

# DNA Reparatur für Einsteiger

**Kerstin Borgmann**

Labor für Strahlenbiologie & Experimentelle Radioonkologie,  
Departement für Strahlentherapie und Radioonkologie  
Onkologisches Zentrum, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf



Mannheim



[www.degro.org/degro2016](http://www.degro.org/degro2016)

## 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie

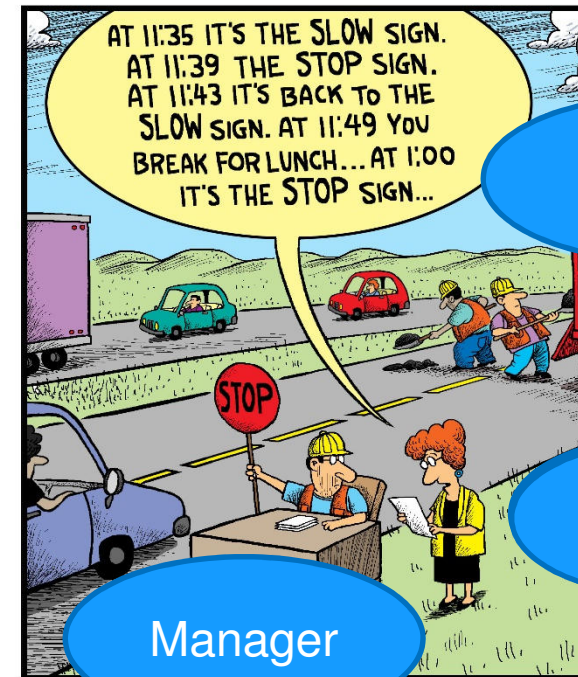
*In Kooperation mit der Österreichischen Gesellschaft für Radioonkologie,  
Radiobiologie und Medizinische Radiophysik (ÖGRO)*

16.-19. Juni 2016

„DEGRO 2016 –  
Innovationen für den Patienten“

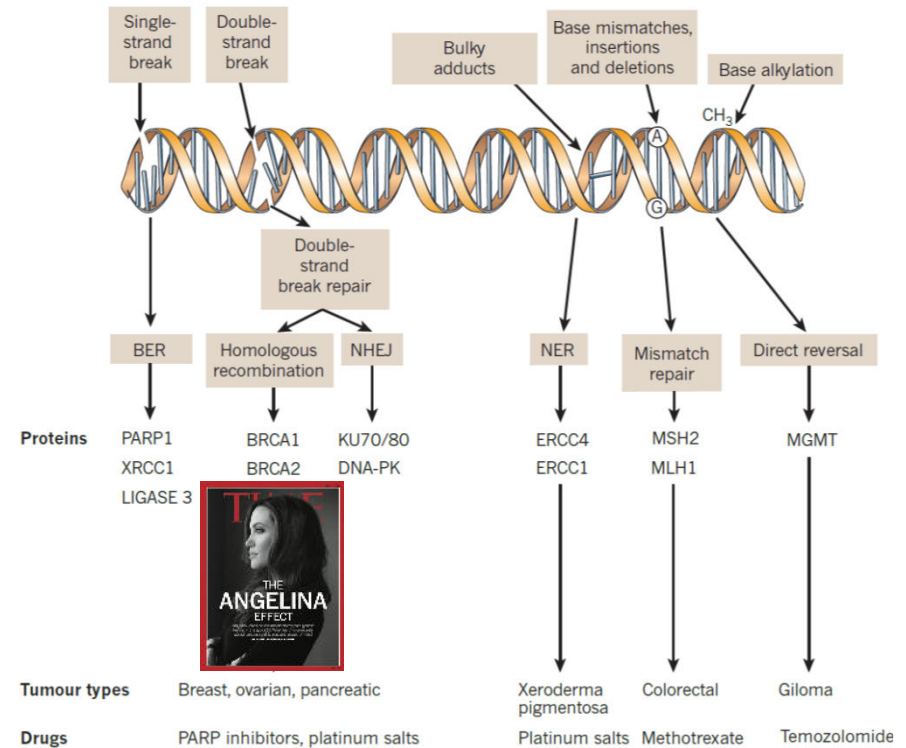
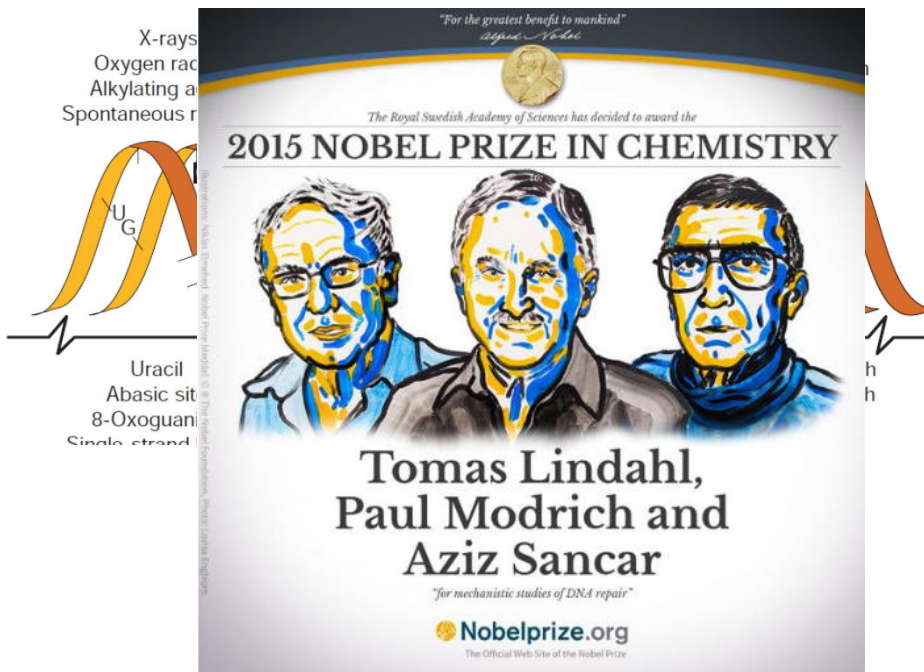
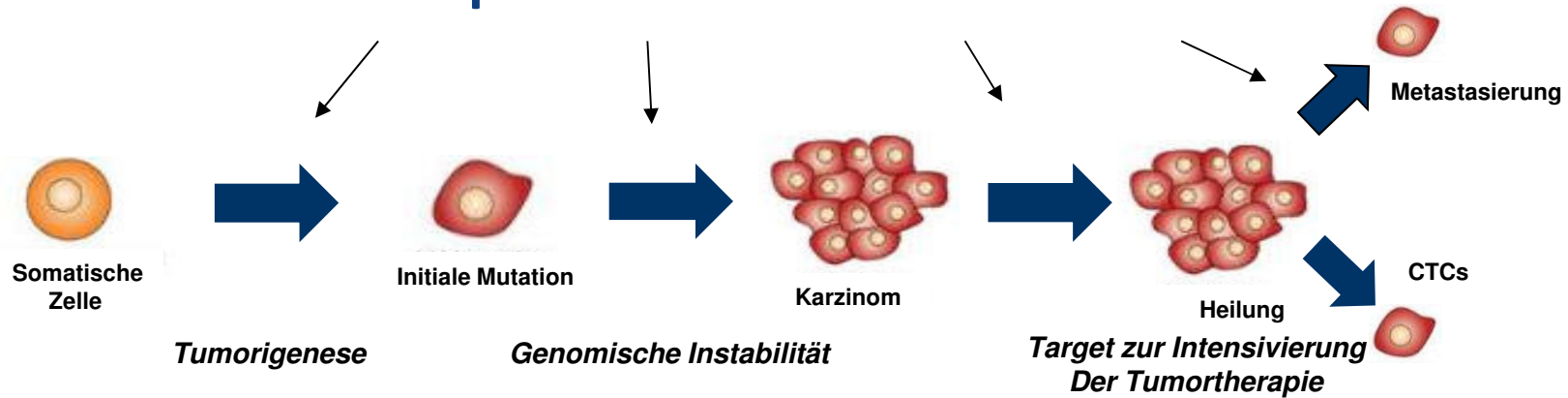
# DNA Reparatur für Einsteiger Überblick

- DNA Reparatur zu verstehen ist nicht schwer!
- DNA Schäden
- DNA Reparaturprozesse
- DNA Reparatur unter Replikation
- DNA Reparatur als Target für die Intensivierung der Tumorthherapie





# DNA Reparatur und Schadensantwort

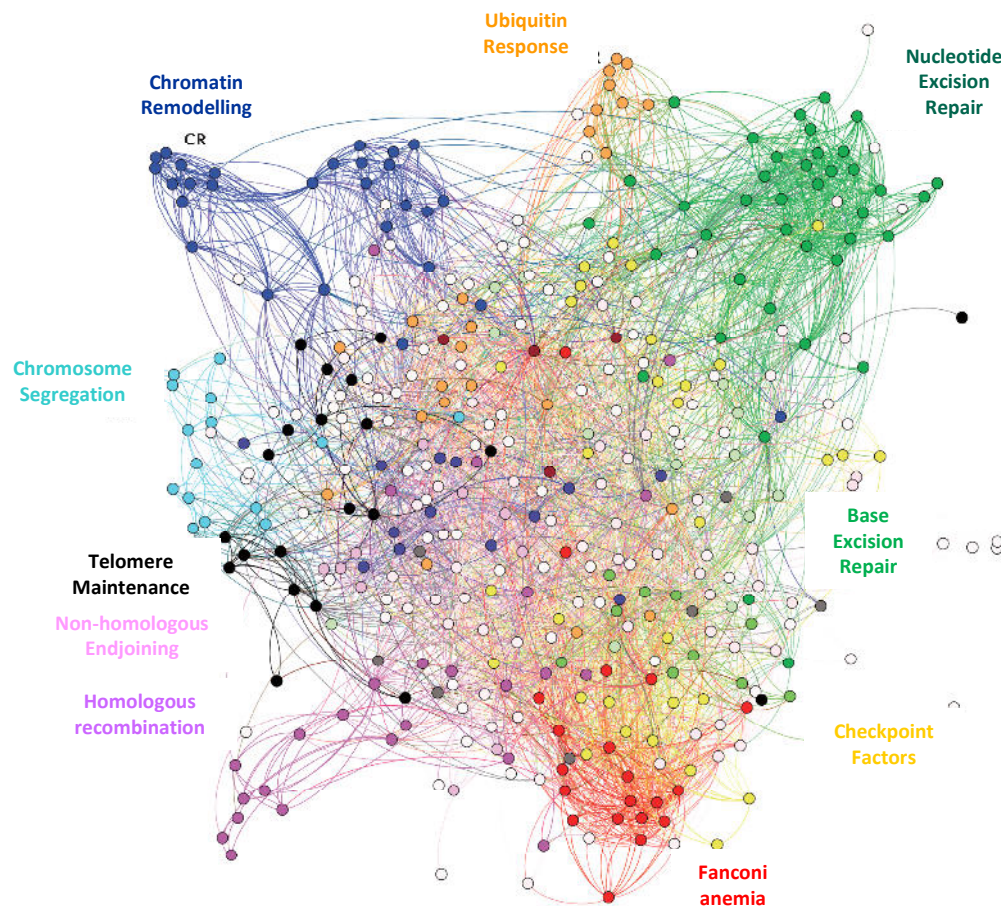


# 450 Gene sind an der DNA Schadensantwort beteiligt

## Therapeutic opportunities within the DNA damage response

Laurence H. Pearl<sup>1</sup>, Amanda C. Schierz<sup>2,3</sup>, Simon E. Ward<sup>4</sup>, Bissan Al-Lazikani<sup>2</sup> and Frances M. G. Pearl<sup>2,4</sup>

| MARCH 2015 | VOLUME 15

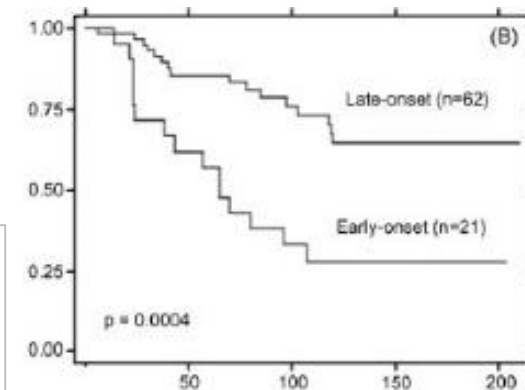
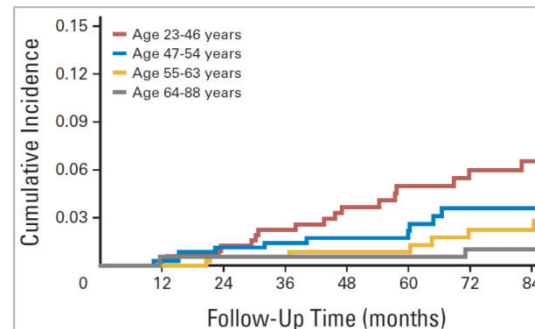
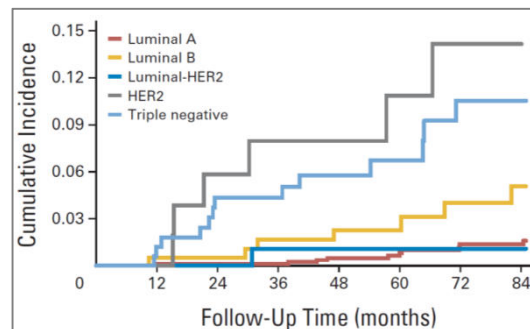
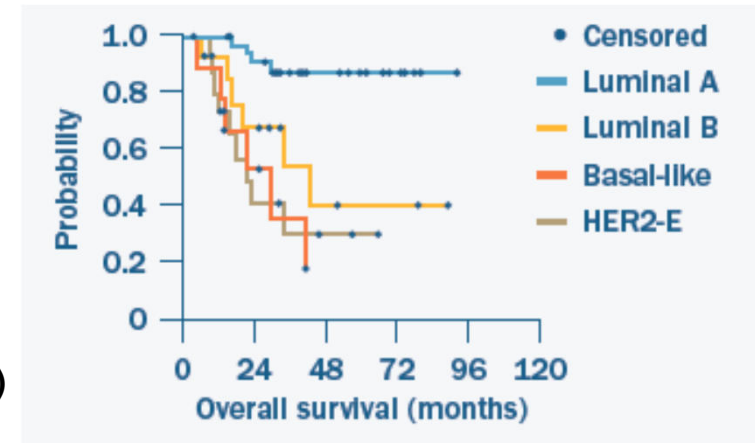


- **Therapeutische Ausnutzung eines Defekt in der DNA Reparaturantwort zur Intensivierung der Tumorthherapie**
- **Proteinkomponenten der DNA Reparaturmaschinerie als vielversprechende Kandidaten für eine zielgerichtete Therapie**
- **Bekanntestes Beispiel für eine zielgerichtete Therapie:**
  - **PARP1 Inhibition beim Mammakarzinom**

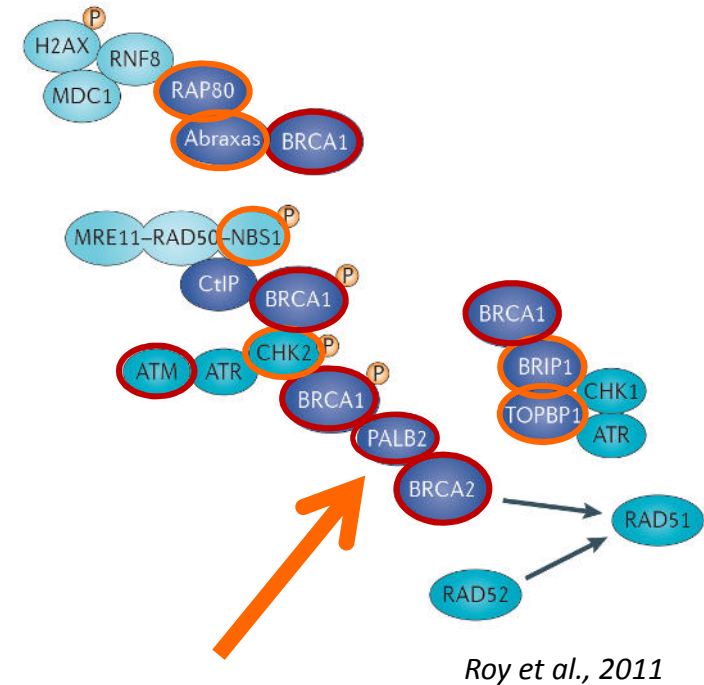
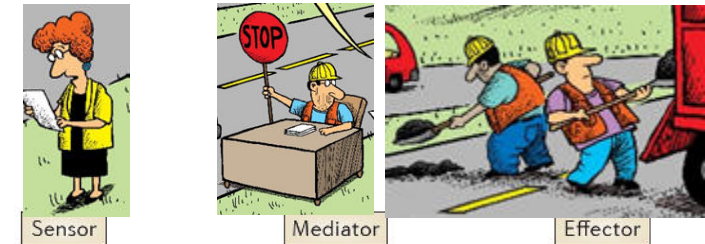
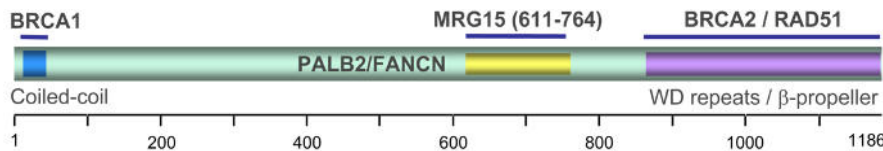
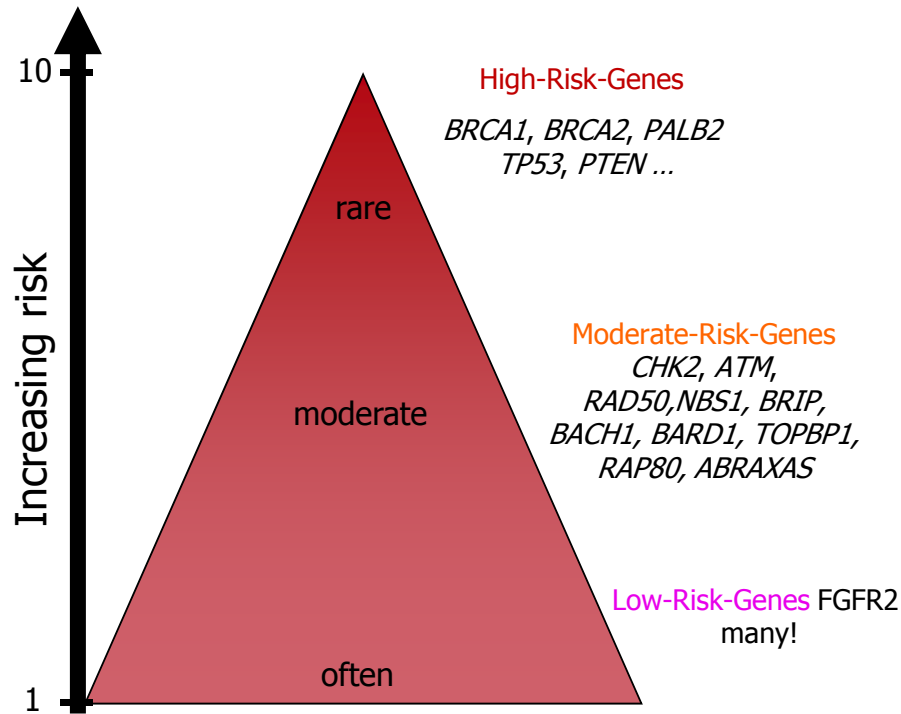


# Mammakarzinom

- Jede 8te Frau wird in ihrem Leben ein invasives Mammakarzinom entwickeln
- Im Prinzip sehr gute Heilungsraten, mittlere 10-Jahresüberlebensrate von über 80%
- Gut etablierte Therapie
- Aber es gibt Subgruppen mit einer deutlich schlechteren Prognose
  - HER2 Amplifikation
  - Basal-artige Tumore = Triple negative Tumore (TNBC)
  - Junge Patientinnen (immerhin jede 10te und ansteigend)
- Bedeutung der Strahlentherapie für diese Gruppen?
- Haben diese Gruppen Gemeinsamkeiten?



