

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III im Klinikum Großhadern  
der Ludwig-Maximilian-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. M. von Bergwelt

---

# **Untersuchung der Kombination von HSP 90 Inhibition mit Hyperthermie an Sarkomzellen in vitro**

---

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

*vorgelegt von*  
Sigrid Coto Rodas  
aus Biberach an der Riß  
2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

*Berichterstatter:* Prof. Dr. med Dipl.-Biochem. Rolf D. Issels

*Mitberichterstatter:* Prof. Dr. med. Hans Roland Dürr

Prof Dr. Heiko Hermeking

*Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:* Dr. med Eric Kampmann

*Dekan:* Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2022

# 1. Inhalt

<b>1. Inhalt</b>	<b>3</b>
<b>2. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>3. Tabellenverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>4. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>9</b>
<b>5. Einleitung</b>	<b>12</b>
<b>5.1. Zelluläre Stressreaktion nach Hitze</b>	<b>12</b>
<b>5.2. Heat-Shock-Response und Hitzeschockproteine</b>	<b>13</b>
<b>5.3. Hitzeschockprotein 90</b>	<b>14</b>
<b>5.4. Der AKT-mTOR-Signalweg</b>	<b>17</b>
<b>5.5. Der MAP-Kinase-Signalweg</b>	<b>18</b>
<b>5.6. HSP 90-Inhibitoren</b>	<b>19</b>
5.6.1. 17-AAG	20
5.6.2. CCT018159	20
5.6.3. PU-H71	21
<b>5.7. Hyperthermie</b>	<b>22</b>
<b>5.8. Klinische Hyperthermie</b>	<b>22</b>
<b>5.9. Sarkome</b>	<b>25</b>
<b>5.10. Targeted therapy bei Sarkomen</b>	<b>28</b>
<b>6. Zielsetzung</b>	<b>30</b>
<b>7. Material und Methoden</b>	<b>31</b>
<b>7.1. Zellbiologische Arbeitstechniken</b>	<b>31</b>
7.1.1. Allgemeine Zellkulturbedingungen	31
7.1.2. Zellkultivierung, Zellsplitting und Zellzahlbestimmung	35
7.1.3. Mykoplasmentest	36
7.1.4. Kryokonservierung	36
<b>7.2. Hitzeschock</b>	<b>36</b>
<b>7.3. HSP 90-Inhibitoren</b>	<b>37</b>
7.3.1. 17-AAG	37
7.3.2. CCT018159	37
7.3.3. PU-H71	37

<b>7.4. WST-Viabilitätsassay</b>	<b>37</b>
7.4.1. Vorversuch Bestimmung der optischen Dichte definierter Zellzahlen pro Well	37
7.4.2. Vorversuche Medikamentenkonzentration des WST-Viabilitätsassays	38
7.4.3. Ablauf des WST-Viabilitätsassays	39
7.4.4. Auswertung des Viabilitätsassays	39
<b>7.5. Klonogener Assay</b>	<b>40</b>
7.5.1. Vorversuch DMSO und unbehandelte Kontrolle	40
7.5.2. Ablauf des klonogenen Assays	40
7.5.3. Auswertung des klonogenen Assays	41
<b>7.6. WST-Proliferationsassay</b>	<b>42</b>
7.6.1. Vorversuch Bestimmung der optischen Dichte definierter Zellzahlen pro well	42
7.6.2. Vorversuch Medikamentenkonzentration des WST-Proliferationsassays	42
7.6.3. Vorversuch DMSO und unbehandelte Kontrolle	43
7.6.4. Ablauf des WST-Proliferationsassays	44
7.6.5. Auswertung des WST-Proliferationsassays	44
<b>7.7. Western Blot</b>	<b>45</b>
7.7.1 Vorbehandlung der Zellen	45
7.7.2. Proteinisolation und -Messung:	45
7.7.3. Western Blot	46
7.7.4. Auswertung des Western Blots	48
<b>8. Ergebnisse</b>	<b>49</b>
<b>8.1. Dynamik der Hitzeschockproteine</b>	<b>49</b>
8.1.1. HSP 90	49
8.1.2. HSP 70	51
8.1.3. HSC 70	51
8.1.4. HSP 27	53
<b>8.2. WST Viabilitätsassay</b>	<b>54</b>
8.2.1. Vorversuch: Bestimmung der optischen Dichte der einzusetzenden Zellzahl pro well	54
8.2.2. Vorversuch Medikamentenkonzentrationen	55
8.2.2.1. 17-AAG	55
8.2.2.2. CCT018159	57
8.2.2.3. PU-H71	57
8.2.3. Kombination von klinisch relevantem Hitzeschock und HSP 90-Inhibitor	58
8.2.3.1. 17-AAG	58
8.2.3.2. CCT018159	61
8.2.3.3. PU-H71	62
<b>8.3. Klonogener Assay</b>	<b>63</b>

