retroperitoneum. *Annals of Surgery*, 212, 51-59.
- JASON B. GARRISON, A. K., KATEWELSH, YUNFEIWEN, AND JOHN C. REED 2011. Inhibitor of Apoptosis Proteins. *Apoptosis: Physiology and Pathology*, 1, 11-22.
- JHA, S. & TING, J. P. Y. 2009. Inflammasome-associated nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat proteins and inflammatory diseases. *Journal of immunology* (*Baltimore, Md. : 1950*), 183, 7623-7629.
- JONES, R. L., FISHER, C., AL-MUDERIS, O. & JUDSON, I. R. 2005. Differential sensitivity of liposarcoma subtypes to chemotherapy. *Eur J Cancer*, 41, 2853-60.

- KANWAR, J. R., KAMALAPURAM, S. K. & KANWAR, R. K. 2013. Survivin signaling in clinical oncology: a multifaceted dragon. *Med Res Rev*, 33, 765-89.
- KATENKAMP, D. 2011. Histological classification of soft tissue tumors and staging according to the TNM system. *Pathologe*, 32, 8-13.
- KATO, J., KUWABARA, Y., MITANI, M., SHINODA, N., SATO, A., TOYAMA, T., MITSUI, A., NISHIWAKI, T., MORIYAMA, S., KUDO, J. & FUJII, Y. 2001. Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy. *Int J Cancer*, 95, 92-5.
- KELLY, R. J., THOMAS, A., RAJAN, A., CHUN, G., LOPEZ-CHAVEZ, A., SZABO, E., SPENCER, S., CARTER, C. A., GUHA, U., KHOZIN, S., POONDRU, S., VAN SANT, C., KEATING, A., STEINBERG, S. M., FIGG, W. & GIACCONE, G. 2013. A phase I/II study of sepantronium bromide (YM155, survivin suppressor) with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*, 24, 2601-6.
- KERR, J. F., WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-57.
- KHARBANDA, S., PANDEY, P., SCHOFIELD, L., ISRAELS, S., RONCINSKE, R., YOSHIDA, K., BHARTI, A., YUAN, Z. M., SAXENA, S., WEICHSELBAUM, R., NALIN, C. & KUFE, D. 1997. Role for Bcl-xL as an inhibitor of cytosolic cytochrome C accumulation in DNA damage-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 6939-42.
- KHIN THWAY, R. L. J., JONATHAN NOUJAIM, SHANE ZAIDI, AISHA B. MIAH, CYRIL FISHER 2016. Dedifferentiated Liposarcoma: Updates on Morphology, Genetics, and Therapeutic Strategies.
- KNEBEL, C., LENZE, U., POHLIG, F., LENZE, F., HARRASSER, N., SUREN, C., BREITENBACH, J., RECHL, H., VON EISENHART-ROTHE, R. & MÜHLHOFER, H. M. L. 2017. Prognostic factors and outcome of Liposarcoma patients: a retrospective evaluation over 15 years. *BMC Cancer*, 17, 410.
- KOIKE, H., NITTA, T., SEKINE, Y., ARAI, S., FURUYA, Y., NOMURA, M., MATSUI, H., SHIBATA, Y., ITO, K., OYAMA, T. & SUZUKI, K. 2014. YM155 reverses rapamycin resistance in renal cancer by decreasing survivin. J Cancer Res Clin Oncol, 140, 1705-13.
- KRANSDORF, M. J. 1995. Malignant soft-tissue tumors in a large referral population: distribution of diagnoses by age, sex, and location. *American Journal of Roentgenology*, 164, 129-134.
- KRIEG, A., BASERAS, B., TOMCZAK, M., VERDE, P. E., STOECKLEIN, N. H. & KNOEFEL, W. T. 2013a. Role of survivin as prognostic and clinicopathological marker in gastric cancer: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*, 40, 5501-11.
- KRIEG, A., CORREA, R. G., GARRISON, J. B., LE NEGRATE, G., WELSH, K., HUANG, Z., KNOEFEL, W. T. & REED, J. C. 2009. XIAP mediates NOD signaling via interaction with RIP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 14524-14529.
- KRIEG, A., WERNER, T. A., VERDE, P. E., STOECKLEIN, N. H. & KNOEFEL, W. T. 2013b. Prognostic and clinicopathological significance of survivin in colorectal cancer: a meta-analysis. *PLoS One*, 8, e65338.
- KUHNEN, C., LEHNHARDT, M., STEINAU, H. U. & MULLER, K. M. 2004. Liposarcoma. Aspects of pathomorphology - an analysis of 209 tumos. *Chirurg*, 75, 1151-8.