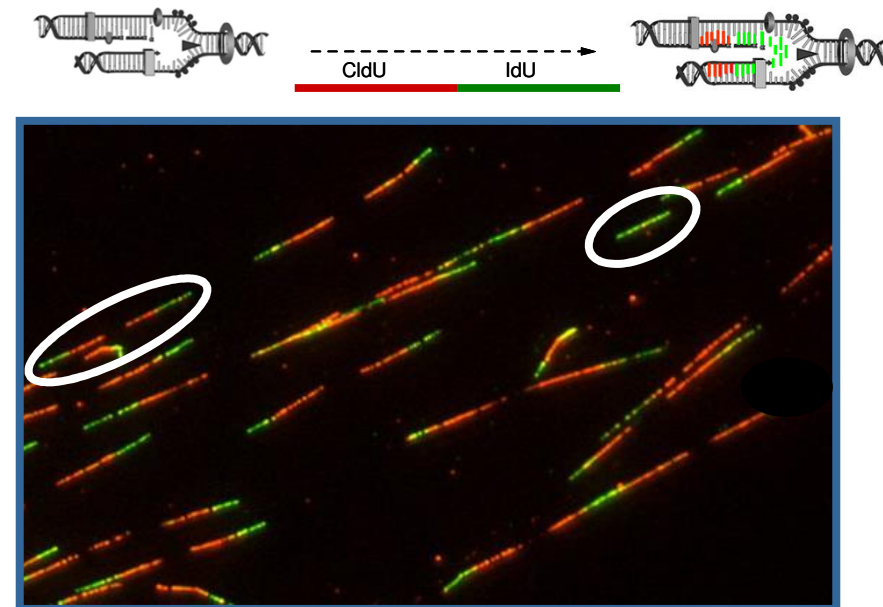
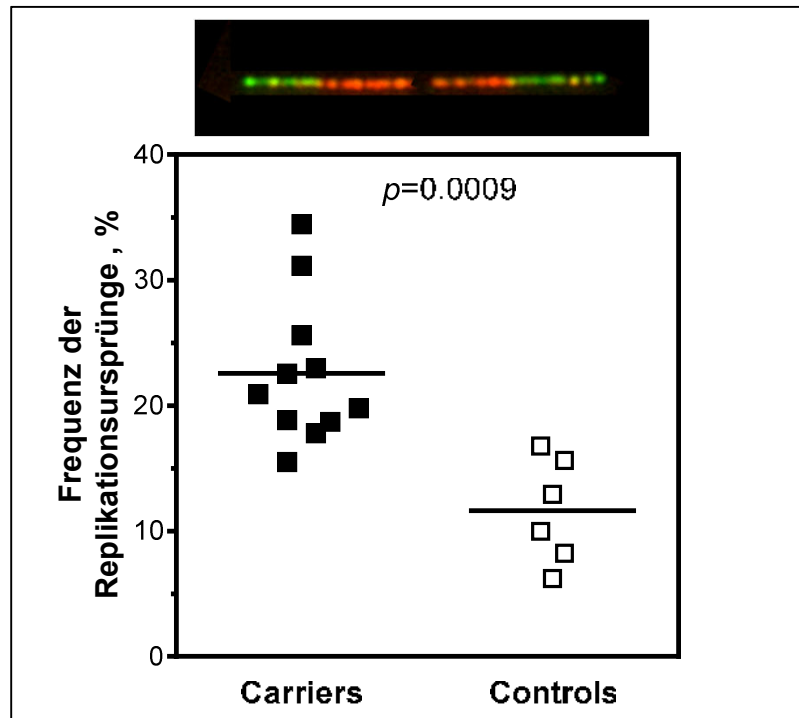
Arvold et al., 2011



- PALB2 (FANCN) = Partner and Localizer of BRCA2
- verknüpft BRCA1, BRCA2 und Rad51
- Beteiligt an DNA Reparatur via Homologous Rekombination
- Mutation identifiziert beim erblichen Brustkrebs (Erkko et al., 2007, Nature)

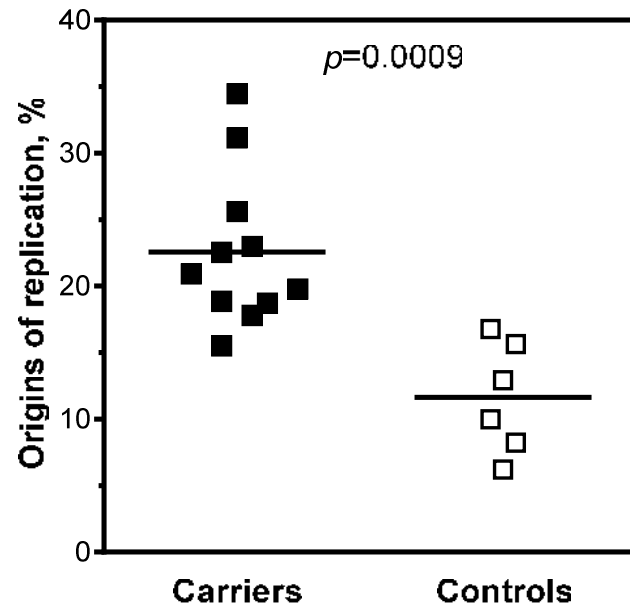
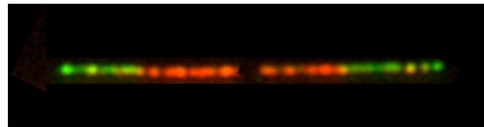
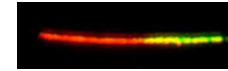
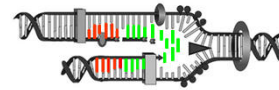
## Trägerinnen einer PALB2 Mutation haben erhöhte genomische Instabilität

- **Lymphoblastoide von Brustkrebspatientinnen mit einer heterozygoten Mutation in Palb2 c1592delT**
  - die *haploinsuffizienz verringert das PALB2 Protein,*
  - **Dadurch entsteht eine veränderte Zellzykuskontrolle über Chk1- und Chk2**
  - ***Dadurch abberante DNA Replikation und DNA Schadensantwort,***
  - **und erhöhte chromosomale Instabilität.**



Nikkilä, Parplys and Pylkäs et al., 2013, Nat comm.

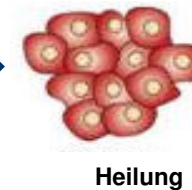
# Veränderte Replikationsprozesse führen zu mehr Chromosomenschäden



Type of aberration	Mean of chromosomal aberrations observed per 100 metaphases	P-value
	Carriers	Controls
Telomeric associations	0.65 SE=0.41	- 0.328
Chromatid/chromosome breaks, deletions	1.65 SE=1.07	1.67 SE=0.49 0.689
Simple chromosomal rearrangements	5.92 SE=2.19	0.67 SE=0.33 <b>0.036</b>
Complex chromosomal rearrangements	2.92 SE=1.76	- <b>0.036</b>
<b>Total rearrangements (simple+complex)</b>	<b>8.83</b> SE=3.75	<b>0.67</b> SE=0.33 <b>0.018</b>

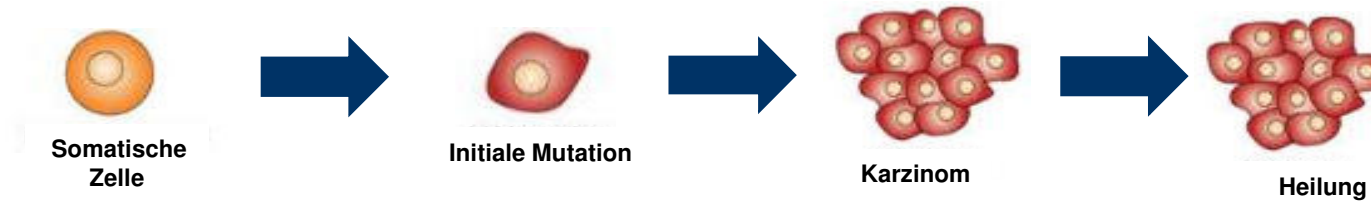
Carriers

Controls





## Hypothese: Defekt in der Replikation als Biomarker für das frühe Auftreten von Brustkrebs

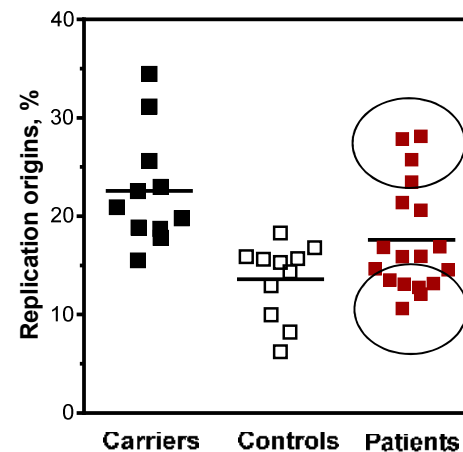
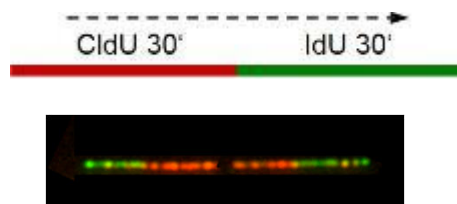


Ein Defekt in der Replikation ist verantwortlich für das frühe Auftreten von Brustkrebs (Kooperation Y Goy/A Krüll/K Steffens/V Müller/C Kubisch)

- Patientinnen mit Brustkrebs vor 45 Jahren
- Patientinnen mit Brustkrebs nach 59 Jahren

DNA Fiber Assay, Protein- und DNA Extraktion in primären Lymphozyten

Identifizierung von Patienten mit Replikationsdefekt, verantwortlichen Signalkaskaden und Gendefekt



Humangenetik C. Kubisch:

1. Whole exome sequencing um  
Gene eines DNA  
Replikationsdefekt Phänotyps zu  
Identifizieren

Status: 23/200 Patienten

2. Verifizierungskohorte

AC Parplys, H Dikomey and KA Matthes, Britta Riepen

# Obwohl ein Reparaturdefekt keine

# bessere Prognose im Vergleich zu sporadischen Tumoren

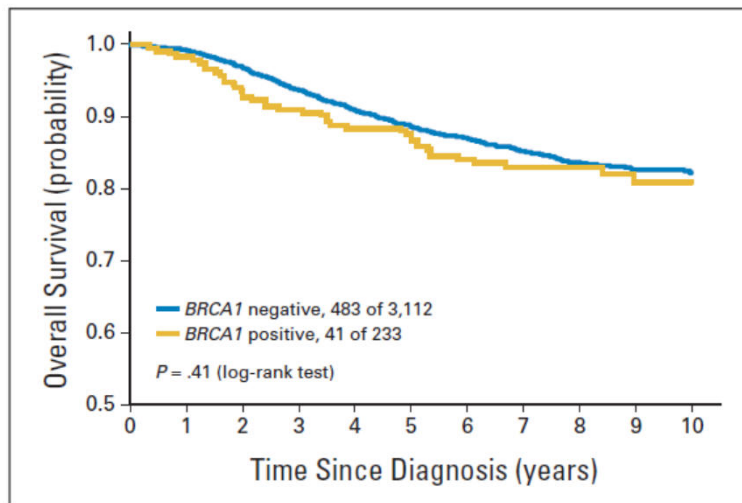
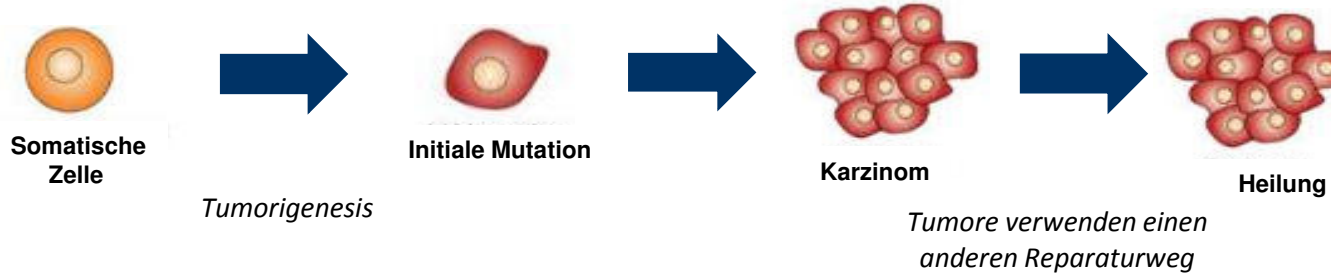
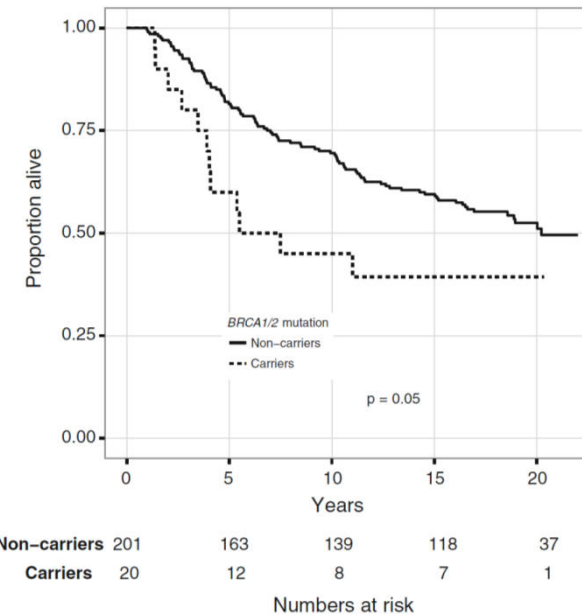


Fig 1. Survival after breast cancer by *BRCA1* mutation status.  
Huzarski et al., JCO 2013



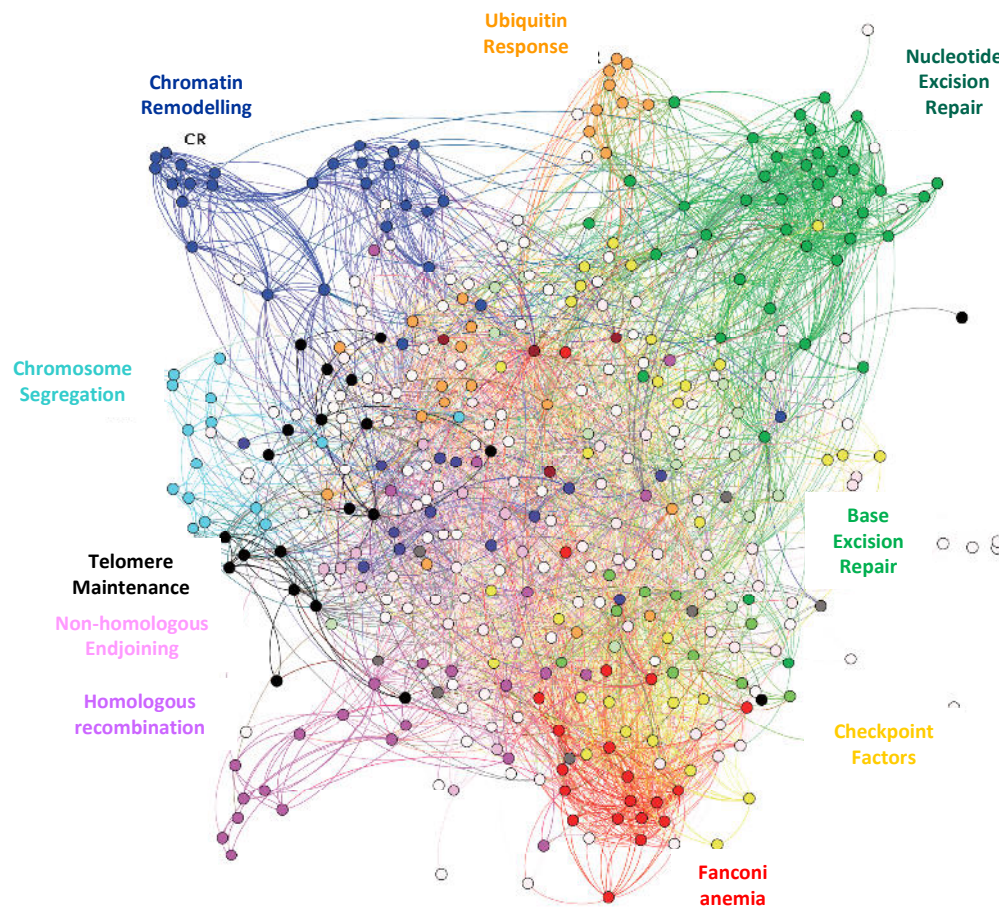
Nilsson et al., Breast Cancer Res Treat (2014)

# 450 Gene welche in die DNA Reparatur involviert sind!

## Therapeutic opportunities within the DNA damage response

Laurence H. Pearl<sup>1</sup>, Amanda C. Schierz<sup>2,3</sup>, Simon E. Ward<sup>4</sup>, Bissan Al-Lazikani<sup>2</sup> and  
Frances M. G. Pearl<sup>2,4</sup>