8.3.1. Kombination von klinisch relevantem Hitzeschock und HSP 90 Inhibitor	63
8.3.1.1. CCT018159	64
8.3.1.2. PU-H71	64
<b>8.4. WST Proliferationsassay</b>	<b>66</b>
8.4.1. Vorversuch: Bestimmung der optischen Dichte der einzusetzenden Zellzahl pro Well	66
8.4.2. Kombination klinisch relevanter Hitzeschock und HSP 90-Inhibitor	67
8.4.2.1. 17-AAG	68
8.4.2.2. CCT018159	68
8.4.2.3. PU-H71	70
<b>8.5. Untersuchung des AKT-Signalweges und des MAP-Kinase-Signalweges</b>	<b>71</b>
8.5.1. Pser- AKT / AKT- pan	71
8.5.2. PThreo- AKT / AKT- pan	72
8.5.3. P- mTOR / mTOR	73
8.5.4. P- ERK / ERK	74
<b>9. Diskussion</b>	<b>76</b>
<b>9.1. Dynamik der Expression verschiedener Hitzeschockproteine nach Hitzeschock</b>	<b>76</b>
<b>9.2. Kombinationsversuche - Viabilität, Klonogenes Überleben und Proliferation nach Kombinationsbehandlung von klinisch relevantem Hitzeschock und HSP 90-Inhibitor</b>	<b>77</b>
9.2.1. Viabilität von Sarkomzellen nach der Kombinationsbehandlungen mit HSP 90 Inhibition und Hitze	78
9.2.2. Klonogene Aktivität von Sarkomzellen nach der Kombinationsbehandlungen mit HSP 90 Inhibition und Hitze	79
9.2.3. Proliferation von Sarkomzellen nach Kombinationsbehandlung mit Hitze und HSP 90 Inhibition	81
9.2.4. Diskussion der Ergebnisse der HSP 90 Inhibition	83
9.2.5. Diskussion der Ergebnisse der Kombinationsbehandlungen	85
9.2.5. Vergleich der Methoden Viabilitätsassay- klonogener Assay-Proliferationsassay	87
<b>9.3. Untersuchung verschiedener Signaltransduktionswege (AKT-mTor und MAP-Kinase) unter HSP 90 Inhibition</b>	<b>88</b>
<b>10. Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>91</b>
<b>11. Literatur</b>	<b>94</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Ablauf des Viabilitätsassays.....	39
<b>Abbildung 2:</b> Ablauf des klonogenen Assays .....	41
<b>Abbildung 3:</b> Ablauf des Proliferationsassays.....	44
<b>Abbildung 4:</b> Hitzeschockprotein 90 (HSP 90AA und HSP90 AB) der drei Zelllinien MRC-5 (Fibroblasten), SKUT-1 (Leiomyosarkom) und SW872 (Liposarkom).....	49
<b>Abbildung 5:</b> Hitzeschockprotein 70 der drei Zelllinien MRC-5 (Fibroblasten), SKUT-1 (Leiomyosarkom) und SW872 (Liposarkom).....	51
<b>Abbildung 6:</b> HSC 70 der drei Zelllinien MRC-5 (Fibroblasten), SKUT-1 (Leiomyosarkom) und SW872 (Liposarkom).....	52
<b>Abbildung 7:</b> Hitzeschockprotein 27 der drei Zelllinien MRC-5 (Fibroblasten), SKUT-1 (Leiomyosarkom) und SW872 (Liposarkom).....	53
<b>Abbildung 8:</b> Einzusetzende Zellzahl pro well eines 4-d-Viabilitätsassays .....	54
<b>Abbildung 9:</b> relative Viabilität von Leiomyosarkomzellen SKUT-1 Zellen nach 24 Stunden Behandlung mit 17-AAG.....	55
<b>Abbildung 10:</b> relative Viabilität von Fibroblasten MRC-5, Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872 nach 3 d Behandlung mit 17-AAG.....	56
<b>Abbildung 11:</b> relative Viabilität von Fibroblasten MRC-5, Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872 nach 3 d Behandlung mit CCT018159.....	57
<b>Abbildung 12:</b> relative Viabilität von Fibroblasten MRC-5, Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872 nach 3 d Behandlung mit PU-H71.....	58
<b>Abbildung 13:</b> Ablauf des Viabilitätsassays .....	58
<b>Abbildung 14:</b> Behandlung von Fibroblasten MRC-5, Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872 mit 17-AAG, sowie in Kombination mit Hitze.....	59
<b>Abbildung 15:</b> Behandlung von Fibroblasten MRC-5, Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872 mit CCT018159, sowie in Kombination mit Hitze.....	61
<b>Abbildung 16:</b> Behandlung von Fibroblasten MRC-5, Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872 mit PU-H71, sowie in Kombination mit Hitze.....	62
<b>Abbildung 17:</b> Ablauf des klonogenen Assays .....	64
<b>Abbildung 18:</b> Behandlung von Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872 mit CCT018159, sowie in Kombination mit Hitze.....	64
<b>Abbildung 19:</b> Behandlung von Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872 mit PU-H71 sowie in Kombination mit Hitze.....	65
<b>Abbildung 20:</b> Einzusetzende Zellzahl bei 8 d-Proliferationsassay.....	66
<b>Abbildung 21:</b> Ablauf des Proliferationsassays.....	67
<b>Abbildung 22:</b> Behandlung von Fibroblasten MRC-5, Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872 mit 17-AAG, sowie in Kombination mit Hitze.....	68
<b>Abbildung 23:</b> Fibroblasten MRC-5, Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872 mit CCT018159 behandelt, sowie in Kombination mit Hitze.....	69
<b>Abbildung 24:</b> Fibroblasten MRC-5, Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872 mit PU-H71 behandelt, sowie in Kombination mit Hitze.....	70
<b>Abbildung 25:</b> Pser- AKT / AKT- pan nach Behandlung mit HSP 90-Inhibitoren.....	72
<b>Abbildung 26:</b> PThreo- AKT / AKT-pan nach Behandlung mit HSP 90-Inhibitoren.....	73
<b>Abbildung 27:</b> P- mTOR / mTOR nach Behandlung mit HSP 90-Inhibitoren.....	74

<b>Abbildung 28:</b> P-ERK / ERK nach Behandlung mit HSP 90-Inhibitoren.....	75
<b>Abbildung 29:</b> Ablauf des Viabilitätsassays .....	78
<b>Abbildung 30:</b> Überblick über die Ergebnisse des Viabilitätsassays.....	79
<b>Abbildung 31:</b> Ablauf des klonogenen Assays .....	80
<b>Abbildung 32:</b> Überblick über die Ergebnisse des klonogenen Assays.....	80
<b>Abbildung 33:</b> Überblick über die Ergebnisse des Proliferationsassays .....	83
<b>Abbildung 34:</b> Überblick über die Ergebnisse der Kombinationsbehandlungen.....	91

### 3. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Cofaktoren von HSP 90.....	16
<b>Tabelle 2:</b> FNCLCC Grading System.....	26
<b>Tabelle 3:</b> Materialien.....	31
<b>Tabelle 4:</b> Geräte.....	32
<b>Tabelle 5:</b> Kits.....	33
<b>Tabelle 6:</b> Software.....	33
<b>Tabelle 7:</b> Puffer und Lösungen.....	33
<b>Tabelle 8:</b> Zelllinien.....	35
<b>Tabelle 9:</b> verwendete Antikörper.....	47

## 4. Abkürzungsverzeichnis

17-AAG	17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin
ATF4	Activating transcription factor 4
AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Alkylphosphocholin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	Bcl-2-associated death promoter
BAX	Bcl-2-associated -x-protein
BCA	Bicinchoninic acid; deutsch: Bicinchoninsäure
Bcl-2	B-cell-lyphoma 2
BRCA2	Breast Cancer early onset 2
BSA	Bovine serum albumine; deutsch: Rinderserumalbumin
CCT018159	4-[4-(2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-5-methyl-1H-pyrazol-3-yl]-6-ethyl-1,3-benzenediol
Cdc37	Cell division cycle 37
CHIP	Hsp 70–interacting protein
CT	Computertomographie
CTP	Cytidintriphosphat
CYP3A4	Cytochrome P450 3A4
DMEM	Dulbecco's modifies eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNAPKcs	DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit
DNAJ	HSP40, Hitzeschockprotein 40
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycolbisaminoethylethertetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extacellular signal-regulated kinase
4E-BP1	Eukaryontic initiation factor 4E binding protein
eIF-4B	Eukaryontic initiation factor 4B
eIF-4E	Eukaryontic initiation factor 4E
ESMO	European Society for Medical Oncology 6
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
FCS	Fetal calf serum; deutsch: Fetales Kälberserum
FKBP	Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase
FNCLCC	Fédération Nationale des Centres de Lutte le Cancer
Grp94	Glucose Regulated Protein 94
GSK3 $\alpha$	Glykogensynthasekinase-3 $\alpha$
GTP	Guanosintriphosphat
GroES	Hitzeschockprotein 10
HIF-1 $\alpha$	Hypoxie-induzierter Faktor 1 $\alpha$
HOP	Hsp 70-Hsp 90 Organizing Protein
HPF	High-power fields
HSF	Hitze-Schock-Faktor/ Hitzeschutzfaktor
HSP	Hitzeschockprotein
HSPA	HSP 70
HSPB	kleine HSP
HSPC	HSP 90
HSPD/E	HSP 60/ HSP 10