- KUROKAWA, M. & KORNBLUTH, S. 2009. Caspases and Kinases in a Death Grip. *Cell*, 138, 838-854.
- KUROSAKA, K., TAKAHASHI, M., WATANABE, N. & KOBAYASHI, Y. 2003. Silent Cleanup of Very Early Apoptotic Cells by Macrophages. *The Journal of Immunology*, 171, 4672.
- LACASSE, E. C., BAIRD, S., KORNELUK, R. G. & MACKENZIE, A. E. 1998. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*, 17, 3247-59.
- LAHAT, G., ZHU, Q.-S., HUANG, K.-L., WANG, S., BOLSHAKOV, S., LIU, J., TORRES, K., LANGLEY, R. R., LAZAR, A. J., HUNG, M. C. & LEV, D. 2010. Vimentin Is a Novel Anti-Cancer Therapeutic Target; Insights from In Vitro and In Vivo Mice Xenograft Studies. *PLOS ONE*, 5, e10105.
- LEE, A. T., POLLACK, S. M., HUANG, P. & JONES, R. L. 2017. Phase III Soft Tissue Sarcoma Trials: Success or Failure? *Curr Treat Options Oncol*, 18, 19.
- LEE, A. T. J., THWAY, K., HUANG, P. H. & JONES, R. L. 2018. Clinical and Molecular Spectrum of Liposarcoma. *J Clin Oncol*, 36, 151-159.
- LI, F., AMBROSINI, G., CHU, E. Y., PLESCIA, J., TOGNIN, S., MARCHISIO, P. C. & ALTIERI, D. C. 1998. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, 396, 580-4.
- LI, L. & DAVIE, J. R. 2010. The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology. Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger, 192, 275-283.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- LOPEZ, J., JOHN, S. W., TENEV, T., RAUTUREAU, G. J., HINDS, M. G., FRANCALANCI, F., WILSON, R., BROEMER, M., SANTORO, M. M., DAY, C. L. & MEIER, P. 2011. CARD-mediated autoinhibition of cIAP1's E3 ligase activity suppresses cell proliferation and migration. *Mol Cell*, 42, 569-83.
- LU, L., SHI, H. Z., XIAO, Z. J., WANG, D. & LI, C. L. 2018. [Clinical experience in diagnosis and treatment of primary retroperitoneal liposarcoma]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 98, 773-776.
- MAHOTKA, C., LIEBMANN, J., WENZEL, M., SUSCHEK, C. V., SCHMITT, M., GABBERT, H. E. & GERHARZ, C. D. 2002. Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. *Cell Death And Differentiation*, 9, 1334.
- MAIER, J. K. X., LAHOUA, Z., GENDRON, N. H., FETNI, R., JOHNSTON, A., DAVOODI, J., RASPER, D., ROY, S., SLACK, R. S., NICHOLSON, D. W. & MACKENZIE, A. E. 2002. The Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein Is a Direct Inhibitor of Caspases 3 and 7. *The Journal of Neuroscience*, 22, 2035.
- MANSFIELD, S. A., POLLOCK, R. E. & GRIGNOL, V. P. 2018. Surgery for Abdominal Well-Differentiated Liposarcoma. *Curr Treat Options Oncol*, 19, 1.
- MARUSAWA, H., MATSUZAWA, S.-I., WELSH, K., ZOU, H., ARMSTRONG, R., TAMM, I. & REED, J. C. 2003. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *The EMBO Journal*, 22, 2729-2740.
- MCSHANE, L. M., ALTMAN, D. G., SAUERBREI, W., TAUBE, S. E., GION, M. & CLARK, G. M. 2005. REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *British Journal of Cancer*, 93, 387-391.
- MEHROTRA, S., LANGUINO, L. R., RASKETT, C. M., MERCURIO, A. M., DOHI, T. & ALTIERI, D. C. 2010. IAP regulation of metastasis. *Cancer Cell*, 17, 53-64.