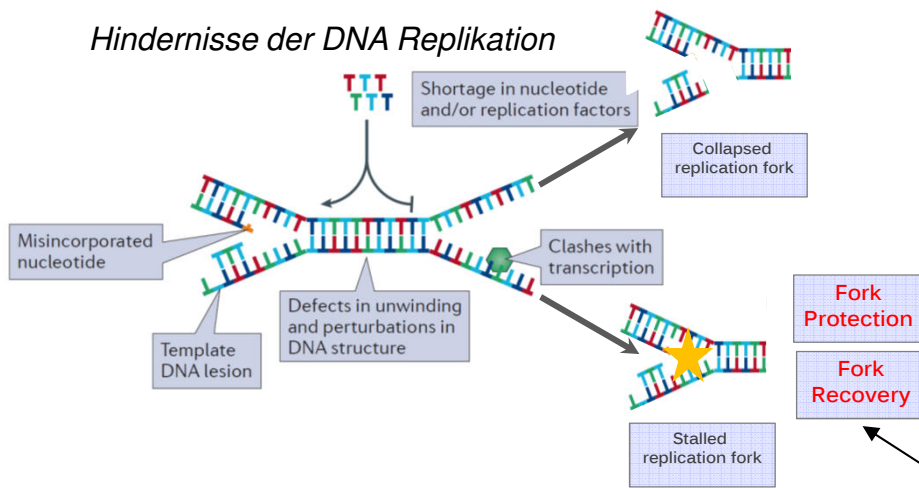
| MARCH 2015 | VOLUME 15



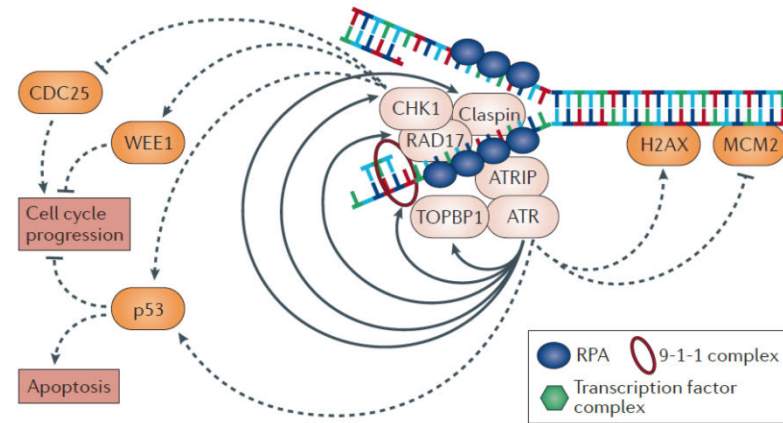
- Wie kann man einen Defekt der DNA Reparatur Antwort als therapeutisches Target für die Radio- und Chemotherapie erkennen?
- Ausnutzung des Unterschieds von Tumoren/Normalgewebes
  - Proliferation

# Tumorzellen teilen sich!

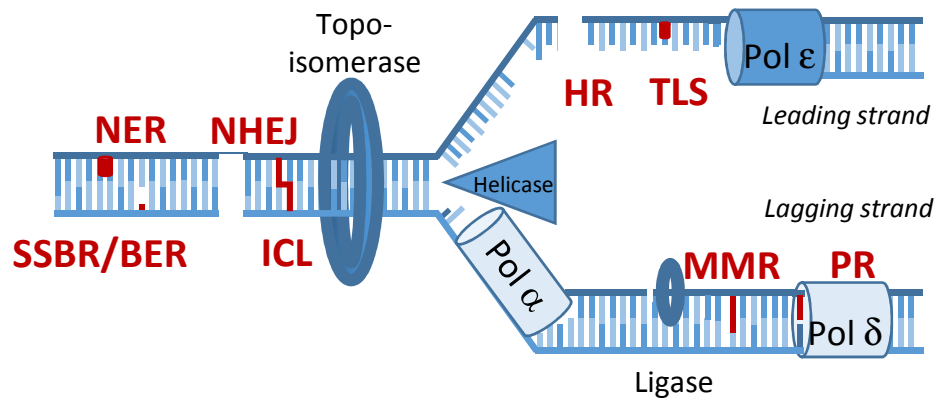
## Hindernisse der DNA Replikation



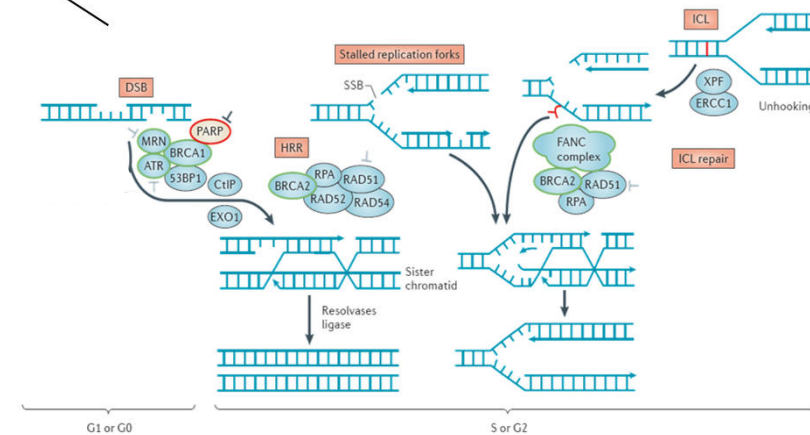
## DNA Schadensantwort unter DNA Replikation



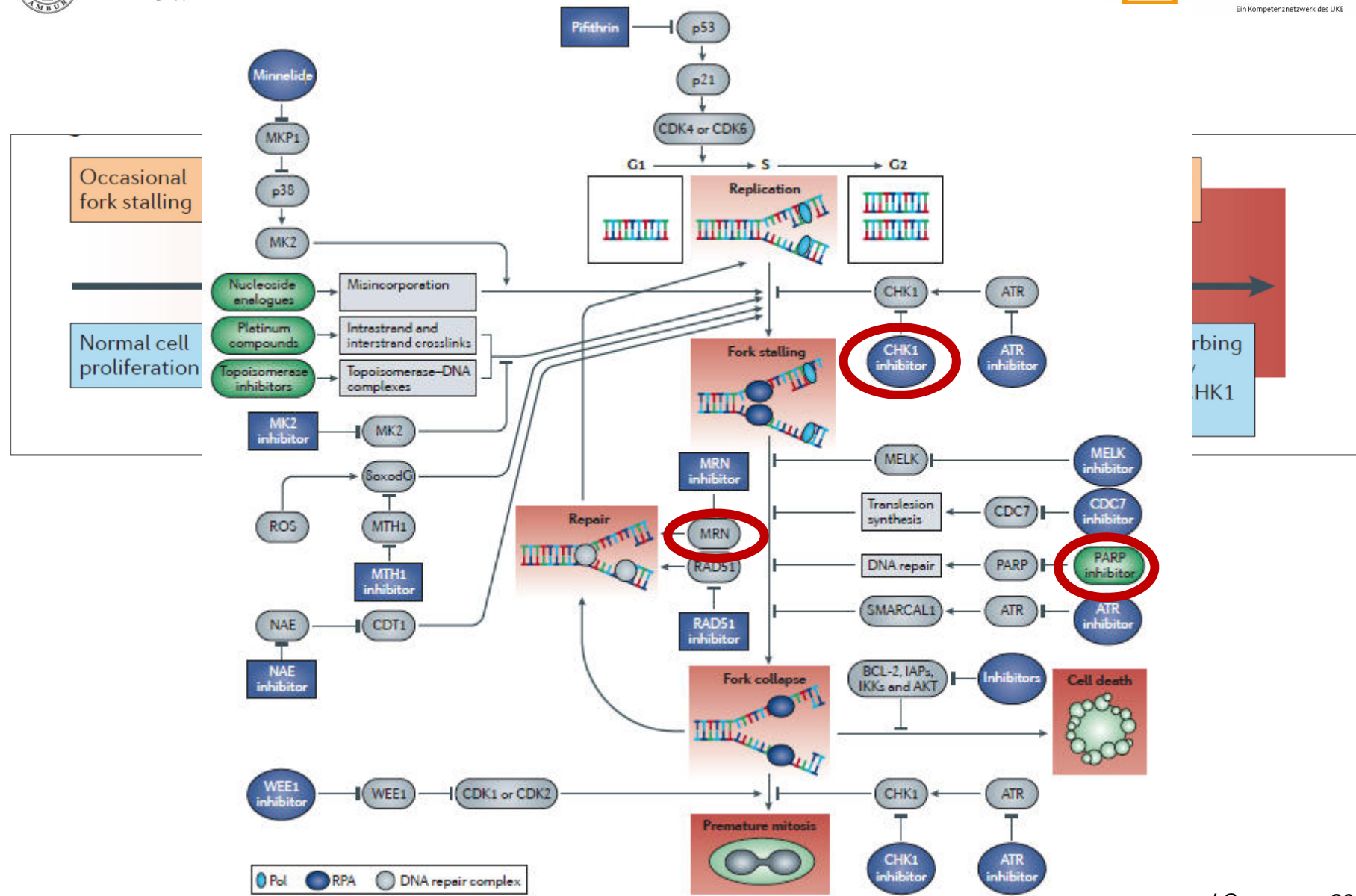
## DNA Reparaturwege an der Replikation



## DNA Reparatur durch Homologe Rekombination







Loddestein and Sørensen, 2015



## Neue Targets: DNA Reparatur zur Intensivierung der Tumorthherapie

Table 1 | Examples of DDR inhibitors in clinical use or in development

		Phase	Therapie
PARP Inhibitoren			
PARP inhibitor	Olaparib	2 phase II studies completed, 9 additional phase II studies under way	Ovarian, breast, gastric, colorectal and pancreatic tumours and a range of other solid tumours
	Veliparib	16 phase II studies under way	Ovarian, breast, gastric, colorectal and pancreatic tumours and a range of other solid tumours
	Rucaparib	2 phase II studies recruiting	Breast and other solid tumours
	MK4827	Phase I study completed, phase Ib ongoing	Glioblastoma multiforme, melanoma and other solid tumours and leukaemias
CHEK1 inhibitor	AZD7762	Phase I study completed	Range of solid tumours
MGMT inhibitor	Lomeguatrib	Phase I study under way	Colorectal cancer and other solid tumours
Telomerase inhibitor	Imetelstat	4 phase II studies under way	Solid tumours and leukaemias

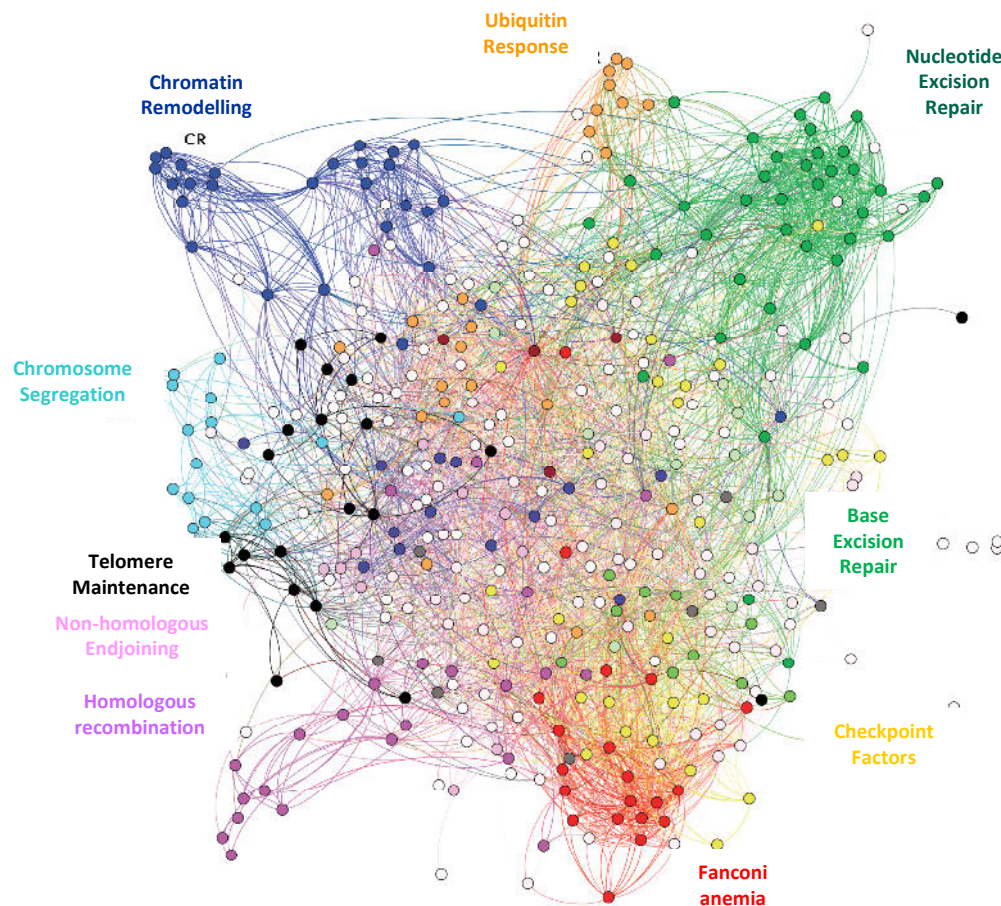
Lord and Ashworth, Nature 2012

# 450 Gene welche in die DNA Reparatur involviert sind!

## Therapeutic opportunities within the DNA damage response

Laurence H. Pearl<sup>1</sup>, Amanda C. Schierz<sup>2,3</sup>, Simon E. Ward<sup>4</sup>, Bissan Al-Lazikani<sup>2</sup> and Frances M. G. Pearl<sup>2,4</sup>

| MARCH 2015 | VOLUME 15



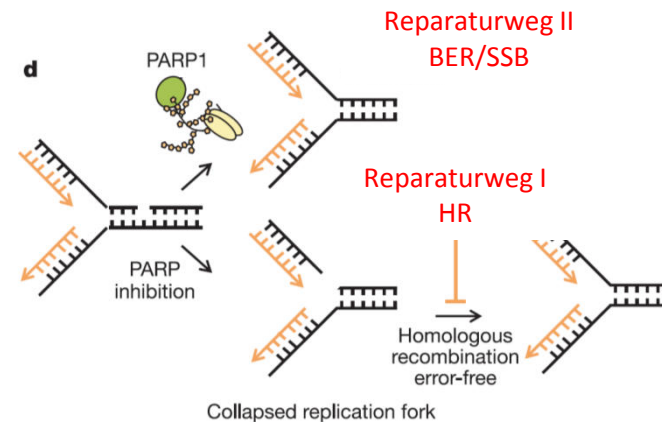
- Defekte der DNA Reparatur Antwort der Zelle wurden als therapeutisches Target für die Radio- und Chemotherapie erkannt
- Inhibitoren des DNA Reparatursystems werden entwickelt um spezifisch die DNA zu schädigen und damit die Therapie zu intensivieren
- Beispiele für eine sogenannte Targeted Therapie:
  - PARP1 Inhibition bei Brusttumoren

# Konzept: “Synthetic lethality”

➤ I und II können sich gegenseitig kompensieren

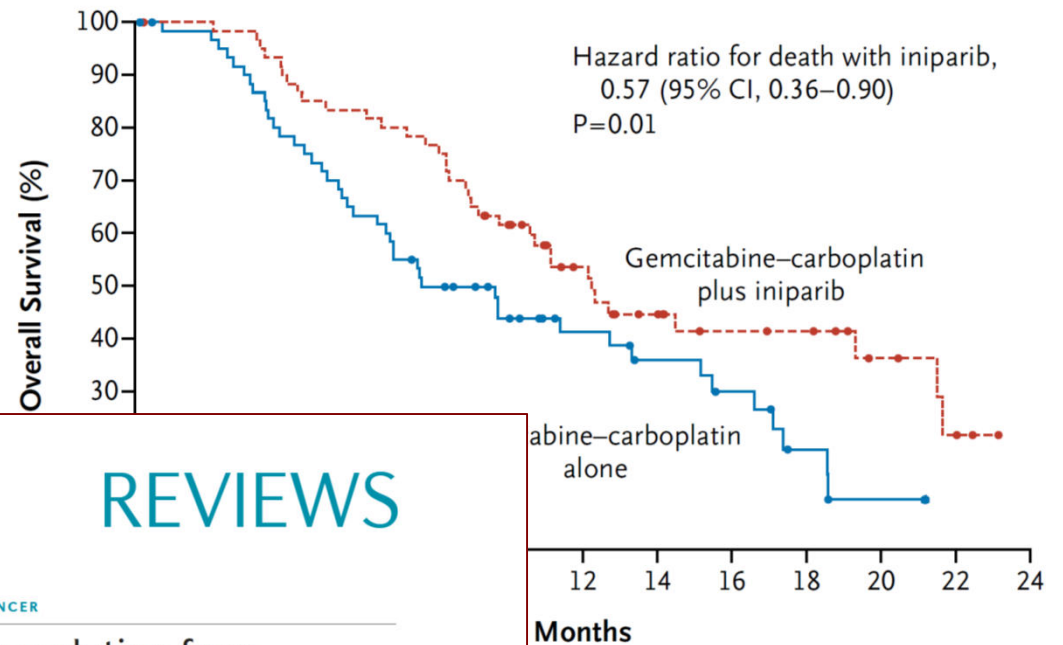
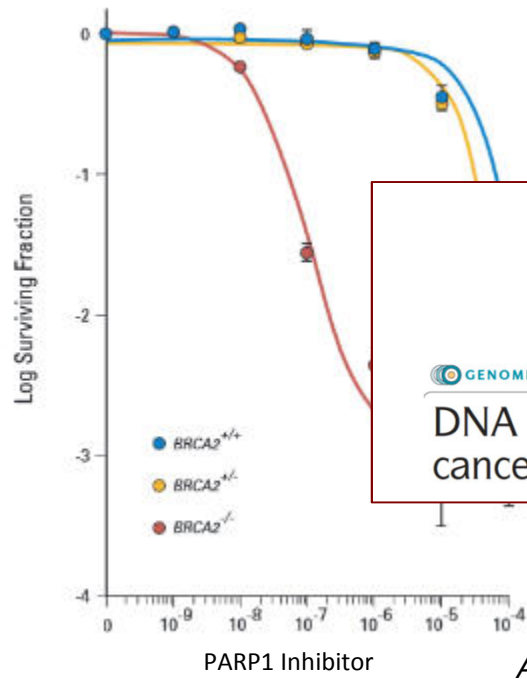
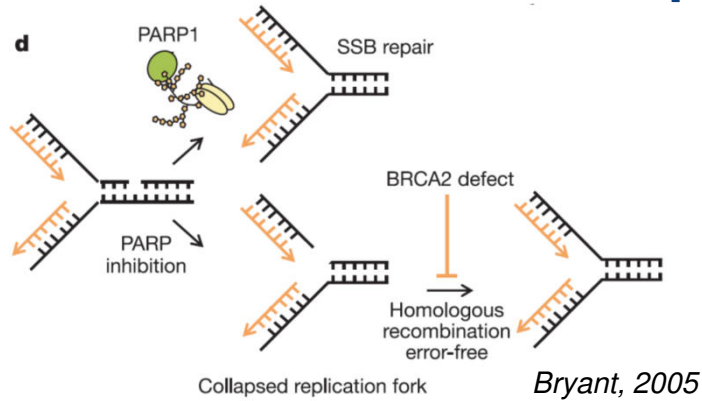
Reparaturweg I HR	Reparaturweg II BER/SSB	Cell survival?
+	+	😊 ✓
+	-	😊 ✓
-	+	😊 ✓
-	-	☠ ✗

- Nur letal wenn beide Wege inhibiert sind
- Beispiele für Synthetic lethality Ansätze:
  - Homologe Rekombination und PARP1i
  - Fanconi Anämie/p53 und ATMi
  - Replikations-assoziierte Reparatur und CHK1/ATRi
  - RAD50 und ATMi
  - .....