HSPH	HSP 100
LC 50/25	Letale Konzentration 50/25
IGF1/2	Insuline like growth factor 1/2
IGF-R1	Insuline-like growth factor receptor 1
IRE1 $\alpha$	endoribonuclease inositol-requiring enzyme 1
IRS	Insulin Rezeptor Substrat
i.v.	Intravenös
kD	Kilodalton
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEME	Minimum Essential Medium Eagle
MLST8	Mammalian lethal with SEC13 protein 8
mRNS	Messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomografie
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mTOR	Mammalian/Mechanistic target of rapamycin 7
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
mTORC2	Mammalian target of rapamycin complex 2
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
PARP	Poly-adenosindiphosphat-ribose-polymerase
PBS	Dulbecco's Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PKC-1/2	Phosphoinositide-dependent kinase -1/2
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP2	Phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphat
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PU-H71	6-Amino-8-[(6-iodo-1,3-benzodioxol-5-yl)thio]-N-(1-methylethyl)-9H-purine-9-propanamine
RAPTOR	Regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin
RAS	Rat sarcoma
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
RICTOR	Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin
RNS	Ribonukleinsäure
Rpm	Rotations per minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
s6K	s6Kinase
siRNS	Short interfering Ribonukleinsäure
S-Phase	Synthese-Phase
STS	Soft tissue Sarcoma; deutsch: Weichteilsarkom
TBS	Tris-buffered Saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tomm	Translocase of outer mitochondrial membrane
TPR	Tetratricopeptide
Trap-1	Tumor nekrosis factor associated protein
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UICC	Union internationale contre le cancer
UPS	Undifferenziertes pleomorphes Sarkom
VEGF	Vascular endothelial growth factor

WHO  
WST  
ZNS

World Health Organization  
Water-soluble tetrazolium salt  
Zentrales Nervensystem

## 5. Einleitung

In dieser Arbeit wird die Untersuchung von HSP 90-Inhibitoren an Sarkomzellen in vitro beschrieben. Es erfolgten Versuche zur Viabilität, zur Proliferation, zum zellulären Überleben und zur Expression von Hitzeschockproteinen (HSP) unter HSP 90 Inhibition allein, sowie in der Kombination von HSP 90 Inhibition mit Hitzeschock. Weiterhin erfolgten Experimente zur Aktivierung von Schlüsselproteinen des AKT- und MAP-Kinase Signalweges durch die Behandlung mit HSP 90-Inhibitoren.

Eine vermehrte HSP 90-Aktivität ist bei einer Vielzahl von Tumoren eine wichtige Reaktion auf zellulären Stress, um Zelltod abzuwenden. Es erfolgt daher die Untersuchung der HSP 90 Inhibition als möglicher Therapieansatz gegen maligne entartete Zellen. Durch die Kombination der HSP 90 Inhibition mit Hitzeschock erfolgte die Applikation eines Stressfaktors für die Zelle, der bereits als Kombinationstherapie zur Tumorbehandlung mit zytostatischer Chemotherapie oder Strahlentherapie in der Klinik etabliert ist.

### 5.1. Zelluläre Stressreaktion nach Hitze

Werden Zellen Stressbedingungen ausgesetzt, wie beispielsweise Hitze, reagieren sie auf vielfältige Weise auf die veränderten äußeren Bedingungen. Es zeigen sich nicht nur intrazelluläre Modifikationen, sondern auch Veränderungen bei der Interaktion mit Zielstrukturen sowie Veränderungen im Zellzyklus. Im Folgenden werden einige dieser Reaktionen etwas näher erläutert:

Durch Hitze entstehen fehlgefaltete und instabile Proteine, bzw. Hitze führt zu Denaturierung und Aggregation von Proteinen in verschiedenen Kompartimenten der Zelle, was zu einer Apoptose-Induktion führt. Ein weiteres Überleben der Zelle ist durch gestörte intramolekulare und intermolekulare Interaktionen erheblich erschwert. (Zaarur, Gabai et al. 2006)

Die Reaktionen der Zelle auf Hitzestress führt unter anderem zu einer veränderten Anordnung von Mitochondrien und Veränderungen in den intrazellulären Transportsystemen, wie dem endoplasmatischen Retikulum. Diese veränderte Komposition wiederum beeinflusst Stabilität, Membranfluidität und Transporteigenschaft der Zelle wesentlich. (Zaarur, Gabai et al. 2006)

Zellen sind gegenüber Hitzestress im Rahmen des Zellzyklus besonders in der S-Phase, sowie in der Mitose anfällig. Dies hängt unter anderem mit einer hitzebedingten Störung von Spindelapparat und Zytoskelett zusammen. (Nishiwaki, Ito et al. 2018)

Neben der Induktion der Apoptose gibt es auch zelluläre Programme, die der Zelle helfen, Stress in Form von Hitze bis zu einem gewissen Grad verarbeiten zu können und zu überleben. Ein Beispiel hierfür ist die Heat-Shock-Response (HSR). Stress auf die Zelle, beispielsweise in Form von Hitze, führt zur Aktivierung und vermehrten Expression von Hitze-Schock-Genen. Diese Aktivierung wird, neben einer Anzahl von weiteren zellbiologischen Ereignissen, als Heat-Schock-Response (HSR) bezeichnet.

Die oben beschriebene Reaktion der Zelle auf Hitze ist temperaturabhängig. Bei der Applikation von Temperaturen ab ca. 41 °C zeigt die Zelle eine Verlangsamung ihres Wachstumes bis hin zum Wachstumsstopp, erfolgt ein weiterer Anstieg der Temperatur, bzw. eine längere Dauer der erhöhten Temperatur, zeigen sich zytotoxische Effekte. (Issels 2008) Dieser besteht in Abhängigkeit von der Dosis

der Hitze einwirkung. (Issels 2008) Tierische und menschliche Zellen zeigen gleichermaßen als Reaktion auf die Temperaturerhöhung einen zuerst schwachen, anschließend bei Erhöhung über ca. 42,5°C einen exponentiellen Abfall der Überlebenskurven. (Bauer und Henle 1979)

Unterhalb einer bestimmten Temperaturgrenze können hitzebehandelte Zellen eine Art Thermotoleranz entwickeln, sie zeigen eine zunehmende Resistenz gegenüber der Temperaturerhöhung. Die Entwicklung dieser Thermotoleranz ist in eingeschränktem Maß auch bei Überschreiten der Temperaturgrenze nachweisbar. Jedoch benötigen die Zellen hierfür ein hyperthermiefreies Intervall von 6-12 Stunden bei 37 °C. Die Thermotoleranz ist nach ein bis zwei Tagen hyperthermiefreien Intervalls wieder deutlich schwächer. (Bauer und Henle 1979)

## 5.2. Heat-Shock-Response und Hitzeschockproteine

Die Aktivierung und vermehrte Expression von Hitze-Schock-Genen ist Teil einer Anzahl von zellbiologischen Ereignissen, die als Heat-Schock-Response (HSR) bezeichnet wird. Eines der Triggersignale hierfür ist das vermehrte Auftreten von fehlgefalteten, instabilen oder denaturierten Proteinen und deren Aggregation im Zellkern. (Wickner, Maurizi et al. 1999)

Drei Klassen von Hitze-Schock-Genen sind beim Menschen bekannt (*HSP-1, 2* und *4*). Sie kodieren Proteine, die teilweise basal exprimiert werden, teilweise nach Stressreaktionen vermehrt synthetisiert werden: die Hitzeschockproteine.