- MERSCH, S., RIEMER, J. C., SCHLÜNDER, P. M., GHADIMI, M. P., ASHMAWY, H., MÖHLENDICK, B., TOPP, S. A., ARENT, T., KRÖPIL, P., STOECKLEIN, N. H., GABBERT, H. E., KNOEFEL, W. T. & KRIEG, A. 2015. Peritoneal sarcomatosis: site of origin for the establishment of an in vitro and in vivo cell line model to study therapeutic resistance in dedifferentiated liposarcoma. *Tumor Biol.*
- MONTECUCCO, A., ZANETTA, F. & BIAMONTI, G. 2015. Molecular mechanisms of etoposide. *EXCLI Journal*, 14, 95-108.
- NAGATA, S. 2004. DNA DEGRADATION IN DEVELOPMENT AND PROGRAMMED CELL DEATH. *Annual Review of Immunology*, 23, 853-875.
- NAKAHARA, T., KITA, A., YAMANAKA, K., MORI, M., AMINO, N., TAKEUCHI, M., TOMINAGA, F., HATAKEYAMA, S., KINOYAMA, I., MATSUHISA, A., KUDOH, M. & SASAMATA, M. 2007. YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts. *Cancer Res*, 67, 8014-21.
- NAKAHARA, T., KITA, A., YAMANAKA, K., MORI, M., AMINO, N., TAKEUCHI, M., TOMINAGA, F., KINOYAMA, I., MATSUHISA, A., KUDOU, M. & SASAMATA, M. 2011. Broad spectrum and potent antitumor activities of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in a wide variety of human cancer cell lines and xenograft models. *Cancer Science*, 102, 614-621.
- NITTA, T., KOIKE, H., MIYAO, T., MIYAZAWA, Y., KATO, H., FURUYA, Y., SEKINE, Y. & SUZUKI, K. 2017. YM155 Reverses Statin Resistance in Renal Cancer by Reducing Expression of Survivin. *Anticancer Research*, 37, 75-80.
- PACKEISEN, J., KORSCHING, E., HERBST, H., BOECKER, W. & BUERGER, H. 2003. Demystified ... Tissue microarray technology. *Molecular Pathology*, 56, 198-204.
- PARK, E., GANG, E. J., HSIEH, Y. T., SCHAEFER, P., CHAE, S., KLEMM, L., HUANTES, S., LOH, M., CONWAY, E. M., KANG, E. S., HOE KOO, H., HOFMANN, W. K., HEISTERKAMP, N., PELUS, L., KEERTHIVASAN, G., CRISPINO, J., KAHN, M., MUSCHEN, M. & KIM, Y. M. 2011. Targeting survivin overcomes drug resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 118, 2191-9.
- PEERY, R. C., LIU, J.-Y. & ZHANG, J.-T. 2017. Targeting survivin for therapeutic discovery: past, present, and future promises. *Drug Discovery Today*, 22, 1466-1477.
- PENG, T., ZHANG, P., LIU, J., NGUYEN, T., BOLSHAKOV, S., BELOUSOV, R., YOUNG, E. D., WANG, X., BREWER, K., LOPEZ-TERRADA, D. H., OLIVEIRA, A. M., LAZAR, A. J. & LEV, D. 2011. An experimental model for the study of well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma; deregulation of targetable tyrosine kinase receptors. *Lab Invest*, 91, 392-403.
- PETERSEN, I. 2013. The new WHO classification and recent results in soft tissue tumor pathology. *Pathologe*, 34, 436-48.
- PINK, D., RICHTER, S., GERDES, S., ANDREOU, D., TUNN, P. U., BUSEMANN, C., EHNINGER, G., REICHARDT, P. & SCHULER, M. K. 2014. Gemcitabine and Docetaxel for Epithelioid Sarcoma: Results from a Retrospective, Multi-Institutional Analysis. *Oncology*, 87, 95-103.
- POMMIER, Y., KOHLHAGEN, G., BAILLY, C., WARING, M., MAZUMDER, A. & KOHN, K. W. 1996. DNA sequence- and structure-selective alkylation of guanine N2 in the DNA minor groove by ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the Caribbean tunicate Ecteinascidia turbinata. *Biochemistry*, 35, 13303-9.
- QI, J., DONG, Z., LIU, J., PEERY, R. C., ZHANG, S., LIU, J. Y. & ZHANG, J. T. 2016. Effective Targeting of the Survivin Dimerization Interface with Small-Molecule Inhibitors. *Cancer Res*, 76, 453-62.
- RABBITTS, T. H., FORSTER, A., LARSON, R. & NATHAN, P. 1993. Fusion of the dominant negative transcription regulator CHOP with a novel gene FUS by translocation t(12;16) in malignant liposarcoma. *Nat Genet*, 4, 175-80.
- RAMP, U., KRIEG, T., CALISKAN, E., MAHOTKA, C., EBERT, T., WILLERS, R., GABBERT, H. E. & GERHARZ, C. D. 2004. XIAP expression is an independent prognostic marker in clear-cell renal carcinomas 1. *Human Pathology*, 35, 1022-1028.
- RAPHAEL E. POLLOEK, R. G. M., BRIAN O'SULLIVAN, MARK AGULNIK, SNEHAL G. PATEL, ALEXANDER J. LAZAR, ROBÍN L. JONES, ERICH M. STURGIS, SAM S. YOON, ELLIOT A. ASARE, KUMARASEN COOPER, JASON L. HORNICK, VICKI L. KEEDY, DAVID G. KIRSCH, JOHN E. MADEWELL, DAVID M. PANICEK, R. LOR RANDALL, PAIGE S. TEDDER, CHANDRAJIT P. RAUT, ELIZABETH H. BALDINI, RICHARD F. RIEDEL, 2017. AJCC Cancer Staging Manual - Soft Tissue Sarcoma. Springer-Verlag, 8th edition, 489-539.
- REMMELE, W. & STEGNER, H. E. 1987. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*, 8, 138-40.
- RHODES, A. & HILLEN, T. 2016. Mathematical Modeling of the Role of Survivin on Dedifferentiation and Radioresistance in Cancer. *Bull Math Biol*, 78, 1162-88.
- ROSA, J., CANOVAS, P., ISLAM, A., ALTIERI, D. C. & DOXSEY, S. J. 2006. Survivin Modulates Microtubule Dynamics and Nucleation throughout the Cell Cycle. *Molecular Biology of the Cell*, 17, 1483-1493.
- ROTHE, G. 2007. Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. Zelluläre Diagnostik - Karger Verlag, 27-70.
- SACHITA, K., YU, H. J., YUN, J. W., LEE, J. S. & CHO, S. D. 2014. YM155 induces apoptosis through downregulation of specificity protein 1 and myeloid cell leukemia-1 in human oral cancer cell lines. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 44, 785-791.
- SAELENS, X., FESTJENS, N., WALLE, L. V., GURP, M. V., LOO, G. V. & VANDENABEELE, P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 23, 2861.
- SAH, N. K. & SENIYA, C. 2015. Survivin splice variants and their diagnostic significance. *Tumor Biology*, 36, 6623-6631.
- SALMAN, T., ARGON, A., KEBAT, T., VARDAR, E., ERKAN, N. & ALACACIOĞLU, A. 2016. The prognostic significance of survivin expression in gallbladder carcinoma. APMIS, 124, 633-638.
- SAMBRANO, G. R. & STEINBERG, D. 1995. Recognition of oxidatively damaged and apoptotic cells by an oxidized low density lipoprotein receptor on mouse peritoneal macrophages: role of membrane phosphatidylserine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 1396-1400.
- SCAFFIDI, C., SCHMITZ, I., KRAMMER, P. H. & PETER, M. E. 1999. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 274, 1541-8.
- SCHMIDT, S. M., SCHAG, K., MÜLLER, M. R., WECK, M. M., APPEL, S., KANZ, L., GRÜNEBACH, F. & BROSSART, P. 2003. Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells. *Blood*, 102, 571.