Bryant, 2005  
 Ashworth, 2013

# HR defekte Zelllinien lassen sich durch PARPi sensitivieren



**REVIEWS**

GENOMIC INSTABILITY IN CANCER

DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target

*Curtin, Nature 2012*

# Verstärkung der Wirkung von PARP1i durch Bestrahlung

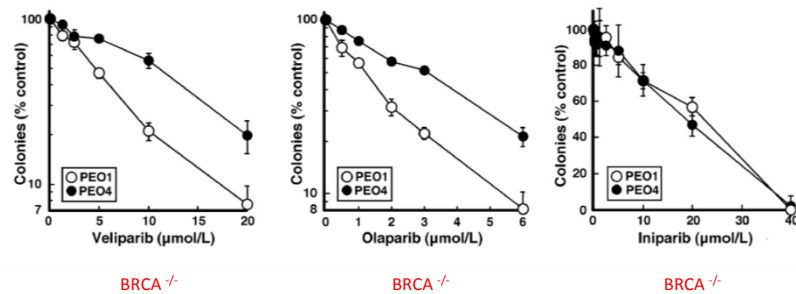
Published OnlineFirst January 30, 2012; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2890

Cancer Therapy: Preclinical

Clinical  
Cancer  
Research

## Failure of Iniparib to Inhibit Poly(ADP-Ribose) Polymerase In Vitro

Anand G. Patel<sup>1</sup>, Silvana B. De Lorenzo<sup>1</sup>, Karen S. Flatten<sup>1</sup>, Guy G. Poirier<sup>3</sup>, and Scott H. Kaufmann<sup>1,2</sup>



## Downfall of Iniparib: A PARP Inhibitor That Doesn't Inhibit PARP After All

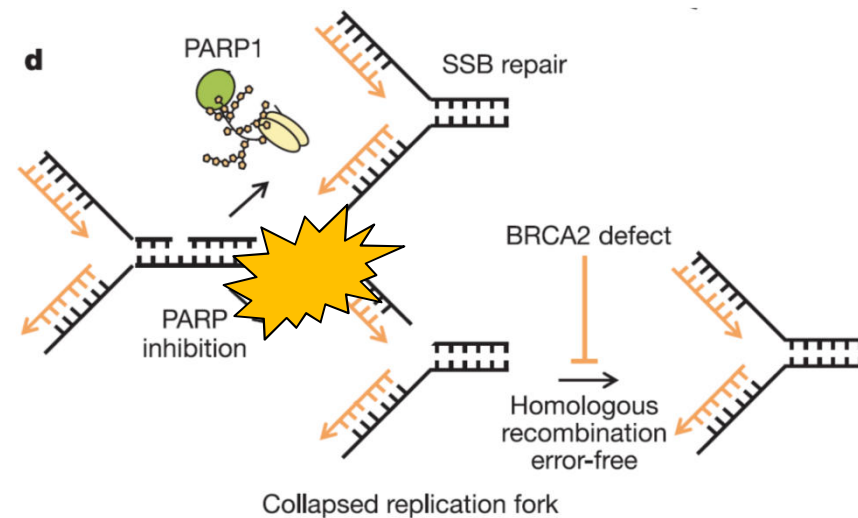
By Gunjan Sinha

JNCI | News 1 of 9

© Oxford University Press 2014. DOI:10.1093/jnci/djt447

### Gründe

- Monotherapie nicht ausreichend



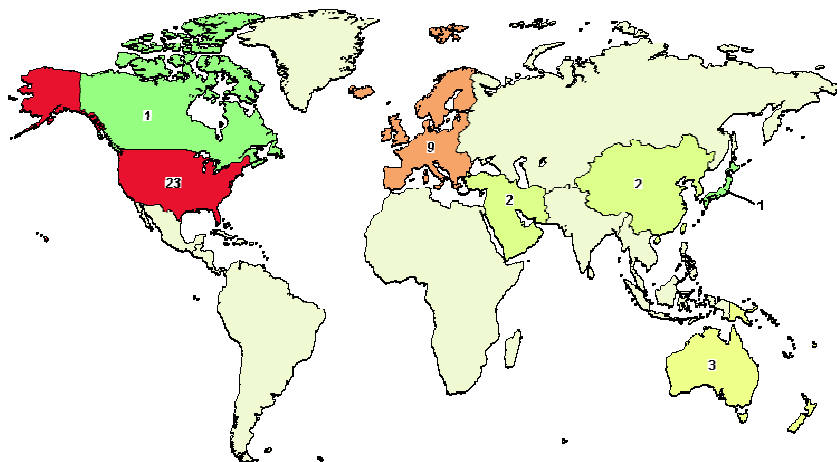
Bryant, 2005



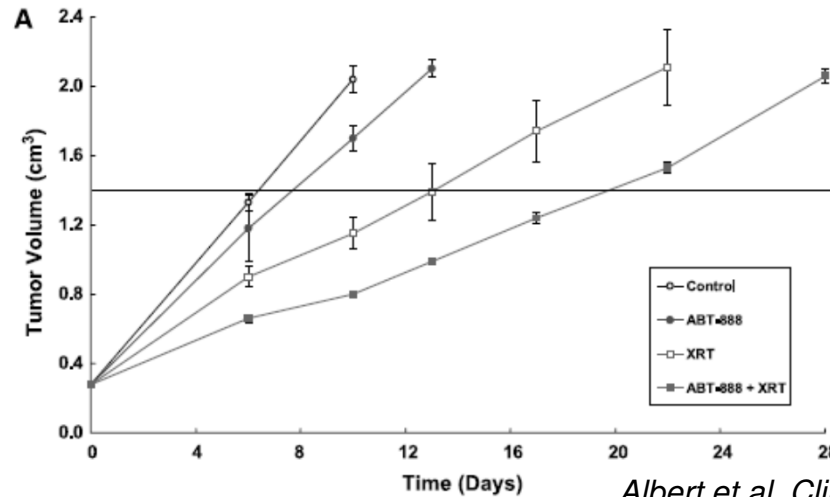
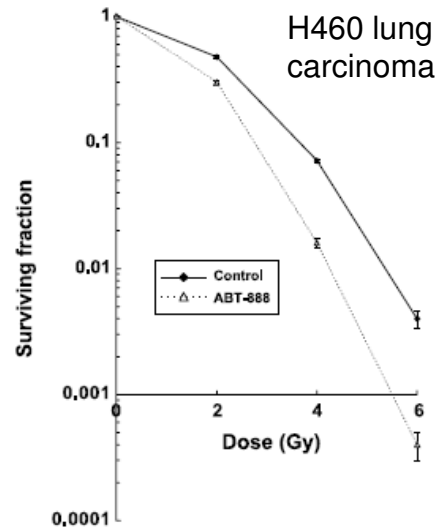
# Klinische Studien weltweit 2015: PARP1 inhibition

- **NIH clinical trials: PARP-Inhibitoren 122 Studien**
- **NIH clinical trials: PARPi plus Radiotherapie: 30 Studien**
  - **4 davon titeln mit Radiotherapie:**
    - **Lokal fortgeschrittenes Rektum**
    - **Rezidiv Mamma**
    - **Kopf/Hals**
    - **Nicht-operable bzw. multiple Hirnmetastasen**

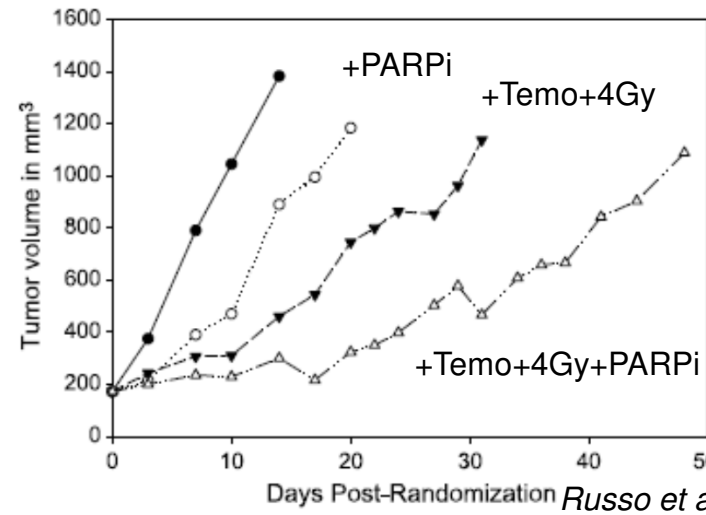
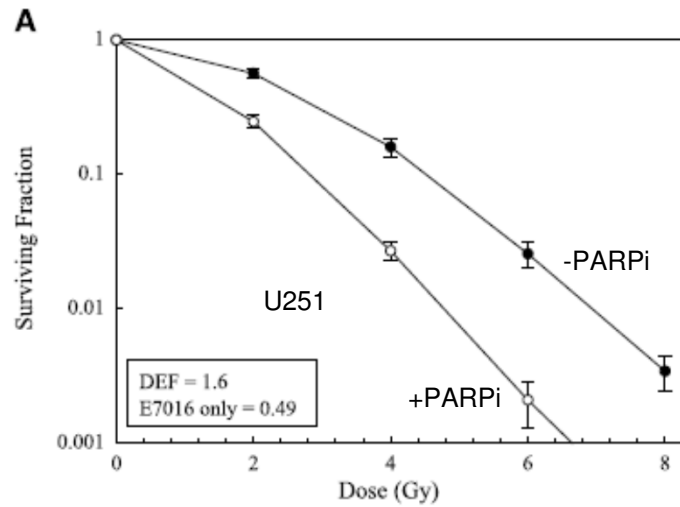
<https://clinicaltrials.gov/ct2/results/map/image?term=parp+inhibitor+and+radiotherapy>



## in vitro und in vivo beim Lungenkarzinom und beim Glioblastom

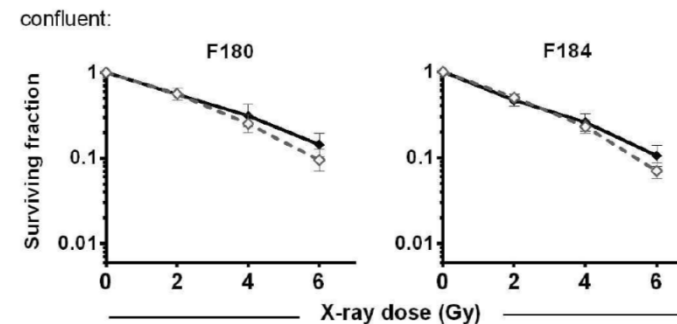
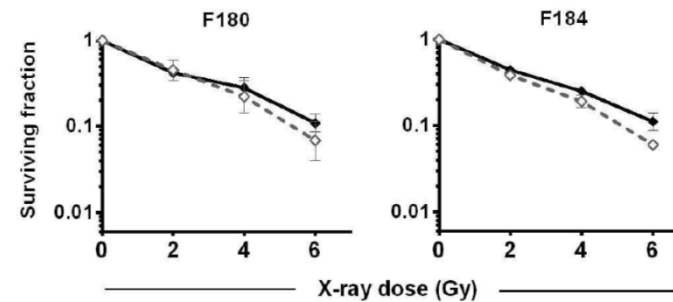
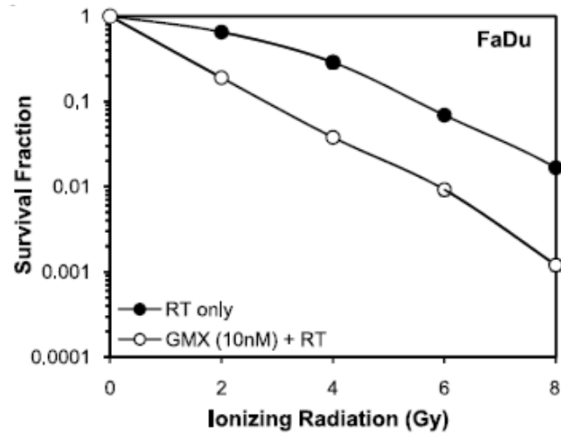


Albert et al. Clin Cancer Res. 2007

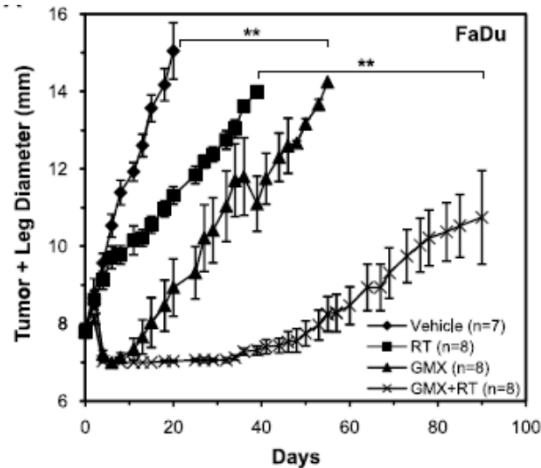


Russo et al. Clin Cancer Res. 2009

## PARP1 inhibition plus Bestrahlung sensitiviert in vitro und in vivo HNSCC; Normalgewebszellen dagegen nicht

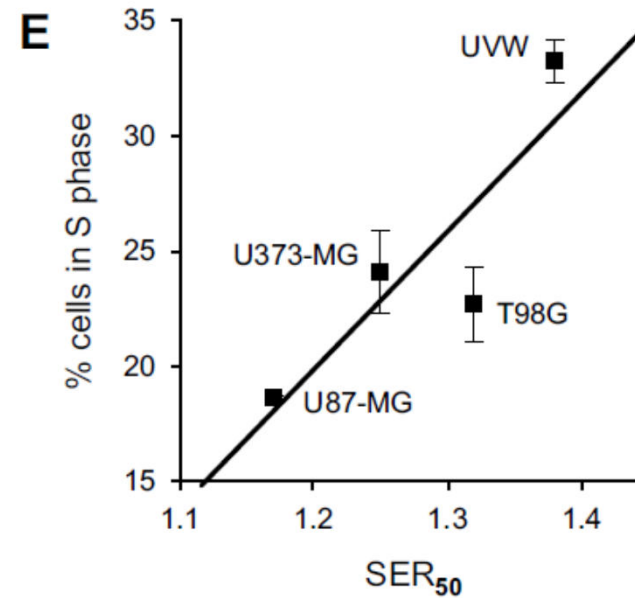
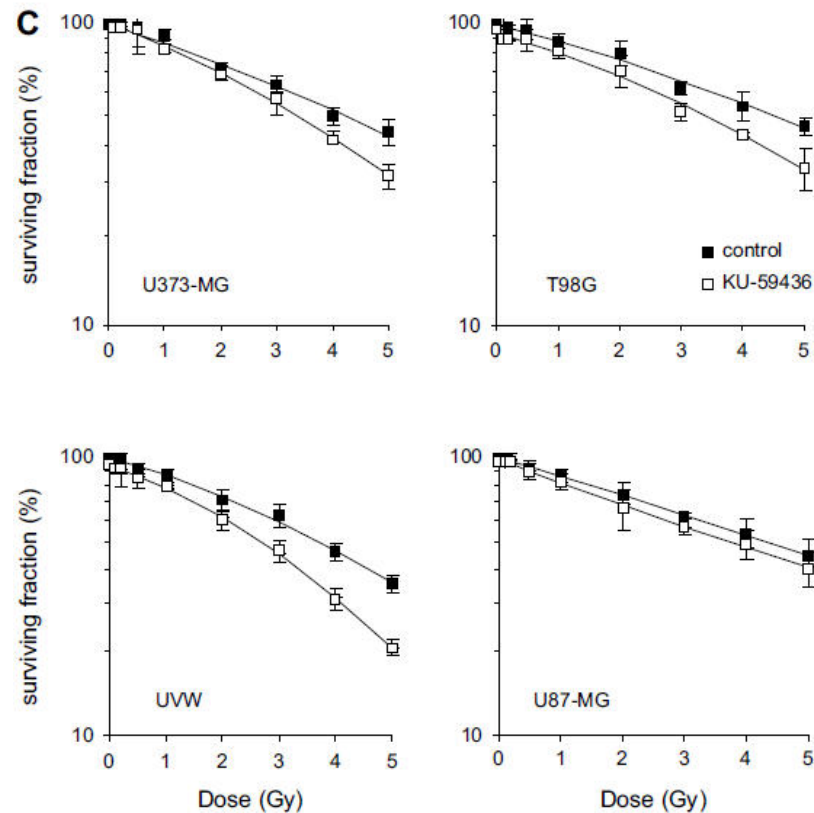