Die Hitzeschockproteine ermöglichen bis zu einem gewissen Grad die Verarbeitung von Stress durch die Zelle und ermöglichen hierdurch ein verbessertes Überleben der Zelle unter ungünstigen Bedingungen. (Wickner, Maurizi et al. 1999)

Hitzeschockproteine werden jeweils anhand ihrer Größe in verschiedene Gruppen aufgeteilt: HSPH (HSP 100), HSPC (HSP 90), HSPA (HSP 70), HSPD/E (HSP 60/ HSP 10), DNAJ (HSP 40) und HSPB („kleine HSP“). (Kampinga, Hageman et al. 2009) Innerhalb einer Gruppe, bzw. einer Familie besteht eine hohe Sequenzhomologie. Die Mehrzahl dieser Gruppen haben eine konstitutiv exprimierte und eine induzierbare Form, die bei zellulärem Stress vermehrt von der Zelle gebildet wird. (Walter S. and J. 2002)

Eine weitere Art der Unterteilung der HSPs besteht in der Unterscheidung anhand der Funktion: eine Gruppe bilden hierbei Chaperone. Sie erkennen durch einen höheren Anteil an hydrophoben Resten aggregationsanfällige Proteine oder partiell un- oder fehlgefaltete Proteine. Chaperone ermöglichen eine erneute funktionierende Struktur, bzw. die Konservierung in der aktiven Form der Proteine. Die andere Gruppe besteht aus ATP-abhängigen Proteasen. ATP- abhängige Proteasen bauen fehlgefaltete Proteine ab. (Walter S. and J. 2002)

Im Folgenden werden einige Charakteristika der wichtigsten Hitze-Schock-Proteine ausführlicher geschildert:

Die Hitze-Schock-Proteine HSPD/E (HSP60/10) bilden einen abgeschlossenen Raum, in dem sie denaturierte Proteine mit hohem hydrophobem Anteil isolieren. Durch zusätzliche Unterstützung durch das CoChaperon GroES können die denaturierten Proteine wieder in ihren nativen Zustand umgeformt und mittels ATP als Energielieferant wieder aus dem Chaperon entlassen werden. (Mayhew M., da Silva AC. et al. 1996)

HSPA (HSP 70) ist in fast allen Lebewesen nachweisbar. Die Funktionen von HSP 70 sind vielfältig. Es ist an der Umordnung des Zytoskeletts beteiligt (Liang P. and TH. 1997), reguliert Proteinfaltungsreaktionen, verhindert die Aggregation von Proteinen (Goloubinoff P., Mogk A. et al. 1999) und unterstützt die Translokation von Proteinen durch Membranen. (Ungermann C., Neupert W. et al. 1994) Die Funktion von HSP 70 beruht auf der Bildung von Dimeren, die Ähnlichkeit mit dem Substratkomplex besitzen. Zwei Co-Chaperone, die auch Nukleotidaustauschfaktoren genannt werden, katalysieren die Reaktionen von HSP 70: die DNAJ (HSP 40) Domäne und GrpE. (Liberek K., Marszalek J. et al. 1991) Die Co-Chaperone sind für die Proteinfaltung (in vitro) der Klientenproteine essenziell. Mit einer erhöhten HSP Expression und Aktivität ist auch eine Art Entzündungsreaktion mit immunmodulatorischen Effekten verbunden. Demnach führt die erhöhte HSP Expression in Tumorgewebe über die Bildung von extrazellulären HSP-Proteinkomplexen zu einer Stimulation von natürlichen Killerzellen und Antigen präsentierenden Zellen und hierdurch zu einer spezifischen T-Zell Antwort. (Issels 2008) Weiterhin sind auf der Oberfläche von HSP 70 Regionen beschrieben, welche die Proliferation von natürlichen Killerzellen stimulieren. HSP 70 bindet außerdem direkt an Antigen präsentierende Zellen und aktiviert die Antigen-Aufnahme durch die Antigen-präsentierenden Zellen und die Zytokinproduktion. Die aufgenommenen Antigene werden von CD8+T-Zellen präsentiert, was weitere Reaktionen auslöst, welche unter anderem das Tumorwachstum verlangsamen können. (Toraya-Brown and Fiering 2014)

Die Hitzeschockproteine HSP 70 und HSP 90 sind durch vielfältige Interaktionen verbunden und wirken teilweise gemeinsam. Einerseits erfolgt die Interaktion durch Vermittlerproteine wie HOP, andererseits auch durch direkte Interaktion. (Kravats, Hoskins et al. 2018) Weitere Erläuterungen zu HSP 90 folgen in 5.3..

Die wesentliche Funktion der Gruppe der HSPH (HSP 100) ist die Disaggregation von Proteinen. Sie lösen bereits aggregierte Proteine, sodass diese von HSP 70 wieder in ihren ursprünglichen Zustand gefaltet werden können. Die HSPs dieser Gruppe können jedoch auch als Protease fungieren. (Goloubinoff P., Mogk A. et al. 1999)

Die Gruppe der kleinen HSPs (hierunter werden meist Hämoxygenase, HSP 32, HSP 27, B-Crystallin und HSP 20 zusammengefasst) ist größtenteils im Zytosol lokalisiert, aber auch in Mitochondrien und im endoplasmatischen Retikulum vorhanden. (Scharf KD., Siddique M. et al. 2001) Ihre Funktion besteht darin, bereits teilweise denaturierte Proteine zu binden und dadurch in Lösung halten. Die Proteine werden anschließend an größere HSPs (HSP 70/HSP 100) übergeben, die sie weiterverarbeiten. (Haslbeck M., Franzmann T. et al. 2005)

### **5.3. Hitzeschockprotein 90**

HSP 90 ist für die Erhaltung der zellulären Aktivität, insbesondere nach Stress, von zentraler Bedeutung. (Wandinger, Richter et al. 2008) Die Klientenproteine von HSP 90 wie z.B. Rezeptoren, Messengerproteine von Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren sind oft Schlüsselenzyme mit zentraler Rolle in wichtigen Stoffwechselforgängen und häufig entscheidend für Proliferation und Überleben der Zellen sowie Aufrechterhaltung der malignen Potenz von Tumorzellen. (Sato, Fujita et al. 2000) (Nayar, Lu et al. 2013) HSP 90 nimmt damit eine wichtige Rolle für das Überleben und die Aufrechterhaltung der Malignität in verschiedenen Tumorentitäten, unter anderem auch in Sarkomen, ein.

Das Hitzeschockprotein 90 (HSP 90) ist ein homodimeres Chaperon mit ATPase-Aktivität. (Wandinger, Richter et al. 2008) Es hat eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der zellulären Aktivität, insbesondere nach Stress z.B. durch Unterdrückung der Apoptose.

Das basal exprimierte HSP 90 repräsentiert ein bis zwei Prozent der gesamten Proteinmenge einer Zelle. Unter Stressbedingungen kann sich die Expression auf vier bis sechs Prozent erhöhen. (Chiosis 2006) *HSF-1*, welches HSP 90 kodiert, ist wiederum ein Substrat von HSP 90. HSP 90 ist hierbei ein Inhibitor der *HSF-1* Aktivität, so dass ein regulatorischer Feedback-Mechanismus vorliegt. (Rabindran, Giorgi et al. 1991)

Derzeit sind fünf verschiedene Unterformen von HSP 90 bekannt. HSP 90AA, welches sowohl konstitutiv exprimiert wird als auch bei Stress verstärkt induziert wird und HSP 90AB, welches keine nennenswerte Zunahme unter Stressbedingungen zeigt. Sie befinden sich beide im Zytoplasma. Von den HSP 90-Inhibitoren werden nur die beiden Unterformen HSP 90AA und HSP 90AB gehemmt. (Johnson, V.A., Singh, E.K. et al. 2010) GRP94 spielt keine wesentliche Rolle bei der Aktivierung zentraler Signalwege (beispielsweise dem AKT-Signalweg). Es kommt vorwiegend im endoplasmatischen Retikulum vor. TRAP-1 existiert vorwiegend in den Mitochondrien und interagiert ebenfalls nur in sehr geringem Umfang mit relevanten Co-Chaperonen oder Signalwegen. Aufgrund ihrer Lokalisation und der schwachen Interaktion mit relevanten Co-Chaperonen sind die beiden Unterformen GRP94 und TRAP-1 kein Angriffspunkt für HSP 90-Inhibitoren. Als letzte Form wurde HSP 90N entdeckt, welches an der Zellwand gebunden vorliegt. (Grammatikakis, Vultur et al. 2002). HSP 90N liegt ohne die N-Terminale-Domäne vor. Daher kann es ebenfalls durch HSP 90-Inhibitoren nicht gehemmt werden. Über Co-Chaperone und Interaktionen von HSP 90N ist bisher nur wenig bekannt. (Johnson, V.A., Singh, E.K. et al. 2010)

Im Weiteren wird nur auf die Unterformen HSP 90AA und HSP 90AB eingegangen, da diese beiden Unterformen durch HSP 90-Inhibitoren gehemmt werden. (Johnson, V.A., Singh, E.K. et al. 2010) Sie werden vereinfacht als HSP 90 zusammengefasst.