- SCHOFFSKI, P., CHAWLA, S., MAKI, R. G., ITALIANO, A., GELDERBLOM, H., CHOY, E., GRIGNANI, G., CAMARGO, V., BAUER, S., RHA, S. Y., BLAY, J. Y., HOHENBERGER, P., D'ADAMO, D., GUO, M., CHMIELOWSKI, B., LE CESNE, A., DEMETRI, G. D. & PATEL, S. R. 2016. Eribulin versus dacarbazine in previously treated patients with advanced liposarcoma or leiomyosarcoma: a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet*, 387, 1629-37.
- SHARMA, S., KAUFMANN, T. & BISWAS, S. 2017. Impact of inhibitor of apoptosis proteins on immune modulation and inflammation. *Immunol Cell Biol*, 95, 236-243.
- SHIOZAKI, E. N., CHAI, J., RIGOTTI, D. J., RIEDL, S. J., LI, P., SRINIVASULA, S. M., ALNEMRI, E. S., FAIRMAN, R. & SHI, Y. Mechanism of XIAP-Mediated Inhibition of Caspase-9. *Molecular Cell*, 11, 519-527.
- SIEGMUND-SCHULTZE, N. 2018. Jahrestagung der American Society of Clinical Oncology: Präzisionsmedizin im Fokus. *Deutsches Arzteblatt International*, 115, A-1480.
- SINGER, S., ANTONESCU, C. R., RIEDEL, E. & BRENNAN, M. F. 2003a. Histologic subtype and margin of resection predict pattern of recurrence and survival for retroperitoneal liposarcoma. *Ann Surg*, 238, 358-70; discussion 370-1.
- SINGER, S., ANTONESCU, C. R., RIEDEL, E. & BRENNAN, M. F. 2003b. Histologic subtype and margin of resection predict pattern of recurrence and survival for retroperitoneal liposarcoma. *Ann Surg*, 238, 358-70.
- SMITH, C. A., MARTINEZ, S. R., TSENG, W. H., TAMURIAN, R. M., BOLD, R. J., BORYS, D. & CANTER, R. J. 2012. Predicting Survival for Well-Differentiated Liposarcoma: The Importance of Tumor Location1. *Journal of Surgical Research*, 175, 12-17.
- SMITH, H. G., PANCHALINGAM, D., HANNAY, J. A., SMITH, M. J., THOMAS, J. M., HAYES, A. J. & STRAUSS, D. C. 2015. Outcome following resection of retroperitoneal sarcoma. *Br J Surg*, 102, 1698-709.
- SPAN, P. N., SWEEP, F. C., WIEGERINCK, E. T., TJAN-HEIJNEN, V. C., MANDERS, P., BEEX, L. V. & DE KOK, J. B. 2004. Survivin is an independent prognostic marker for risk stratification of breast cancer patients. *Clin Chem*, 50, 1986-93.
- STERNBERG, S. S. 1952. Liposarcoma arising within a subcutaneous lipoma. *Cancer*, 5, 975-978.
- STRAUB, C. S. 2011. Targeting IAPs as An Approach to Anti-Cancer Therapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11, 291-316.
- SUN, C., NETTESHEIM, D., LIU, Z. & OLEJNICZAK, E. T. 2005. Solution structure of human survivin and its binding interface with Smac/Diablo. *Biochemistry*, 44, 11-17.
- SUN, Y. & PENG, Z. L. 2009. Programmed cell death and cancer. *Postgrad Med J*, 85, 134-40.
- T. MENTZEL, F. P. 2002a. Mixed-type liposarcoma. *Pathology and Genetics of Tumours* of Soft Tissue and Bone: World Health Organization (WHO), 46.
- T. MENTZEL, F. P. 2002b. Pleomorphic liposarcoma. *Pathology and Genetics of Tumours* of Soft Tissue and Bone: World Health Organization (WHO), 44-45.
- TACAR, O., SRIAMORNSAK, P. & DASS, C. R. 2013. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol*, 65, 157-70.