◆ DMSO ◇ Olaparib  
Güster et al., R&O 2014



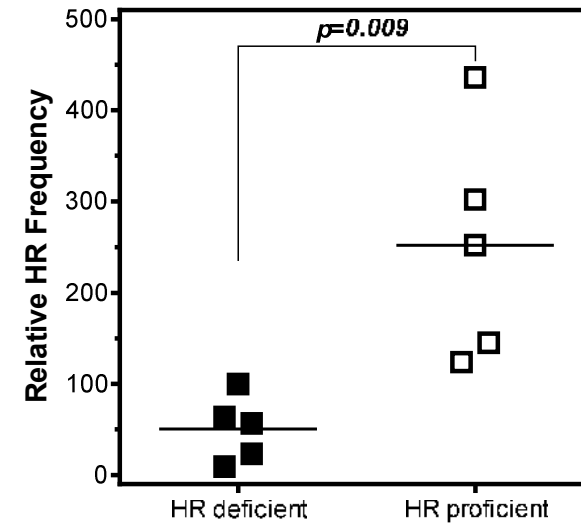
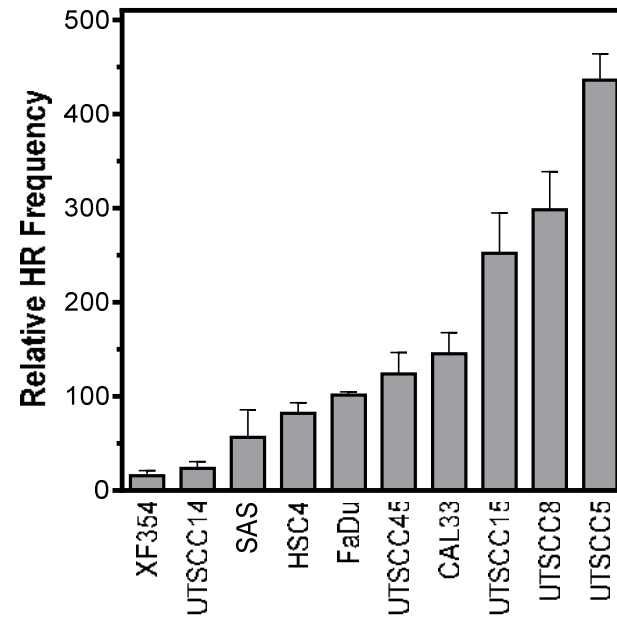
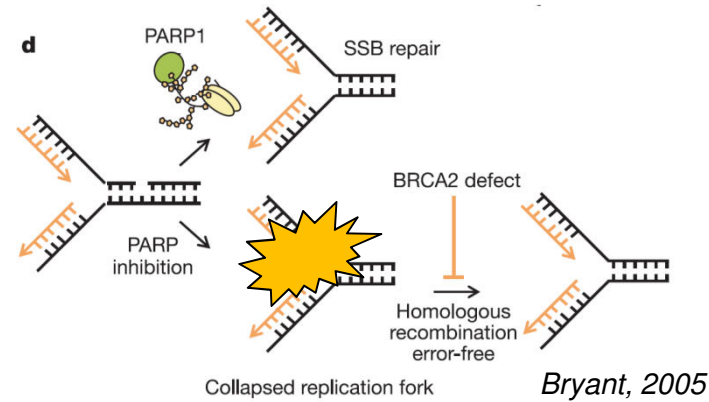
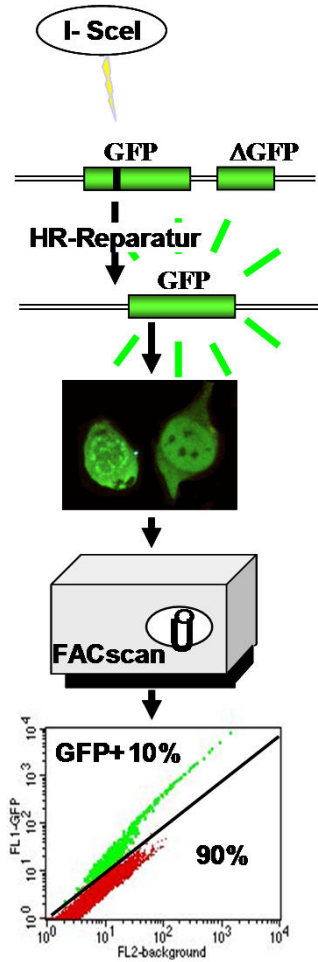
Kato et al. Clin Cancer Res. 2010

# Strahlensensitivierende Wirkung durch PARP1i ist abhängig vom Anteil der Zellen in der S-Phase?



Löser et al., *Int J Radiat Oncol.*, 2008

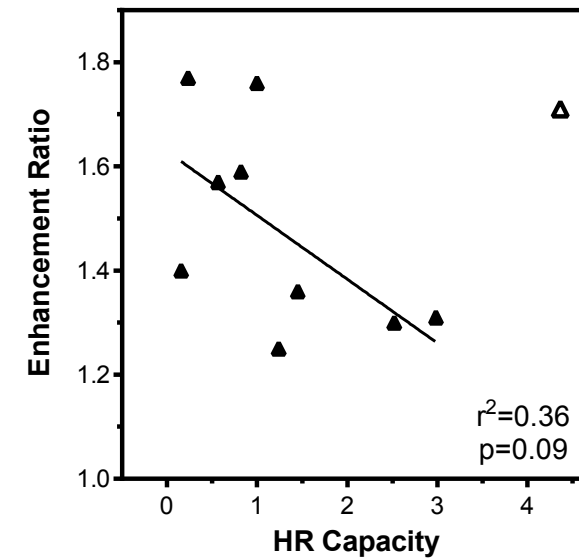
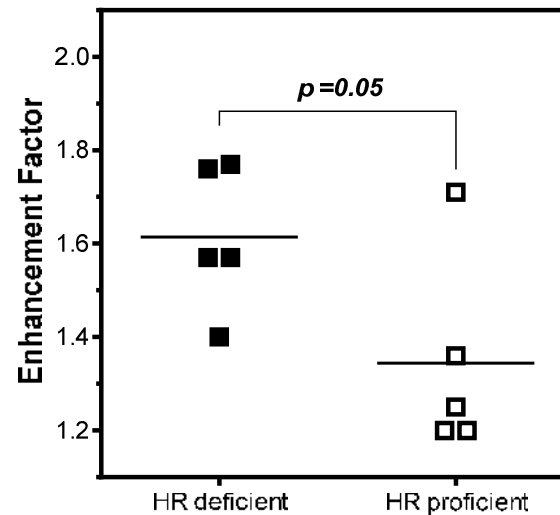
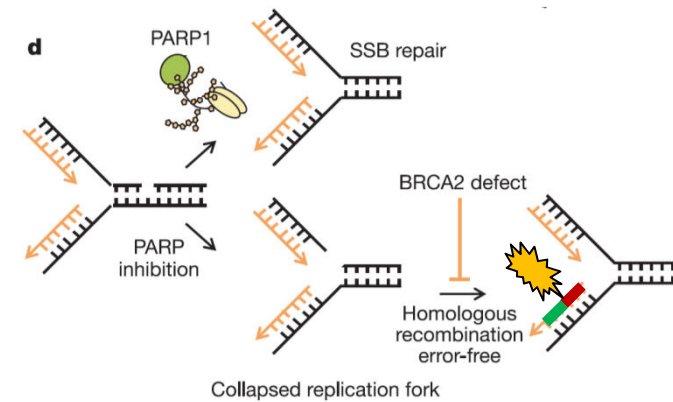
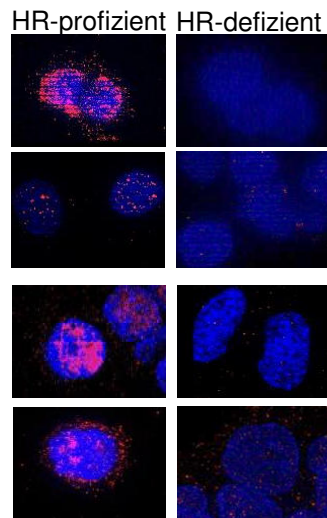
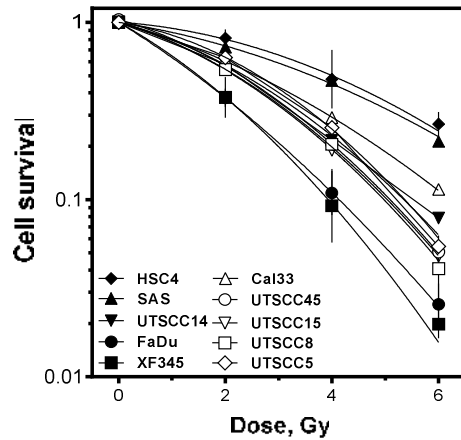
# Bedeutung der HR für die strahlensensitivierende PARP1i Wirkung? Charakterisierung HR-defizienter Zelllinien



Wurster and Hennes et al., 2016

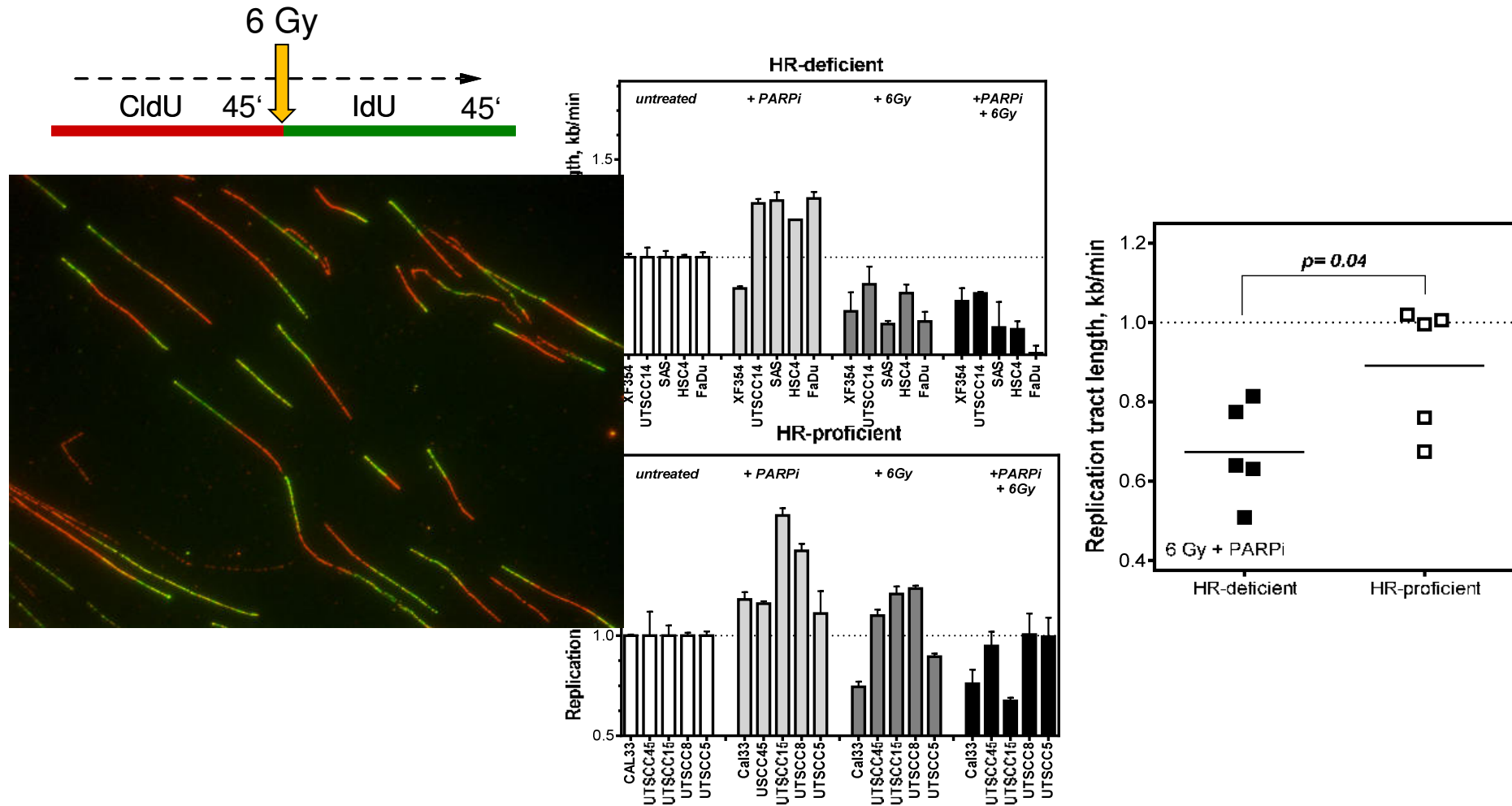


# Stärkere Strahlensensitivierung in HR-defizienten Tumoren



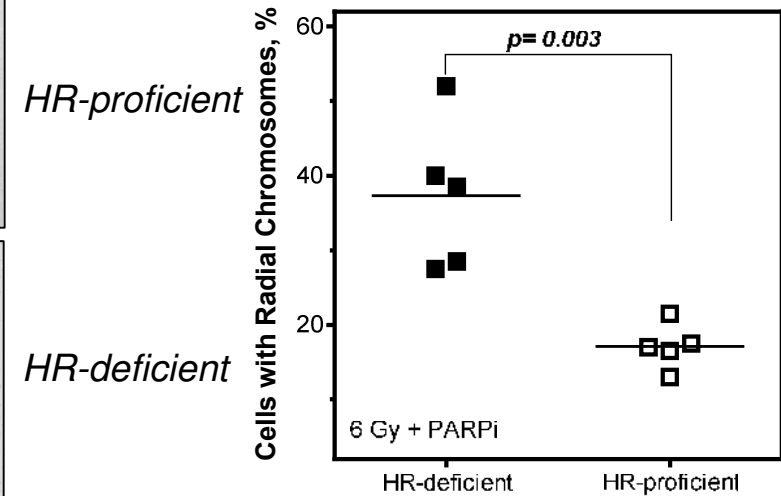
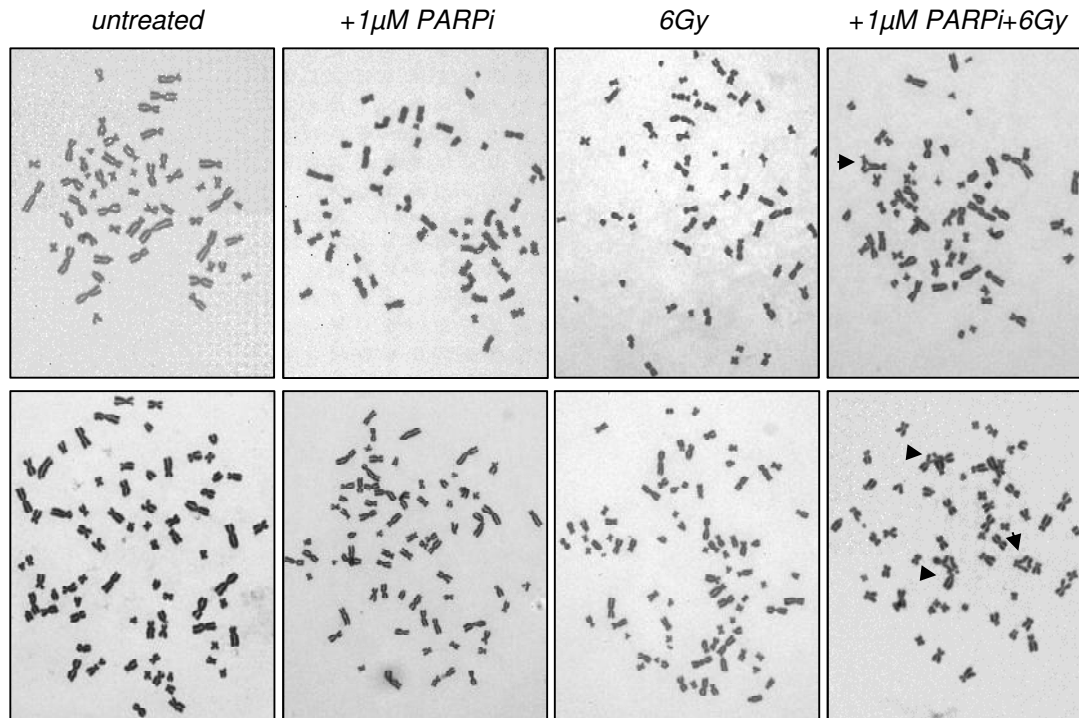
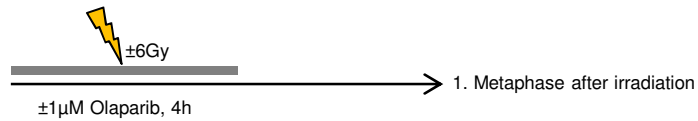
Wurster and Hennes et al., OncoTarget 2016

## Stärkere Effekt auf die DNA Replikation in HR defizienten Tumoren

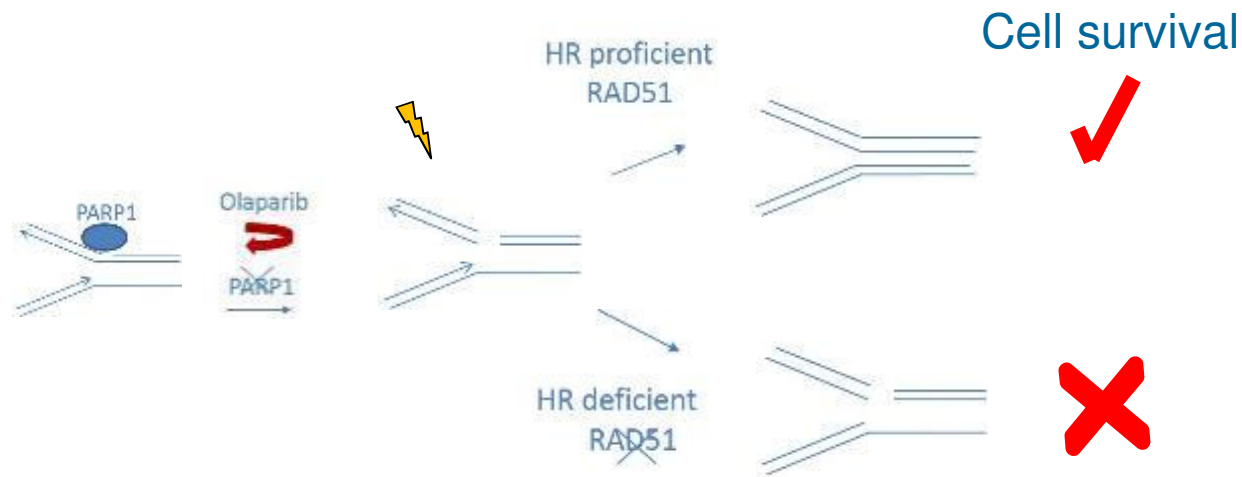
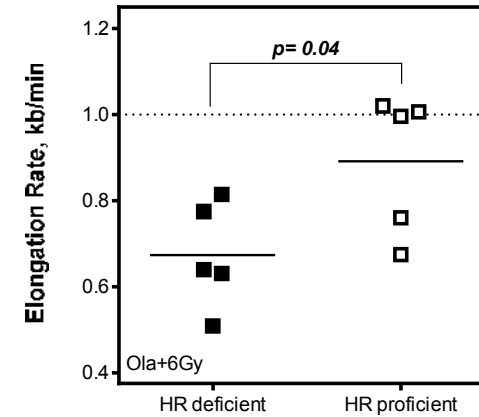
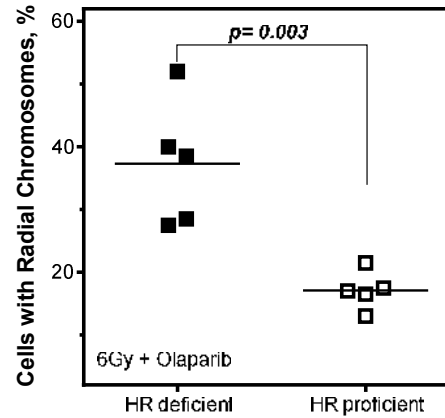
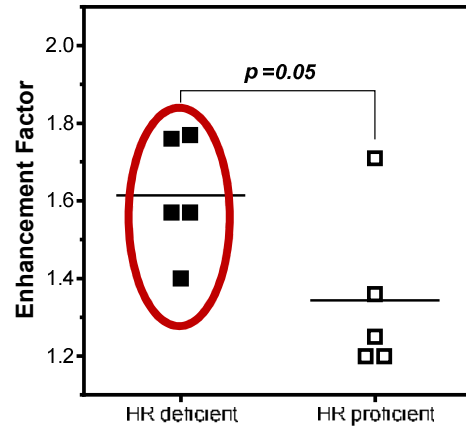