HSP 90 besteht im Wesentlichen aus drei Domänen, die hoch konserviert sind: der N-terminalen ATPase Domäne, der mittleren Domäne und der C-terminalen Dimerisierungsdomäne (Prodromou and Pearl 2003). HSP 90 bildet unter physiologischen Bedingungen Dimere aus, die für die Funktion essenziell sind. (Richter, Mutschler et al. 2001).

Die ATPase Aktivität von HSP 90 liefert Energie für die Chaperonaktivität und dirigiert so die Bindung, die Induktion der aktiven Konformation und das Entlassen der Klientenproteine. Die ATPase Domäne von HSP 90 hat eine bemerkenswerte Struktur: ATP wird in gebundenem Zustand ungewöhnlich stark geknickt („Bergerat-fold“). Bindet und hydrolysiert die ATPase Domäne ATP, nimmt ATP die Bergerat-fold-Form an, die typischerweise bei den Proteinen der GHKL Klasse (Gyrase, HSP 90, Histidin, Kinase, Mut-L) vorkommt (Bergerat, de Massy et al. 1997) (Richter, Moser et al. 2006).

HSP 90 interagiert mit einer Vielfalt an Co-Chaperonen, sowohl um Substratproteine zu erkennen und zu prozessieren als auch für die Interaktion mit anderen HSPs. Der Cofaktor Tomm34 ermöglicht beispielsweise die Interaktion von HSP 90 mit HSP 70. (Trcka, Durech et al. 2014) Die Cofaktoren beeinflussen außerdem die ATPase Aktivität von HSP 90. Vor allem die C-terminale Domäne scheint für das Binden der Co-Chaperone und die Interaktion mit den Co-Chaperonen verantwortlich zu sein. Dabei zeigt sich, dass die Co-Chaperone unterschiedlich starke Bindungsaffinität zu verschiedenen HSP 90-Konformationen haben. (Wandinger, Richter et al. 2008) Einige Co-Chaperone sind beispielhaft in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1:** Cofaktoren von HSP 90

Modifiziert nach Wandinger, Richter et al. 2008

HSP 70	Cofaktor für HSP 90-Chaperon Aktivität, Substratbindung und -Reifung
TPR Cofaktoren	
HOP	beteiligt an der Substrat-Reifung (beispielsweise Steroid-Hormon-Rezeptor), Adapter für HSP 90/HSP 70 Interaktion, nicht kompetitiver ATPase- Inhibitor
große PPlasen	
FKBP51, FKBP 52	beteiligt an der Substrat-Reifung (beispielsweise Steroid-Hormon-Rezeptor)
Ubiquitin Ligase	
CHIP	Proteinmarkierung für Degradation
HSP 90 Phosphatase	
PP5	Dephosphorylierung von HSP 90, Optimierung der HSP 90 Substrat-Reifung
Weitere (nicht TPR-) Cofaktoren	
Tom70	Mitochondrialer Protein Import
p23	hält HSP 90 in Substrat-affinem Zustand, Auswirkungen auf den Chaperon-Zyklus, ATPase Inhibitor
Aha1	ATPase Aktivator
Cdc37	Kinase spezifischer HSP 90 Cofaktor, ATPase Inhibitor

Nicht nur die Cofaktoren beeinflussen die Aktivität von HSP 90, sondern auch eine Reihe post-translationaler Modifikationen, wie zum Beispiel eine Acetylierung (Scroggins, Robzyk et al. 2007), Phosphorylierung (Wandinger, Suhre et al. 2006) oder S-Nitrosylierung (Martinez-Ruiz, Villaneuva et al. 2005).

HSP 90 reguliert Schlüsselenzyme vieler intrazellulärer Signalwege, beispielsweise das Signalmolekül AKT (Sato, Fujita et al. 2000) und die Rezeptortyrosinkinase EGRF. (Scaltriti and Baselga 2006) Es beeinflusst die Aktivität sowohl von Kinasen als auch von Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise p53 und dem Steroidhormonrezeptor. (Wandinger, Richter et al. 2008) Hierbei ist HSP 90 nicht involviert in die primäre Proteinfaltung, sondern vor allem in der posttranslationalen Proteinreifung. Weiterhin ist es für die Aktivierung vieler anti-apoptotischer Signalwege verantwortlich, wie auch für die Unterdrückung proapoptotischer Proteine. (Mahalingam, Swords et al. 2009)

Die Klientenproteine von HSP 90 wie Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren und Messenger von Signalkaskaden sind häufig bei neoplastischen Zellen für die Aufrechterhaltung der malignen Potenz entscheidend. (Sato, Fujita et al. 2000). (Nayar, Lu et al. 2013)

Tumorzellen scheinen eine größere Abhängigkeit von HSP 90 zu haben. Dies könnte an den schwierigeren Überlebensbedingungen in Tumorzellen liegen, wie beispielsweise dem teilweise anaeroben Milieu. (Sato, Fujita et al. 2000) Weiterhin zeigen Tumorzellen fehlende oder weniger

effektive Kompensationsmechanismen, was die Abhängigkeit von Hitzeschockproteinen verstärkt. (Johnson, V.A., Singh, E.K. et al. 2010)

Es existiert die These, dass HSP 90 in Tumorzellen vermehrt in aktivem Zustand vorliegt, vorwiegend in Komplexen mit anderen Co-Chaperonen. In anderen Zellen wird es hingegen im vorwiegend in singulärem, latentem, nicht aktivem Zustand vermutet. Allerdings können hierdurch auch HSP 90-Inhibitoren in Tumorzellen besser HSP 90 binden als in nicht malignen Zellen. (Kamal A., Sensitaffar J. et al. 2003)

Neben der vermehrten Aktivierung ist HSP 90 in einigen Tumorentitäten überexprimiert. Wichtige und häufige betroffene Tumore sind beispielsweise Kolonkarzinome, Mammakarzinome und Ösophaguskarzinome. (Pick, E., Y. Kluger et al. 2007) Eine erhöhte Expression zeigte sich aber auch in Sarkomen, Magenkarzinomen, und Harnblasentumoren. (Bekki, H., K. Kohashi, et al. 2015, Lebret et al. 2006, Wang, J., Cui, S. et al. 2013) Eine erhöhte HSP 90 Expression steht hierbei in einigen Fällen, wie bei Mammakarzinomen und Magenkarzinomen, in Zusammenhang mit einer vermehrten Aggressivität des Tumors. (Wang, J., Cui, S. et al. 2013, Pick, E., Y. Kluger et al. 2007)

#### 5.4. Der AKT-mTOR-Signalweg

Der AKT-mTor-Signalweg ist ein intrazellulärer Signaltransduktionsweg. Er hat eine zentrale Funktion inne bei Stoffwechsel-, Wachstum- und Proliferation der Zelle. Die Kinase AKT ist ein Schlüsselprotein des Signalweges und eines der wichtigsten Klientenproteine von HSP 90. (Sato, Fujita, et al. 2000) Eine andere zentrale Kinase des AKT-mTor-Signalweges ist mTOR. (Wan and Helman 2007)