- TAGUCHI, S., KUME, H., FUKUHARA, H., MORIKAWA, T., KAKUTANI, S., TAKESHIMA, Y., MIYAZAKI, H., SUZUKI, M., FUJIMURA, T., NAKAGAWA, T., ISHIKAWA, A., IGAWA, Y., HOMMA, Y. 2016. Symptoms at diagnosis as independent prognostic factors in retroperitoneal liposarcoma. *Mol Clin Oncol*, 4, 255-260.
- TANAKA, M., KAWAHARA, T., NISHIKOSHI, T., HAGIWARA, M., IMAI, K., HASEGAWA, K., KOYA, A., MATSUNO, N., TAKEI, H., AZUMA, N. & FURUKAWA, H. 2017. Successful surgical treatment for huge retroperitoneal liposarcoma involving the pancreas, right kidney, abdominal aorta and inferior vena cava. *Journal of Surgical Case Reports*, 2017, rjx200.
- TAO, Y.-F., LU, J., DU, X.-J., SUN, L.-C., ZHAO, X., PENG, L., CAO, L., XIAO, P.-F., PANG, L., WU, D., WANG, N., FENG, X., LI, Y.-H., NI, J., WANG, J. & PAN, J. 2012. Survivin selective inhibitor YM155 induce apoptosis in SK-NEP-1 Wilms tumor cells. *BMC Cancer*, 12, 619.
- TERADA, Y. 2001. Role of chromosomal passenger complex in chromosome segregation and cytokinesis. *Cell Struct Funct*, 26, 653-7.
- TOLCHER, A. W., MITA, A., LEWIS, L. D., GARRETT, C. R., TILL, E., DAUD, A. I., PATNAIK, A., PAPADOPOULOS, K., TAKIMOTO, C., BARTELS, P., KEATING, A. & ANTONIA, S. 2008. Phase I and pharmacokinetic study of YM155, a small-molecule inhibitor of survivin. J Clin Oncol, 26, 5198-203.
- TOLCHER, A. W., QUINN, D. I., FERRARI, A., AHMANN, F., GIACCONE, G., DRAKE, T., KEATING, A. & DE BONO, J. S. 2012. A phase II study of YM155, a novel small-molecule suppressor of survivin, in castration-resistant taxanepretreated prostate cancer. *Ann Oncol*, 23, 968-73.
- TURC-CAREL, C., LIMON, J., DAL CIN, P., RAO, U., KARAKOUSIS, C. & SANDBERG, A. A. 1986. Cytogenetic studies of adipose tissue tumors. II. Recurrent reciprocal translocation t(12;16)(q13;p11) in myxoid liposarcomas. *Cancer Genet Cytogenet*, 23, 291-9.
- VANDE WALLE, L., LAMKANFI, M. & VANDENABEELE, P. 2008. The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell Death And Differentiation*, 15, 453.
- VANDENABEELE, P., GALLUZZI, L., VANDEN BERGHE, T. & KROEMER, G. 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 700-14.
- VERHAGEN, A. M., EKERT, P. G., PAKUSCH, M., SILKE, J., CONNOLLY, L. M., REID, G. E., MORITZ, R. L., SIMPSON, R. J. & VAUX, D. L. Identification of DIABLO, a Mammalian Protein that Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins. *Cell*, 102, 43-53.
- VOGES, Y. 2016. Untersuchung eines Survivin-Inhibitors an chemosensitiven und chemoresistenten Neuroblastomzellen und nähere Charakterisierung des Wirkmechanismus. *unv. Diss., Johann Wolfgang Goethe-Universität*, 14-15.
- WADEGAONKAR, V. P. & WADEGAONKAR, P. A. 2013. Withanone as an inhibitor of survivin: a potential drug candidate for cancer therapy. *J Biotechnol*, 168, 229-33.
- WAGNER, A. J., BANERJI, U., MAHIPAL, A., SOMAIAH, N., HIRSCH, H., FANCOURT, C., JOHNSON-LEVONAS, A. O., LAM, R., MEISTER, A. K., RUSSO, G., KNOX, C. D., ROSE, S. & HONG, D. S. 2017. Phase I Trial of the Human Double Minute 2 Inhibitor MK-8242 in Patients With Advanced Solid Tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 35, 1304-1311.
- WAGNER, G., WITTEKIND, C. 2004. TNM Klassifikation maligner Tumoren. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 6, 106-109.