Wurster and Hennes et al., OncoTarget 2016

# Mehr radiale Chromosomen in HR-defizienten Tumoren nach Bestrahlung mit PARPi

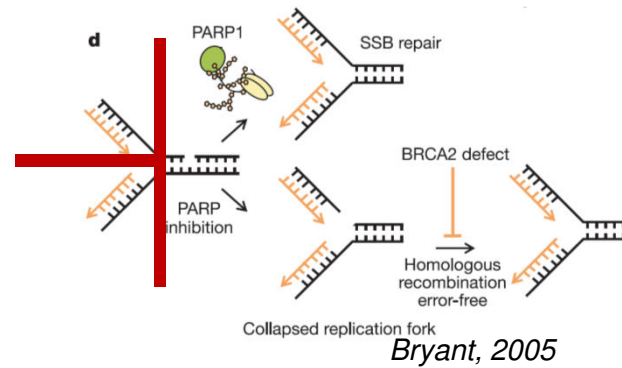
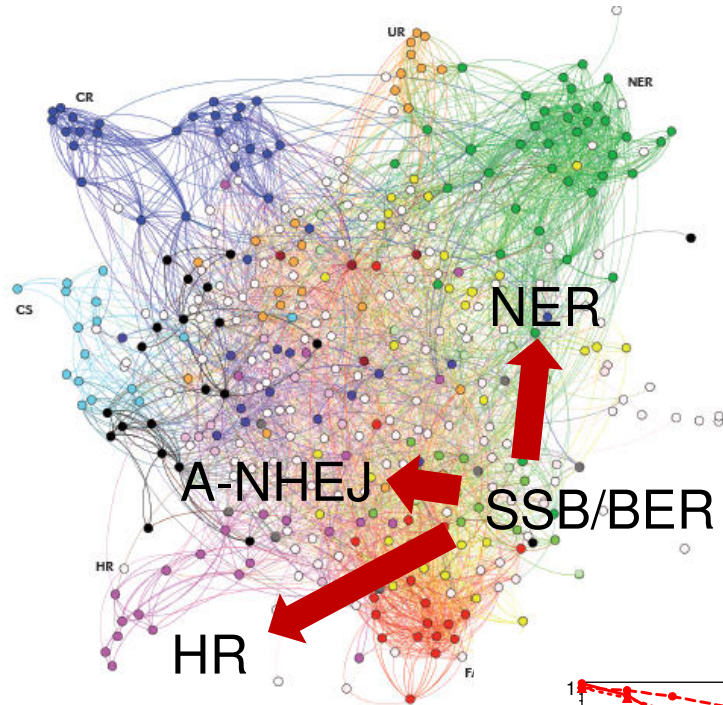


# PARPi abhängige Strahlensensitivierung in HR-defizienten Zellen erfolgt in Abhängigkeit der Replikation

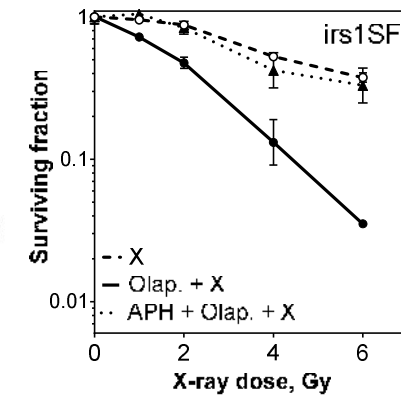


Wurster and Hennes et al., OncoTarget 2016

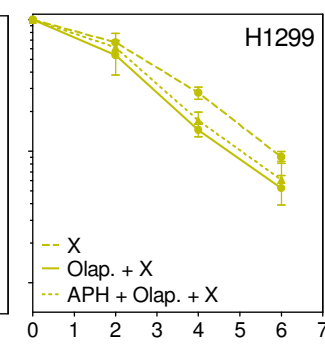
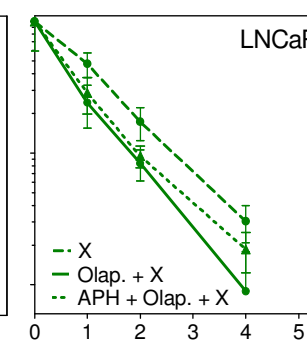
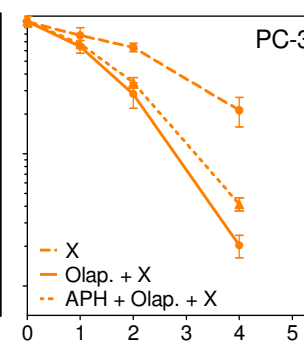
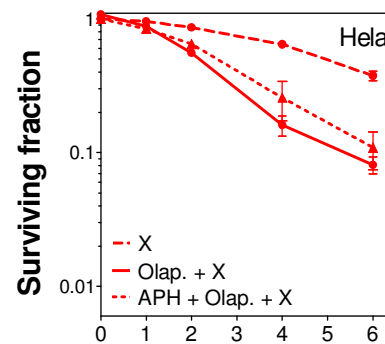
# PARP1 Inhibition ausschließlich wirksam in HR-defekten Zellen?



## HR-Defekt

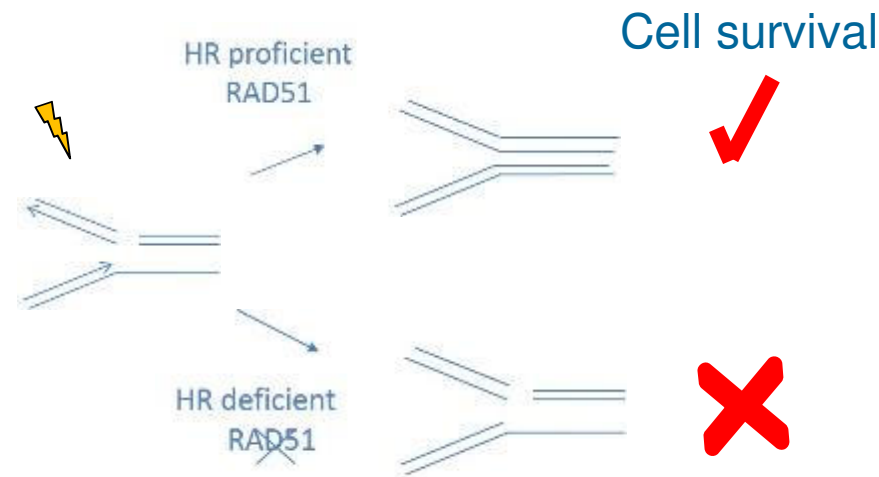
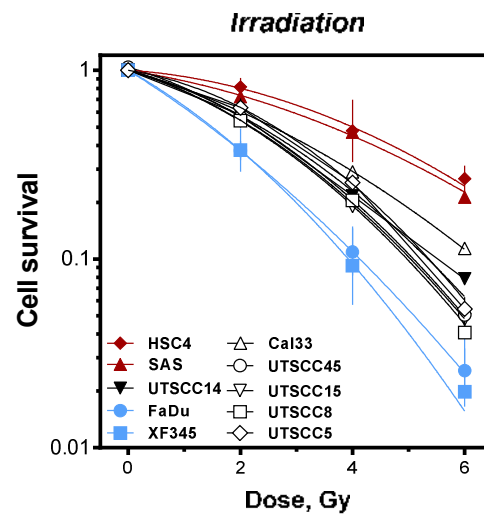
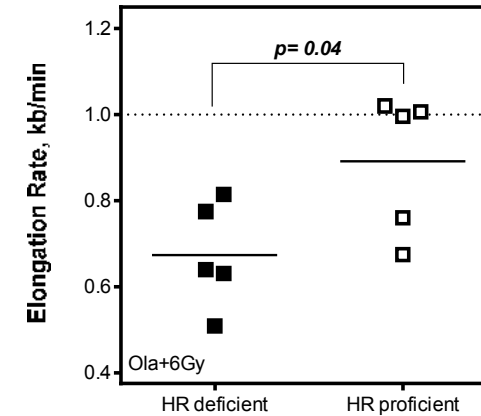
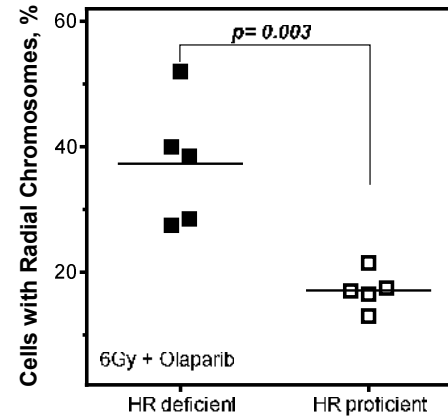
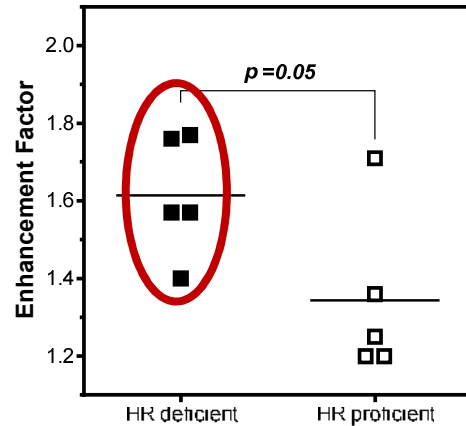


## Defekt im A-NHEJ/PARP1-EJ?



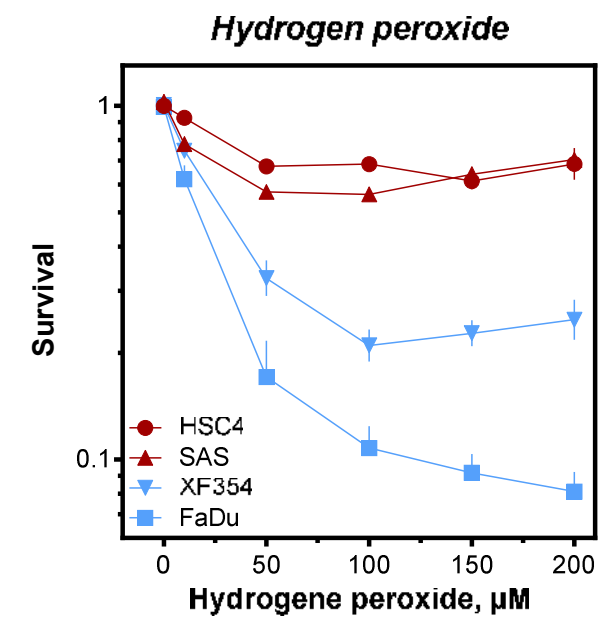
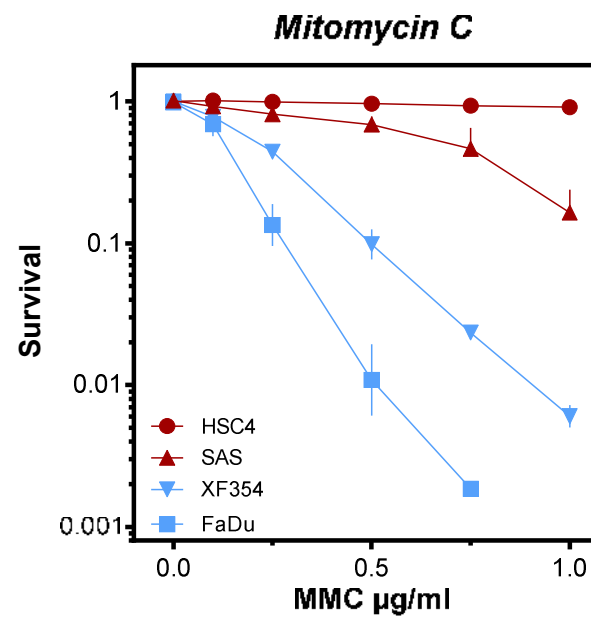
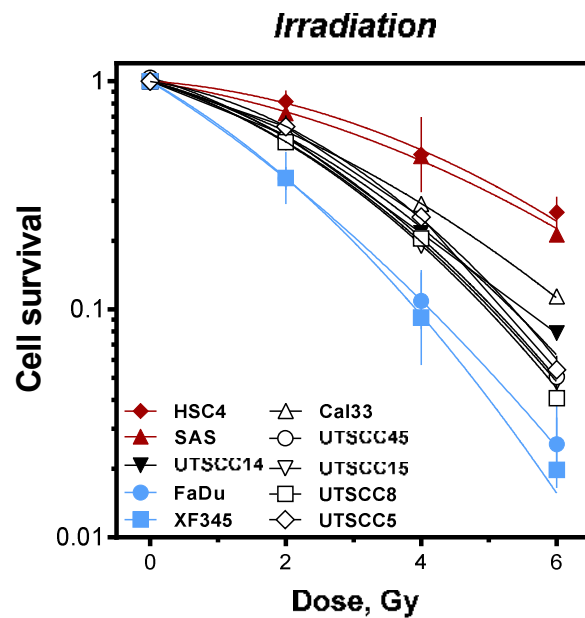


# PARPi abhängige Strahlensensitivierung in HR-defizienten Zellen erfolgt in Abhängigkeit der Replikation

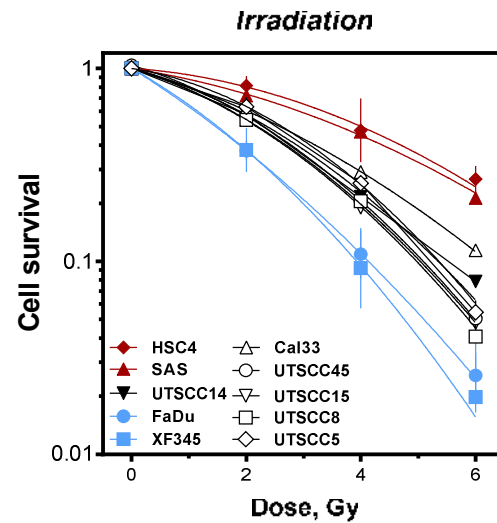
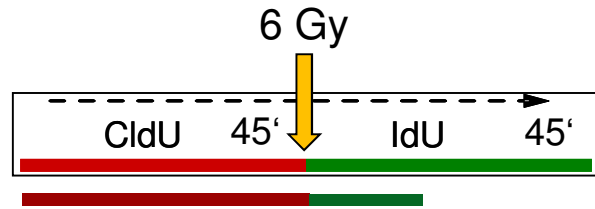


Wurster and Hennes et al., OncoTarget 2016

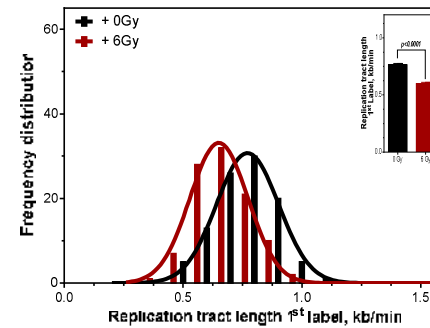
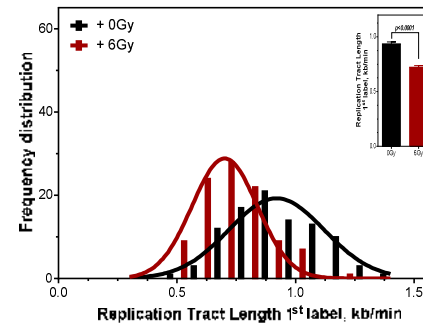
# Kein Einfluss des HR-Defektes auf die Strahlenempfindlichkeit?



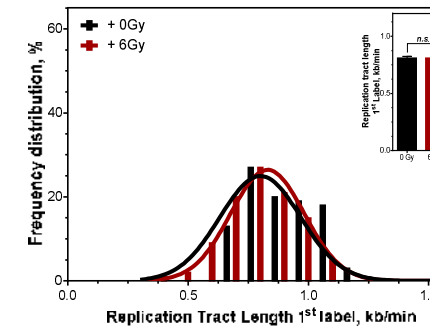
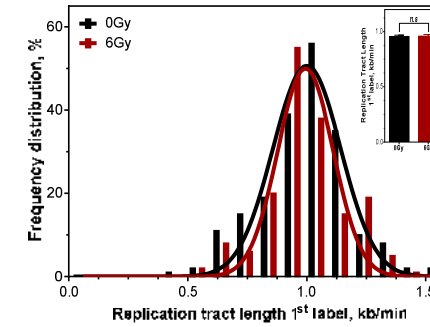
# Radioresistenz und Radiosensitivität in HNSCCs mit HR Defizienz