Zu Beginn der AKT Signalkaskade wird die PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) aktiviert. PI3K wiederum kann die Serin/Threonin-Kinase AKT binden und aktivieren. (Wan and Helman 2007) Die Phosphatase "PTEN" hingegen dephosphoryliert als Gegenspieler die PI3K. AKT kann nicht aktiviert werden. (Georgescu 2010)

AKT kann als Schlüsselprotein wichtige Abläufe in der Zelle beeinflussen. (Sato, Fujita, et al. 2000) Einige dieser wichtigen Abläufe sind:

Verhinderung der p53 induzierten Apoptose: AKT inhibiert die pro-apoptotischen BCL-Proteine, indem es BAX bindet bzw. BAD phosphoryliert. Auch die Caspase-9 und p21 werden durch AKT gehemmt. Hierdurch kann Apoptose verhindert werden. (Wan and Helman 2007)

Erhöhung der Proteinbiosynthese: Die Phosphorylierung und damit erhöhte Aktivität von "mTOR" führt zu einer erhöhten mRNA Translation von Proteinen. (Bellacosa 2004)

Proliferation: AKT hat nicht nur eine zentrale Rolle beim mTOR-Signaltransduktionsweg inne. Auch bei der ERK-Signaltransduktionskaskade ist AKT eine aktivierende Kinase. Wachstum und Proliferation der Zelle werden hierdurch stimuliert. (Manning and Cantley 2007)

In vielen Tumoren ist der AKT-Signalweg konstitutiv aktiviert und führt zu vermehrter Proliferation und verminderter Apoptose der betroffenen Zellen. Das erhöhte Tumorzellüberleben wird vor allem durch die drei oben beschriebenen Mechanismen begünstigt. Weiterhin kann eine konstitutive Aktivierung des Signalweges aus einer "loss-of-function-Mutation" von PTEN entstehen, was wiederum ebenfalls mit einer erhöhten Tumorzellproliferation einhergeht. (Kelleher and Thomas 2012)

Der mTor Komplex, welcher unter anderem durch AKT aktiviert werden kann, hat ebenfalls eine zentrale Rolle in der zellulären Regulation inne. Insbesondere wird durch den mTor Signalweg der Übergang der G1-Phase zur S-Phase des Zellzyklus begünstigt, was zur Zellteilung führt. (Vadlakonda et al 2013)

Zwei sich ergänzende Signalwege können von mTor ausgehen: mTor Komplex 1 (mTORC1) und mTor Komplex 2 (mTORC2):

Eine Aktivierung von mTORC1 führt insbesondere zur Phosphorylierung von 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E, binding protein-1) und S6K1 (protein S6 kinase 1). (Dancey 2006) Dies führt zu einer erhöhten Translationsaktivität und Proteinbiosynthese. Der mTORC2 ermöglicht eine positive Rückkopplung durch Phosphorylierung an der Ser473-Position von AKT und hierdurch erhöhte Aktivität von AKT. (Loewith 2002)

Studien zeigen, dass die Inhibition von mTOR, vor allem mTORC1, zu einer verminderten Expression der Hitzeschockproteine HSP 90, HSP 70 und HSP 100 führt. mTOR phosphoryliert HSF-1, wodurch es zu einer Aktivierung der Transkription der Hitzeschockproteine kommt. (Chou, Prince et al. 2012)

## 5.5. Der MAP-Kinase-Signalweg

ERK ist eine Serin/Threonin-Kinase. Sie gehört zu der Gruppe der promitogenen Kinasen (MAP-Kinasen). ERK ist eine zentrale Kinase für die Steuerung wichtiger Zellfunktionen wie -Proliferation und -Differenzierung. Eine Aktivierung kann durch verschiedene extrazelluläre Signale oder Pathogene meist mittels einer Bindung eines Wachstumsfaktors an einen Rezeptor mit Rezeptor-Tyrosin-Kinase(RTK)-Aktivität erfolgen. (Cargnello and Roux 2011) Die Aktivierung des Rezeptors führt zur Aktivierung weiterer Moleküle: Das Growth factor receptor bound protein 2 (Grb2) bindet an den phosphorylierten Rezeptor, woraufhin das Molekül SOS an Grb2 und anschließend an Ras binden kann. (Alberts 2002) Ras ist ein G-Protein und SOS katalysiert den Austausch von dessen GDP gegen GTP und damit seine Aktivierung. Daraufhin kann Ras wiederum weitere Kinasen aktivieren:

Eine besonders wichtige, durch Ras aktivierte Kinase ist B-Raf. B-Raf ist auch ein Klientenprotein von HSP 90. Verhindert man die B-Raf-Aktivierung durch HSP 90 Inhibition führt dies zu einer deutlich verminderten Aktivität dieser Proteine. Dies hat einen wesentlichen negativen Einfluss auf das Zellwachstum und die Proliferation. (Sharp and Workman 2006) B-Raf wiederum kann MEK1 und 2 phosphorylieren, welche wiederum ERK 1/2 phosphorylieren. ERK 1 und 2 aktivieren Transkriptionsfaktoren aus der Familie der Aktivatorproteine (AP1), zu denen auch Jun und Fos gehören. Durch die Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren wird die Expression von Wachstumsfaktoren und Zytokinen stimuliert. (Alberts 2002, Santarpià, Lippman et al. 2012)

Wird der MAP-Kinase-Signalweg aktiviert, entsteht ein stimulierender Einfluss auf Zellwachstum und -Proliferation. (Cargnello and Roux 2011)

Der MAP-Kinase-Signalweg kann zudem, wie in 5.4. beschrieben, auch durch AKT aktiviert werden. (Manning and Cantley 2007)

Eine weitere Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs erfolgt durch die Aktivierung von cMOS. cMOS ist ein Klientenprotein von HSP 90. So werden durch die HSP 90 vermittelte Aktivierung der Signalkaskade Zellwachstum und Differenzierung mitbeeinflusst. (Fisher et al 2000)

## 5.6. HSP 90-Inhibitoren

Durch die zentrale Rolle, die HSP 90 bei verschiedenen Tumorentitäten innezuhaben scheint, ist HSP90 ein interessanter Angriffsort für die Tumorthherapie.

Angriffspunkte für die bisher verfügbaren HSP 90-Inhibitoren sind die beiden Unterformen HSP 90AA und HSP 90AB (siehe Kapitel 5.3.).

Es wurden im Wesentlichen zwei verschiedene Formen von natürlichen HSP 90-Inhibitoren (Whitesell and Lindquist 2005; Taldone, Gozman et al. 2008) charakterisiert, die spezifisch HSP 90 angreifen: Geldanamycinderivate und Radicolderivate. Beide binden an die N-terminale ATP Bindetasche von HSP 90. (Roe, Ali et al. 2004)

Sowohl Geldanamycin-, also auch Radicolderivate sind Streptomycinderivate. Sie hemmen kompetitiv die ATPase Domäne mit einer sehr viel höheren Affinität als ATP selbst. Sie nehmen bei der Bindung an die N-terminale ATP Bindetasche eine C-förmige, ADP-ähnliche Konformation an und hemmen so HSP 90 (Roe, Ali et al. 2004). Durch die Inhibition der Bindetasche werden relevante, ATP-abhängige Vorgänge wie beispielsweise die Verarbeitung von Substraten verhindert.