- WANG, B., YU, X., XU, S. & XU, M. 2016. Combination of Cisplatin, Ifosfamide, and Adriamycin as Neoadjuvant Chemotherapy for Extremity Soft Tissue Sarcoma: A Report of Twenty-Eight Patients. *Medicine*, 95, e2611.
- WANG, C.-Y., MAYO, M. W., KORNELUK, R. G., GOEDDEL, D. V. & BALDWIN, A. S. 1998. NF-κB Antiapoptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to Suppress Caspase-8 Activation. *Science*, 281, 1680.
- WEBB, J. L. 1963. Enzyme and metabolic inhibitors. 487-512.
- WEI, Y., FAN, T. & YU, M. 2008. Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 40, 278-88.
- WEIKERT, S., CHRISTOPH, F., SCHRADER, M., KRAUSE, H., MILLER, K. & MULLER, M. 2005. Quantitative analysis of survivin mRNA expression in urine and tumor tissue of bladder cancer patients and its potential relevance for disease detection and prognosis. *Int J Cancer*, 116, 100-4.
- WEISS, A., BRILL, B., BORGHOUTS, C., DELIS, N., MACK, L. & GRONER, B. 2012. Survivin inhibition by an interacting recombinant peptide, derived from the human ferritin heavy chain, impedes tumor cell growth. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 138, 1205-1220.
- WERNER, T. A., TAMKAN-OLCEK, Y., DIZDAR, L., RIEMER, J. C., WOLF, A., CUPISTI, K., VERDE, P. E., KNOEFEL, W. T. & KRIEG, A. 2016. Survivin and XIAP: two valuable biomarkers in medullary thyroid carcinoma. *Br J Cancer*, 114, 427-34.
- WIBMER, C., LEITHNER, A., ZIELONKE, N., SPERL, M. & WINDHAGER, R. 2010. Increasing incidence rates of soft tissue sarcomas? A population-based epidemiologic study and literature review. *Ann Oncol*, 21, 1106-11.
- WORLD MEDICAL, A. 2013. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*, 310, 2191-4.
- YANG, Q.-H., CHURCH-HAJDUK, R., REN, J., NEWTON, M. L. & DU, C. 2003. Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes & Development*, 17, 1487-1496.
- YANG, Y., FANG, S., JENSEN, J. P., WEISSMAN, A. M. & ASHWELL, J. D. 2000. Ubiquitin Protein Ligase Activity of IAPs and Their Degradation in Proteasomes in Response to Apoptotic Stimuli. *Science*, 288, 874.
- ZAFFARONI, N., PENNATI, M., COLELLA, G., PEREGO, P., SUPINO, R., GATTI, L., PILOTTI, S., ZUNINO, F. & DAIDONE, M. G. 2002. Expression of the antiapoptotic gene survivin correlates with taxol resistance in human ovarian cancer. *Cell Mol Life Sci*, 59, 1406-12.
- ZHANG, S., ZHANG, C., SONG, Y., ZHANG, J. & XU, J. 2018. Prognostic role of survivin in patients with glioma. *Medicine*, 97, e0571.