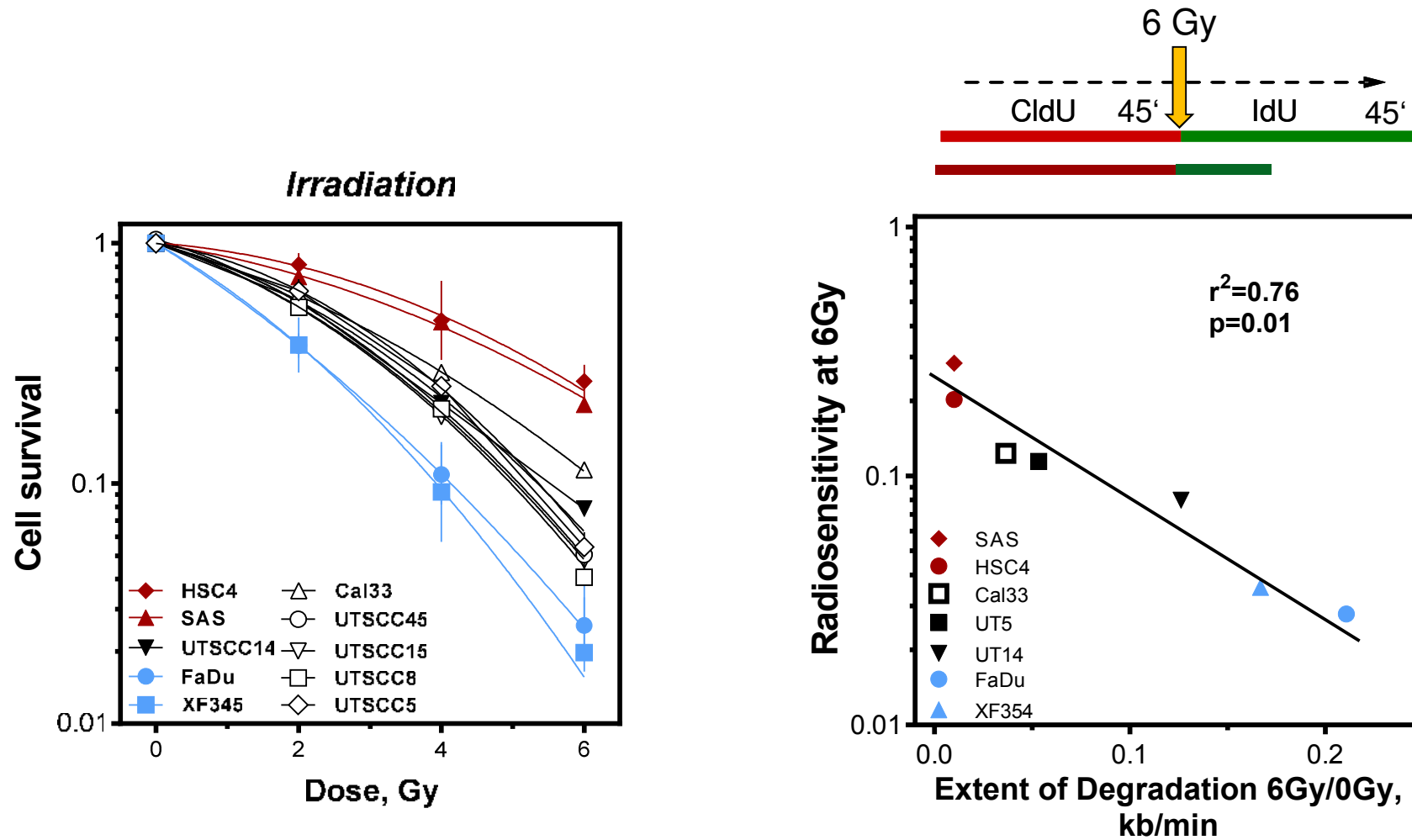
**radiosensitive**



**radioresistant**

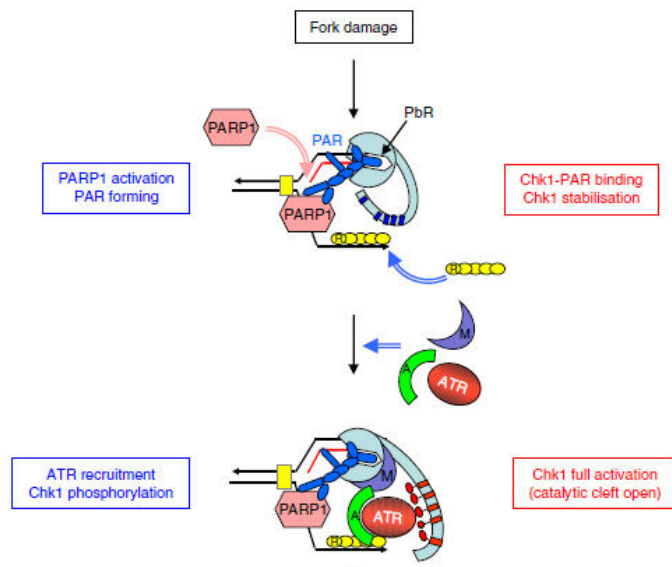


## Strahlenempfindlichkeit und Stabilität der Replikationsgabel



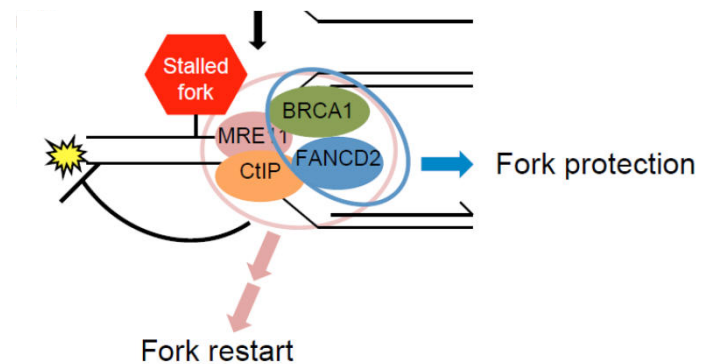
# Kandidaten für den Schutz von Replikationsgabeln: PARP1, CHK1 and MRE11

PARP1 und CHK1 Interaktion  
Zum Schutz von Replikationsgabeln



Min et al., Nat. comm. 2013

Ohne Schutz  
MRE11 Endonuklease degradiert den DNA Strang



Yeo et al., 2014



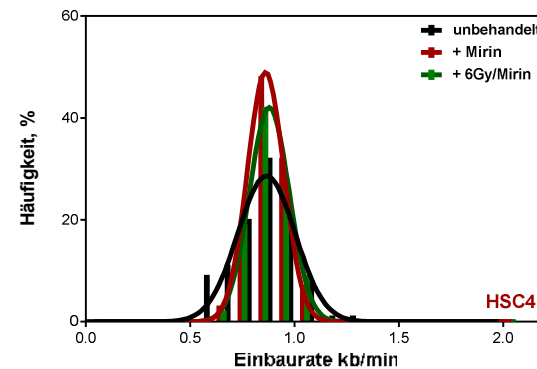
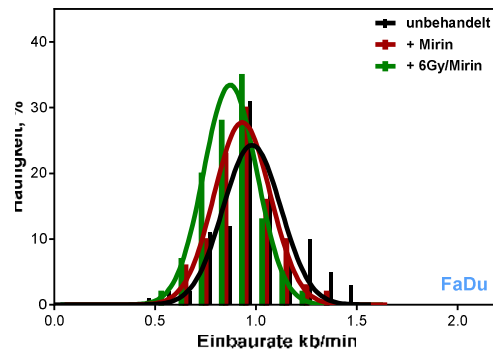
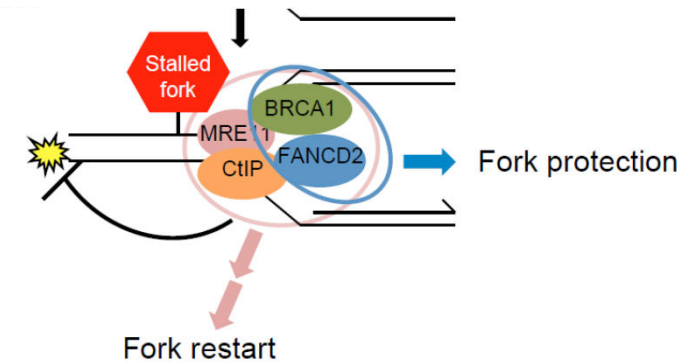
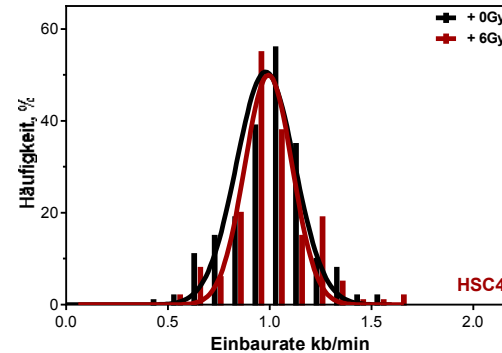
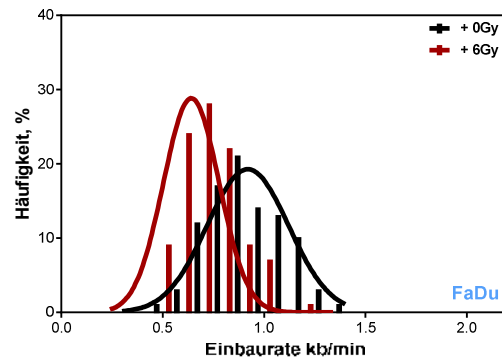
# MRE11 ist verantwortlich für die Degradation des neu synthetisierten DNA Strang

Inhibition von MRE11 schützt den DNA Strang nur in den radiosensitiven Zellen

Ohne Schutz degradiert MRE11 endonuklease den DNA Strang

*radiosensitive*

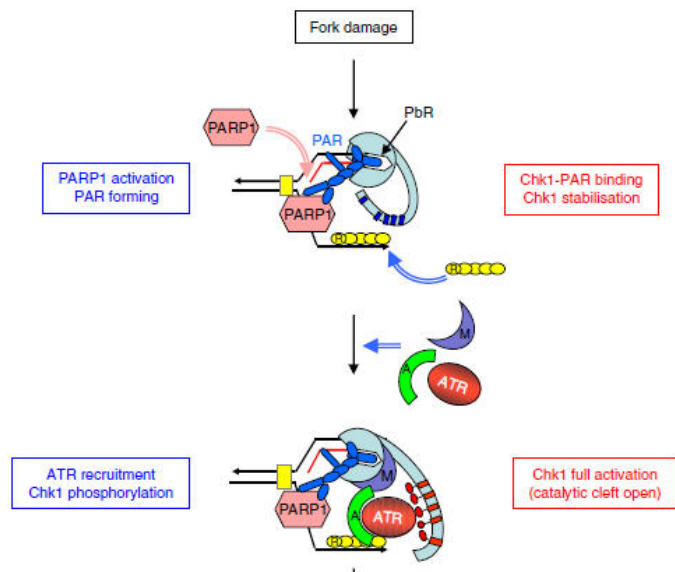
*radioresistant*



Yeo et al., 2014

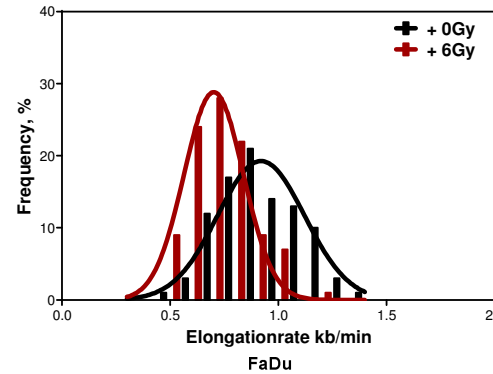
# CHK1 schützt den synthetisierten DNA Strang an Replikationsgabeln

PARP1 und CHK1 Interaktion zum Schutz von Replikationsgabeln

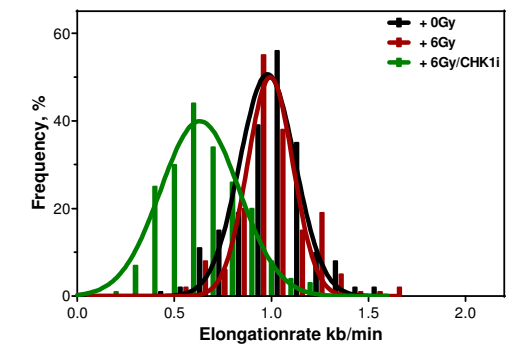
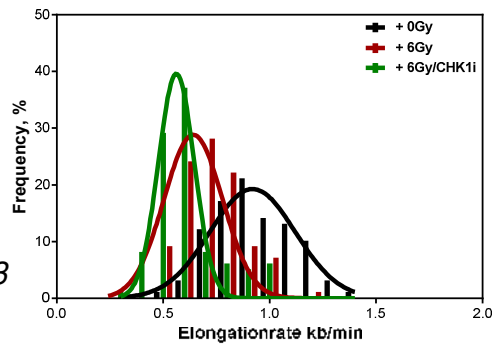
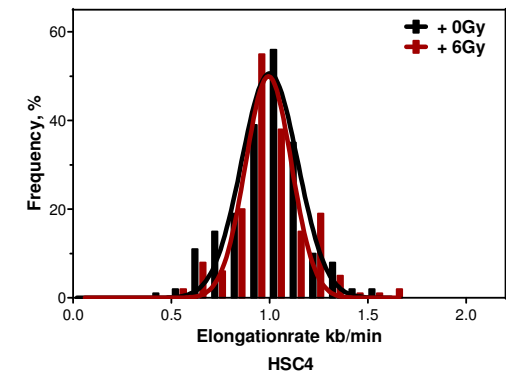


Min et al., Nat. comm. 2013

*radiosensitive*

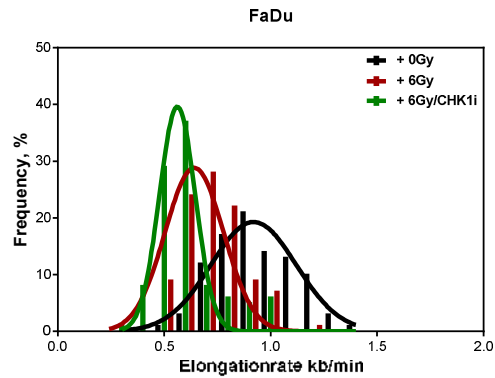


*radioresistant*

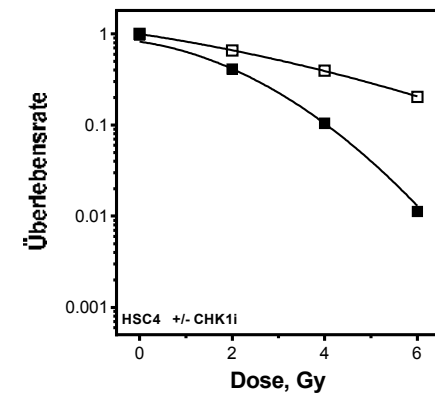
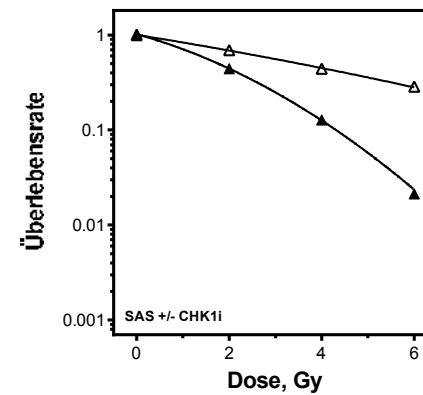
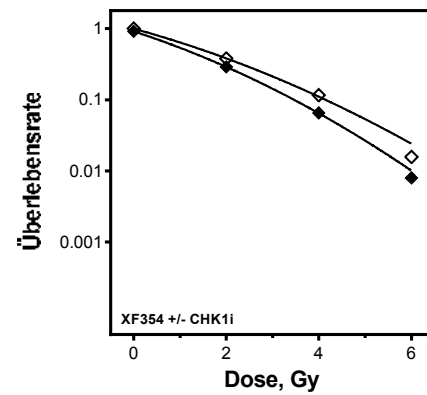
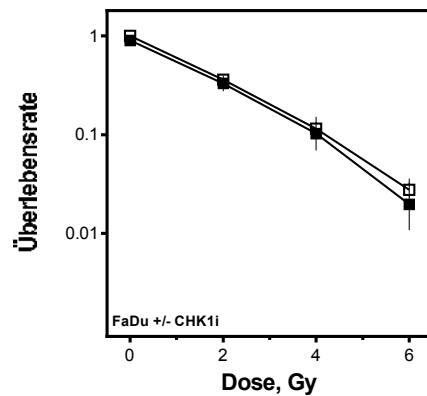
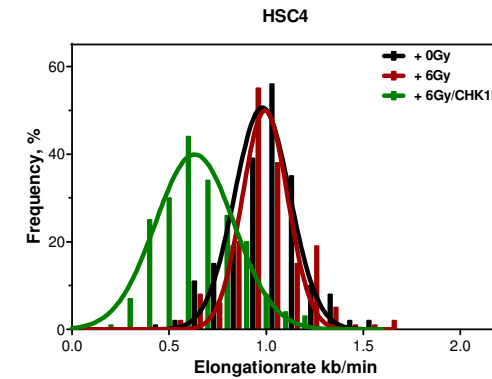