Die geknickte Bergerat-fold-Form von ATP, beschrieben in Kapitel 5.3, in der ATP in der Bindetasche von HSP 90 vorliegt, ist ein prädestinierter Angriffspunkt für die HSP 90-Inhibitoren. (Retzlaff 2009). Die Substanzen Geldanamycin und Radicol zeigen eine ähnliche Konformation wie diese geknickte ATP Form. (Roe, Prodromou et al. 1999).

Radicicol ist im Serum nicht stabil und hat daher keine relevante in vivo Aktivität. Zudem führt Radicol zu toxischen Nebenwirkungen wie z.B. einer ausgeprägten Hepatotoxizität. Dies veranlasste zu verschiedenen Modifikationen der Grundstruktur, beispielsweise dem Einfügen von Carbamoylmethyl Gruppen. Keines der neuen Derivate zeigt jedoch bisher den gewünschten Erfolg, oder ließ sich in klinischen Studien anwenden. Radicol-Derivate scheinen daher als Inhibitoren zur Behandlung in Patienten nicht so gut geeignet wie Geldanamycinderivate zu sein. (Workman, Burrows et al. 2007).

Geldanamycin ist ein Ansamycin mit einem Benzoquinon- und einem makrozyklischen Ansa-Ring. Es wurde erstmals 1970 aus dem *Streptomyces hygroscopicus* isoliert. Geldanamycin hat ebenfalls eine geringe metabolische und chemische Stabilität und ist wasserunlöslich. Zudem zeigt es auch eine Reihe von Nebeneffekten wie z.B. Hepatotoxizität, wenngleich in etwas geringerem Ausmaß als Radicol. Die Hepatotoxizität von Geldanamycin scheint eng mit dem Benzoquinonring verbunden zu sein. Insgesamt scheint es für eine klinische Anwendung ebenfalls ungeeignet. Dies konnte jedoch durch Modifikation der Struktur des Moleküls wie z.B. im 17-AAG verändert werden (siehe Kapitel 5.6.1. 17-AAG). Geldanamycin zeigt als Streptomycinderivat auf zellulärer Ebene weitere Effekte, beispielsweise die Degradation von Raf-1, Her2 und Östrogenrezeptoren. (Taldone, Rodina et al. 2013)

Um die limitierte Wirkung, die Instabilität, sowie die Nebenwirkungen von natürlichen Produkten, also Radicol und Geldanamycin bzw. deren Derivaten zu umgehen, wurde eine Anzahl von synthetischen Produkten entwickelt. Hier wurden vor allem die Struktur von Purinen und Pyrazolen als Grundstruktur verwendet.

Basis für die Entwicklung von Purinderivaten war ebenso die besondere Form, die ATP annimmt (Bergerat-fold-Form), sobald es an die ATP Tasche bindet (Chiosis, Timaul et al. 2001). Diese Produkte zeigen unter anderem in ihrer Bindungsaffinität zu der N-terminalen ATP-Tasche deutliche Vorteile. (Taldone, Sun et al. 2009) Erreicht wurde dies durch ein Puringerüst, dass angebunden an einen Aryl-Rest eine C-förmige Konformation annimmt.

Unter den Pyrazolderivaten ist das 3,4-Diarylpyrazol CCT018159 eine vielversprechende Substanz, die im Vergleich zu 17-AAG besser wasserlöslich ist. (Taldone, Sun et al. 2009)

Das heutige Wissen und die Verfügbarkeit dieser Medikamente stellen eine große Chance für die Behandlung von Tumorentitäten dar.

### 5.6.1. 17-AAG

17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin als Geldanamycinderivat ist ein Beispiel eines Inhibitors, dessen krebshemmende Wirkung bereits in Zellkulturexperimenten und Laborstudien untersucht worden ist (Neckers and Neckers 2002) (Nam, Kim et al. 2017). Aus diesen Studien ergab sich, dass durch die Hemmung von HSP 90 entscheidende Signalproteine inaktiviert werden, was zur Aktivierung der Apoptose und damit zum Untergang der Tumorzellen führte (Fujita, Sato et al. 2002; Broemer M 2004).

17-AAG zeigt eine potente in-vivo Aktivität und im Vergleich zu Geldanamycin eine deutlich reduzierte Toxizität, was durch Modifikationen am Benzoquinonring von Geldanamycin erreicht werden konnte. (Taldone, Sun et al. 2009) (Nam, Kim et al. 2017) Weitere Modifikationen wie das Ersetzen der Methoxy-Gruppe am C17 durch eine Amino- und eine Alkylaminogruppe verbesserten die zelluläre Aktivität in vitro. (Taldone, Sun et al. 2009)

Eher nachteilig an 17-AAG ist ein schnelles Ausschleusen aus der Zelle sowie eine Inaktivierung durch Multidrug-resistent-elements. 17-AAG interagiert ebenso mit dem CYP3A4-System, wie der Oxidoreduktase NQO1, was eine erhöhte pharmakologische Variabilität zur Folge hat. (Taldone, Sun et al. 2009) Als wichtigster limitierender Faktor ist immer noch der Benzoquinon-Ring zu sehen und die damit verbundene Hepatotoxizität. Diese ist zwar im Vergleich zu Geldanamycin deutlich verringert, aber bei höherer Dosierung, bzw. längerer Zeitdauer immer noch ein limitierender Faktor. (Taldone, Sun et al. 2009)

Dennoch scheinen Geldanamycinderivate eine erfolgversprechende Option für die HSP 90 Inhibition zu sein. (Taldone, Sun et al. 2009; Chaklader, Das et al. 2012)

17-AAG ist bereits in klinischen Phase-II- Studien eingesetzt worden und zeigt Effekte bei Patienten mit HER2-positiven Mammakarzinomen. In diese Studie wurden Patienten eingeschlossen, welche unter Therapie mit Trastuzumab einen Progress zeigten. Es erfolgte eine Behandlung mit 17AAG. Die Behandlung wurde beendet, sobald sich ein Krankheitsfortschritt zeigte. Der primäre Endpunkt war die Ansprechrate nach den Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) Kriterien. Hierbei war die Ansprechrate 22%, die Dauer ohne Progress 6 Monate im Median und die mediane Überlebensrate 17 Monate. Es zeigte sich unter 17 AAG eine deutlich verbesserte Ansprechrate nach den RECIST-Kriterien. (Modi, S. et al 2011)

### 5.6.2. CCT018159

Das 3,4-Diarylpyrazol CCT018159 als Pyrazolderivat zeigt sich als potenter synthetischer Inhibitor. Er ist im Vergleich zu 17-AAG besser wasserlöslich. (Taldone, Sun et al. 2009)

CCT018159 bindet ebenfalls in die ATP-Bindetasche der N-terminalen Domäne und hemmt so HSP 90. Im Gegensatz zu 17-AAG ist CCT018159 unabhängig von der NQO1/DT-Diaphorase-, sowie der P-Glycoprotein Expression, was eine höhere pharmakologische Stabilität zur

Folge hat. Es ist außerdem eine geringere Anfälligkeit für multidrug-Resistance zu erwarten. (Taldone, Sun et al. 2009)

Studien zeigen, dass CCT018159 zur Induktion der Apoptose unter anderem in menschlichen HCT116–Coloncancer Zelllinien führt. (Sharp S. Y., Boxall K. et al. 2007). CCT018159 verursacht des Weiteren einen Zellzyklusarrest in der G1 Phase bei SKMEL-1 Melanomzelllinien. Bei Behandlung mit 14.5 µmol/L CCT018159 für 24 h zeigte sich eine deutliche Zunahme der PARP-Spaltung und damit eine Zunahme der Apoptose in diesen Melanomzelllinien. (Sharp S. Y., Boxall K. et al. 2007)

### 5.6.3. PU-H71

PU-H71 ist ein synthetischer Inhibitor. Er entsteht durch Modifikationen an einem Puringerüst welches, angebunden an einen Aryl-Rest, eine C-förmige Konformation annimmt.