Danksagung

Für die Aufnahme in die Forschungsgruppe der Allgemeinchirurgie sowie die jahrelange Betreuung möchte ich vor allem Prof. Dr. Andreas Krieg danken. Die Begleitung von der Einarbeitung bis zur Abgabe hat mich und das Projekt sehr gefördert. Ebenso bedanke ich mich für das Verständnis in anstrengenden Phasen des Studiums und die freundschaftliche Atmosphäre bei der jahrelangen Zusammenarbeit.

Frau Dr. Sabrina Mersch

Danke ich für die geduldige Einarbeitung in die Abläufe und Versuchsprotokolle im Labor. Durch sie hatte ich stets einen vertrauensvollen Ansprechpartner bei kleinen und großen Problemen.

Das Team der Allgemeinchirurgischen Forschung am UKD

Danke für die angenehme Zusammenarbeit während meiner Forschungsphase. Mir bleibt die Zeit mit euch und im Labor als schöne Erinnerung.

Freunde

Danke an alle Freunde, die mich besonders in der Korrekturphase unterstützt haben. Auch den privaten Rückhalt während anstrengender Forschungsphasen habe ich immer sehr geschätzt.

Familie

Für die jahrelange Förderung und finanzielle Unterstützung, die dieses Studium und diese Arbeit ermöglicht haben, möchte ich mich besonders bedanken. Auch in schwierigeren Phasen des Studiums und dieser Arbeit konnte ich mich auf eure Unterstützung stets verlassen.

Freundin

Mein Dank gilt für die Begleitung durch das Studium. Dein bedingungsloses Verständnis, die Ermutigungen und die tolle Unterstützung über all die Jahre haben diese Arbeit ermöglicht und mir durch die lange Ausbildung geholfen.