# Radiosensitivierung nach CHK1 Inhibition nur in den radioresistenten HNSCCs

*radiosensitive*

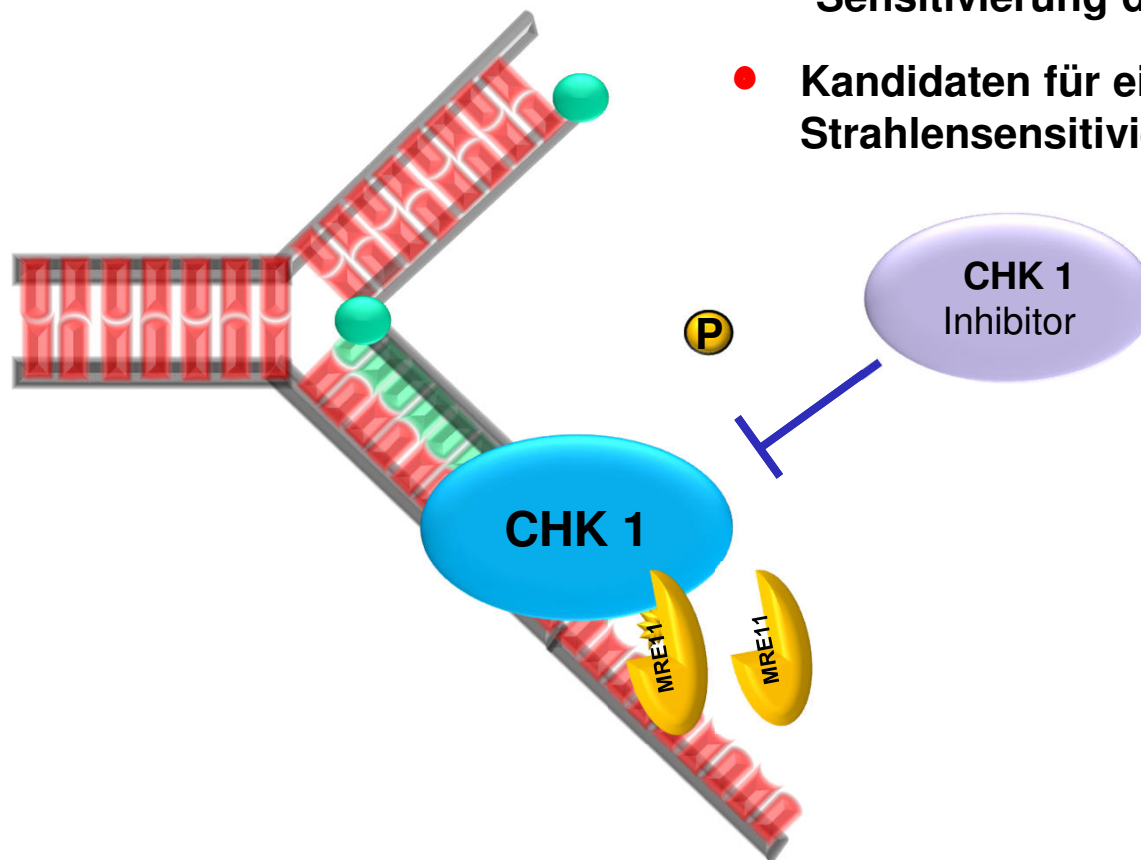


*radioresistant*

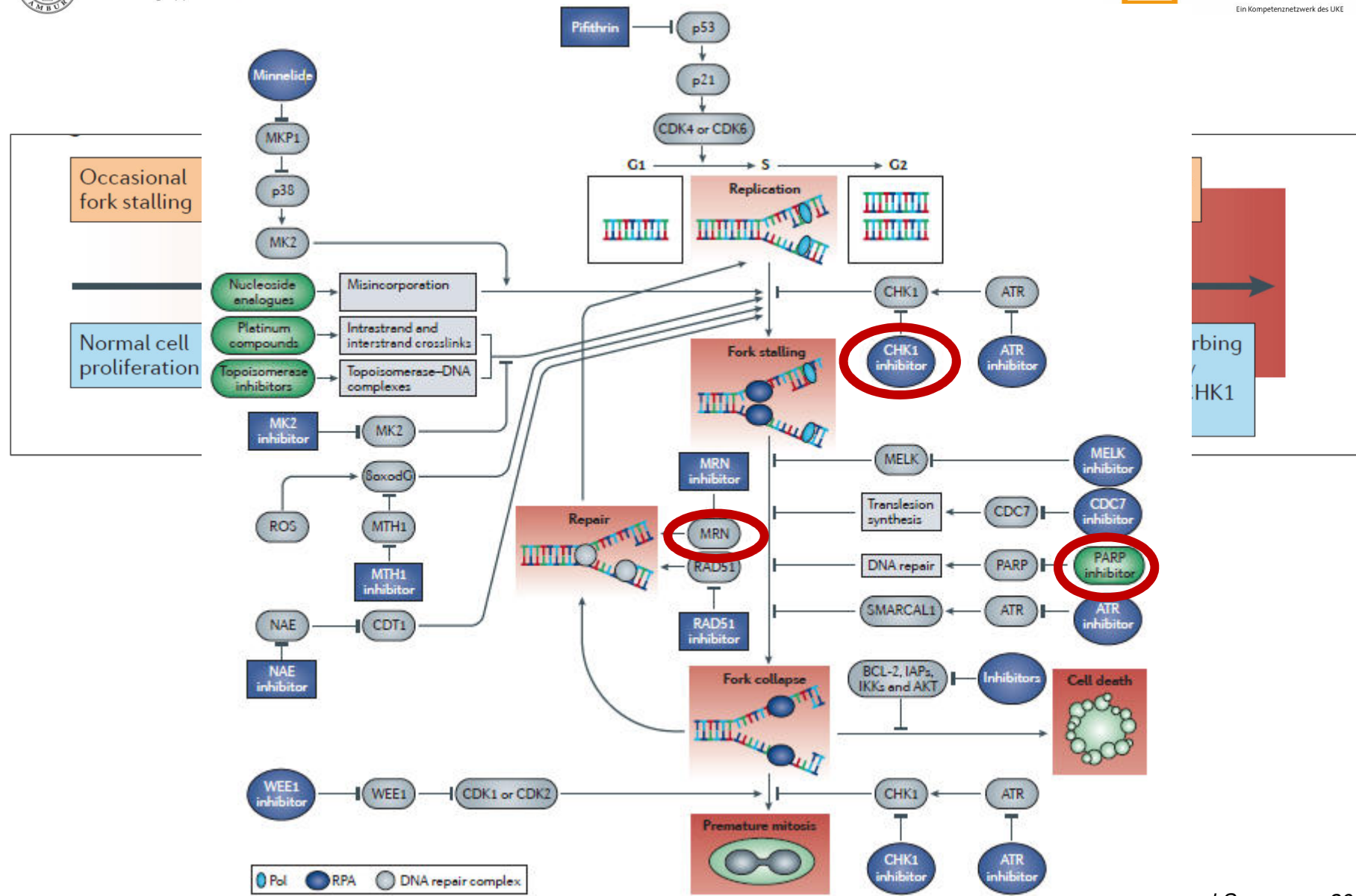


## Modell

**Resistent  
Cell lines**



- Keine Kandidaten für eine Chk1i Sensitivierung da bereits radiosensitiv
- Kandidaten für eine Chk1i zur Strahlensensitivierung

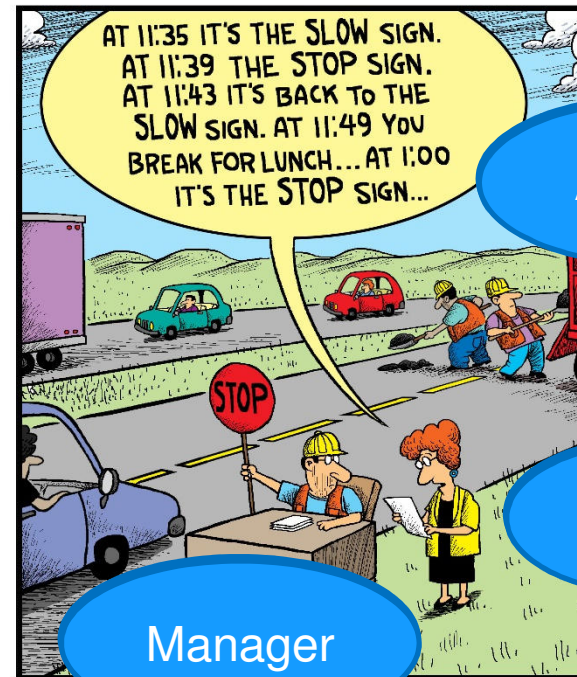


Loddestein and Sørensen, 2015



## DNA Reparatur für Einsteiger Zusammenfassung

- **Es braucht einen Boss!**
- DNA Schäden
- DNA REparaturprozesse: Es ist viel komplizierter als angenommen
- DNA Reparatur unter Replikation: Ein vielversprechendes Target zur Intensivierung der Tumorthherapie!
- Wie können wir diese Tumore identifizieren?



Arbeiter

Boss

Manager

# Funktionelle Assays sind notwendig um entsprechende Tumore zu identifizieren

Published OnlineFirst June 24, 2014; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0571

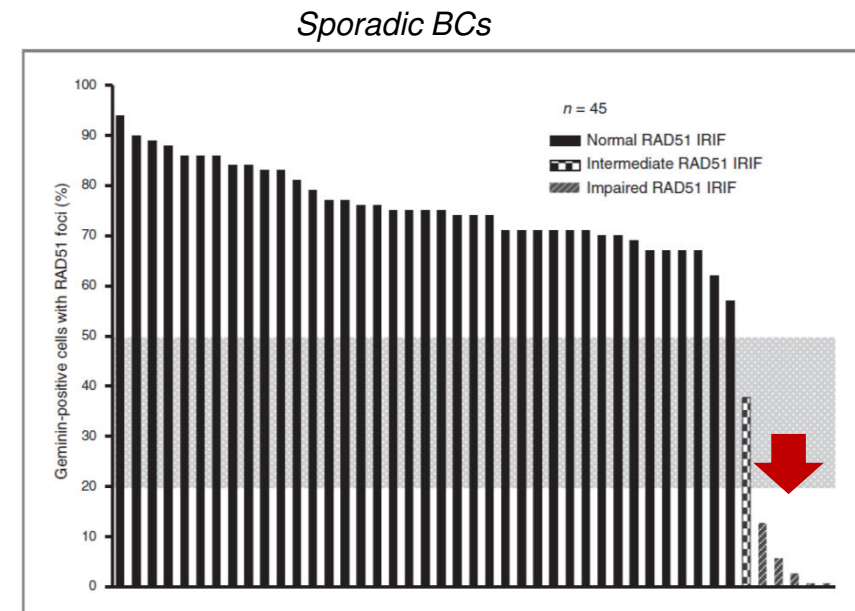
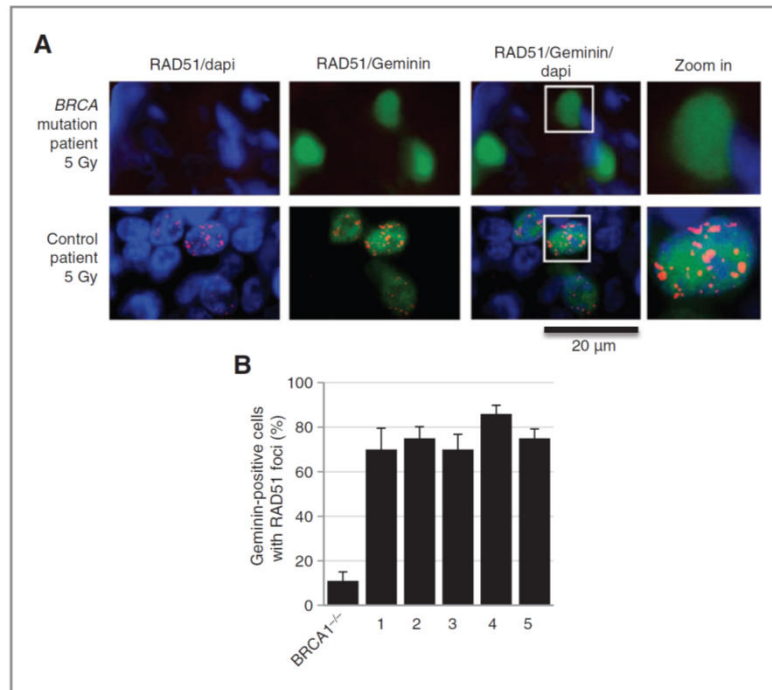
Personalized Medicine and Imaging

Clinical Cancer Research

**Functional Ex Vivo Assay to Select Homologous Recombination-Deficient Breast Tumors for PARP Inhibitor Treatment**

Kishan A.T. Naipal<sup>1</sup>, Nicole S. Verkaik<sup>1</sup>, Najim Ameziane<sup>2</sup>, Carolien H.M. van Deurzen<sup>3</sup>, Petra ter Brugge<sup>4</sup>, Matty Meijers<sup>5</sup>, Anieta M. Sieuwerts<sup>6</sup>, John W. Martens<sup>6</sup>, Mark J. O'Connor<sup>7</sup>, Harry Vrieling<sup>8</sup>, Jan H.J. Hoeijmakers<sup>1</sup>, Jos Jonkers<sup>4</sup>, Roland Kanaar<sup>1,8,9</sup>, Johan P. de Winter<sup>2,1</sup>, Maaïke P. Vreeswijk<sup>5,10</sup>, Agnes Jager<sup>1</sup>, and Dik C. van Gent<sup>1</sup>

- Fünf Tumore mit geringer RAD51 Focibildung
  - BRCA Modifikationen, Methylierung/Mutationen
  - 3 von 5 TNBCs
- Schlussfolgerung: 10% der sporadischen BCs sind Kandidaten für PARPi-Therapie



# PARP1i relevant für andere Tumorentitäten?

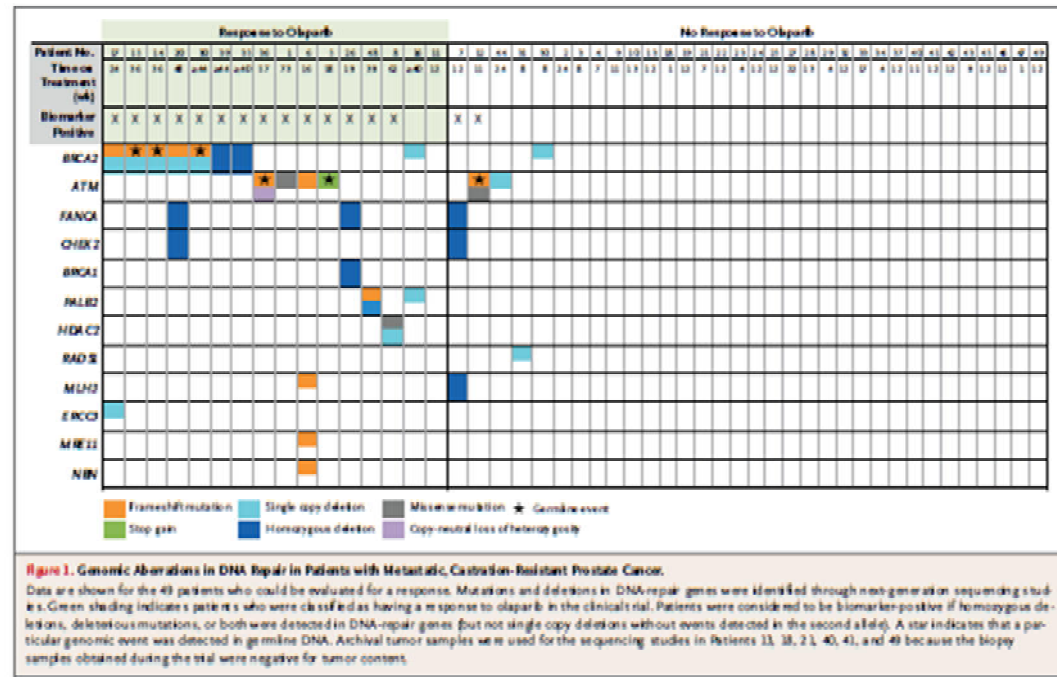
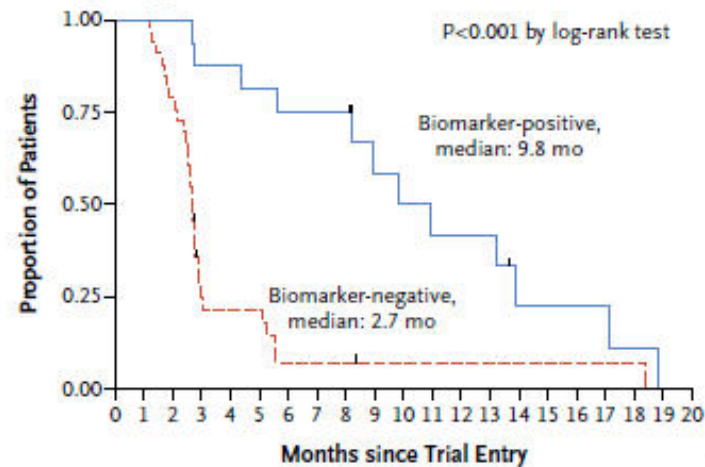


## DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer

J. Mateo, S. Carreira, S. Sandhu, S. Miranda, H. Mossop, R. Perez-Lopez, D. Nava Rodrigues, D. Robinson, A. Omlin, N. Tunariu, G. Boysen, N. Porta, P. Flohr, A. Gillman, I. Figueiredo, C. Paulding, G. Seed, S. Jain, C. Ralph, A. Protheroe, S. Hussain, R. Jones, T. Elliott, U. McGovern, D. Bianchini, J. Goodall, Z. Zafeiriou, C.T. Williamson, R. Ferraldeschi, R. Riisnaes, B. Ebbs, G. Fowler, D. Roda, W. Yuan, Y.-M. Wu, X. Cao, R. Brough, H. Pemberton, R. A'Hern, A. Swain, L.P. Kunju, R. Eeles, G. Attard, C.J. Lord, A. Ashworth, M.A. Rubin, K.E. Knudsen, F.Y. Feng, A.M. Chinnaiyan, E. Hall, and J.S. de Bono

### ABSTRACT

### A Radiologic Progression-free Survival

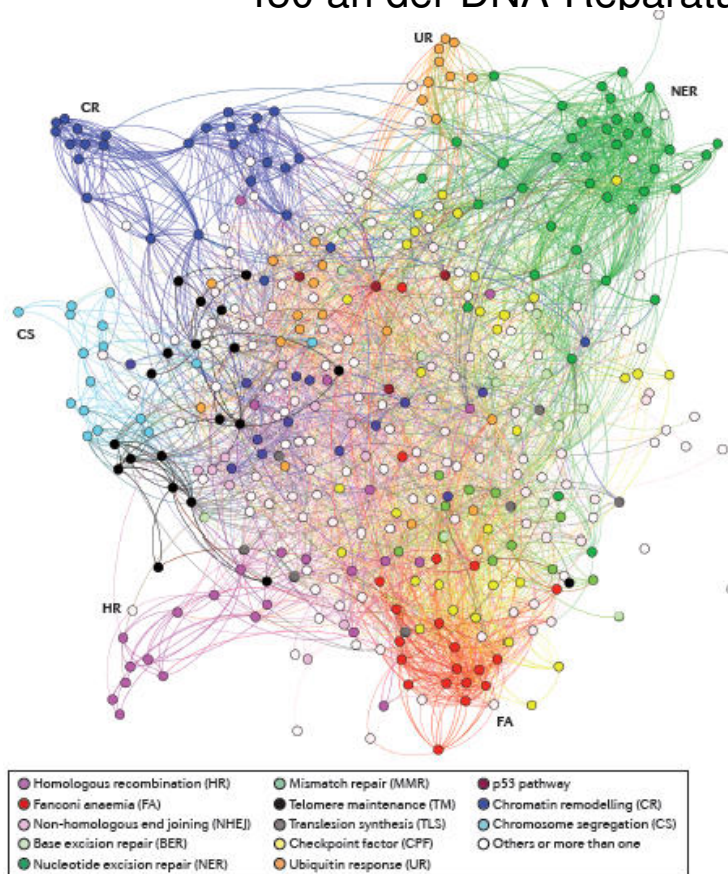


# Therapeutic opportunities within the DNA damage response

| MARCH 2015 | VOLUME 15

[www.nature.com/reviews/cancer](http://www.nature.com/reviews/cancer)

450 an der DNA-Reparatur beteiligter Gene



- **Für welchen Tumor PARP1i sinnvoll?**
  - Tumore mit einem Defekt in HR oder PARP-EJ
- **Konzept Synthetic lethality**
  - Attraktives Konzept für das es viele potentielle Kandidaten-Paare gibt
- **Bedeutung von Bestrahlung in diesem Konzept?**
  - Unterschätzt, da eine synthetisch letale Situation potenziert werden kann
- **Data: vielfältig vorhanden**
- **Wie identifizieren wir Subgruppen für solch eine Therapie?**
  - Funktionelle Biomarker





# Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!



Ann Parplys  
 Felix Meyer  
 Alexandra Zielinski  
 Britta Riepen  
 Katinka Matthes  
 Saskia Becker  
 Patrick Dinkelborg  
 Theo Bold  
 Helene Dikomey  
 Ann-Kathrin Specht  
 Stephanie Wurster  
 Fabian Hennes  
 Jonas Willmann  
 Philip Dreistatt  
 Johanna Rieckhoff

[borgmann@uke.de](mailto:borgmann@uke.de)



Goy/Krüll/Steffens/Müller/Witzel/  
 Petersen, UKE Hamburg  
 Tennstedt, UKE Hamburg  
 Wikman/Windhorst, UKE Hamburg  
 Kubisch, UKE Hamburg

Nils Cordes, Oncoray, Dresden  
 Helmut Pospiech, Jena/Oulu  
 Frank Grosse, Jena  
 Anna Friedl, München  
 HW Stürzbecher, Lübeck

Conchita Vens, NKI Amsterdam  
 Netherlands  
 Robbi Winqvist, Oulu Finland  
 Henning Willers, Boston, USA

SPONSORED BY THE



Federal Ministry  
of Education  
and Research

WERNER OTTO STIFTUNG  
STIFTUNG DES BÜRGERLICHEN RECHTS



Hubertus Wald Tumorzentrum  
Universitäres Cancer Center Hamburg

Ein Kompetenznetzwerk des UKE



**KVSF**  
Kompetenzverbund  
Strahlenforschung