Bei PU-H71 wurde eine 3-isopropylamino-propyl Kette eingefügt. Es zeigt hierdurch eine deutlich erhöhte Potenz (EC von 16 nM für HSP 90) (He, Zatorska et al. 2006).

Die Biotinylierung von PU-H71 ermöglicht ein verbessertes Durchdringen der Zellwand. (Taldone, Rodina et al. 2013)

Purininhibitoren zeigen weitere Aktivitäten, die denen von Geldanamycin sehr ähneln. Hier sind die Degradation von Raf-1, Her2 und Östrogenrezeptoren wichtige Effekte. (Taldone, Rodina et al. 2013)

PU-H71 zeigte bisher vielversprechenden Einfluss auf das Tumorwachstum bei Mäusen mit kleinzelligem Bronchialkarzinom (Rodina, Vilenchik et al. 2007). Dabei zeigte sich eine AKT-Inhibition und PARP-Spaltung bereits sechs Stunden nach Behandlung. Die Inhibition hielt bis zu 36 Stunden an und es konnte die Induktion von Apoptose durch den HSP 90-Inhibitor in vivo nachgewiesen werden. (Taldone, Sun et al. 2009) Eine weitere Studie zeigte ein gutes Ansprechen von Mammacarcinom-Zellen auf PU-H71. (Caldas-Lopes, Cerchietti et al. 2009)

Es wurden zudem Studien an Sarkomen vorgenommen. Hier zeigen sich ebenfalls vielversprechende Ergebnisse, beispielsweise in einer präklinischen Studie beim Ewing-Sarkom. Hier zeigte sich bei Mäusen, welche mit PU-H71 behandelt wurden, ein deutlich reduziertes Tumorwachstum, sowie eine geringere Metastasen-Anzahl. (Ambati, Caldas Lopes et al. 2014)

## 5.7. Hyperthermie

Unter Hyperthermie versteht man in der Tumorthherapie die kontrollierte Temperaturerhöhung des Tumors mit dem umliegenden Gewebe durch ein technisches Verfahren.

Zelluläre Mechanismen der Hitze wurden in 5.1. erläutert. Im Gewebe führt Hyperthermie zu einer Verstärkung der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber einer Chemotherapie und/oder einer Strahlentherapie am Ort der Überwärmung. Eine Perfusionssteigerung und damit verbesserte Gewebeoxygenierung sowie hitzebedingte Veränderungen auf zellulärer Ebene sind die Rationale für die Kombination von Hyperthermie mit Chemotherapie. (Issels, 2008)

Zudem gibt es eine immunologische Wirkung der Hyperthermie. Durch die Hyperthermie werden z.B. Hitzeschockproteine induziert und in nekrotischen Arealen auch freigesetzt. Die vermehrte Expression der HSPs führt zu einer Entzündungsreaktion mit immunmodulatorischen Effekten, wie beispielsweise der Induktion der Reifung von dendritischen Zellen. (Milani, Noessner et al. 2002) Es folgt, bedingt durch die Stimulation von Antigen-präsentierenden Zellen und natürlichen Killerzellen und mittels Bildung von HSP-Peptidkomplexen, eine spezifische T-Zell Antwort. (Multhoff, 2006)

## 5.8. Klinische Hyperthermie

Die regionale Hyperthermie zielt auf eine möglichst räumlich begrenzte Erwärmung des Tumorgebietes und eng umliegenden Gewebes ab. Dabei erfolgt eine heterogene Temperaturerhöhung des Tumorbettes auf den Bereich von ca. 39 bis 44°C. Gründe für die heterogene Temperaturverteilung sind vor allem die nicht konstante Energieabgabe und Umwandlung in Wärme. (Wust, Hegewisch-Becker, et al. 2003)

Weiterhin spielen die unterschiedlichen Charakteristika der verschiedenen Gewebearten, die unterschiedlichen Blutperfusionsraten und die damit verbundene Wärmekonvektion eine Rolle. (Wust, Hegewisch-Becker, et al. 2003)

Es gibt verschiedene Energieträger, mit denen es möglich ist, die Wärme gezielt auf die Tumorregion zu applizieren: beispielsweise elektromagnetische Wellen, Ultraschall oder die Perfusion mit hyperthermen Flüssigkeiten. Ultraschall ist für die Behandlung tieferer Regionen des Körpers problematisch, da es von den verschiedenen Körperstrukturen absorbiert wird.

In der klinischen Anwendung werden aktuell vier verschiedene Hyperthermieverfahren unterschieden, welche nicht die direkte Induktion von Hitzenekrosen zum Ziel haben:

Bei der Perfusionshyperthermie wird die Wärme über einen isolierten Kreislauf hinzugefügt. Die Flüssigkeit wird hierbei extrakorporal erwärmt und mit hoher Flussrate in die zu erwärmende, perfundierte Körperregion zurückgeführt. Die hypertherme Peritoneallavage zum Beispiel erfolgt nach diesem Prinzip.

Die lokale Oberflächenhyperthermie (LHT) wird bei oberflächlichen Tumoren durch Auflegen von Applikatoren auf die Haut durchgeführt. Es handelt sich meist um Antennen im Radio- oder Mikrowellenbereich. (Wolf 2008)

Die regionale Tiefenhyperthermie (RHT) ist eine Methode für die Behandlung tiefer liegende Tumore. Es werden hier aufgrund der erforderlichen Eindringtiefe elektromagnetische Strahlen mit Frequenzen unter 100 MHz gewählt. Die kapazitive Energieankopplung der Wellen an den Körper mit Kondensatorplatten ermöglicht eine Temperaturerhöhung im Tumorgebiet auf 40,5-43°C. (Kakehi, Ueda et al. 1990) Dabei erfolgt die Energieeinstrahlung über phasengesteuerte Viel-Antennen-Systeme, die zirkulär um die Tumorregion angeordnet werden (Annular-phased-array-Systeme). Der Durchmesser des Fokuses ist hierbei frequenzabhängig. Seit einigen Jahren werden 12 Antennenpaare in longitudinaler Anordnung kombiniert, die auch eine Teilkörperhyperthermie ermöglichen. (Wolf 2008)

Die Ganzkörperhyperthermie ermöglicht Temperaturen zwischen 39-49°C. Sie wird mittels heizbarer Kupferrohre oder Infrarot in einem Hohlraum um den Körper des Patienten durchgeführt. (Hildebrandt, Hegewisch-Becker et al. 2005).

Bei der regionalen Hyperthermiebehandlung erfolgt oftmals eine Thermometrie zur Überwachung der Temperaturverteilung in dem behandelten Gebiet, um die optimale Temperatur zu erreichen und zu hohe Temperaturen im umliegenden Gewebe zu vermeiden. Bei Tumoren, die Kontakt zu Organen mit Lumen (Blase, Darm, Zervix) haben, wird meist noch zusätzlich zu der direkten Temperaturmessung ein endoluminaler Thermistor angelegt. Die Temperaturerfassung in Blase und Rektum sowie die invasive Temperaturmessung im Tumor erfolgt meist über Kunststoffkatheter mit verschiebbaren Temperaturfühlern. Mit einem Hybridsystem aus konsekutiver Hyperthermiebehandlung und MRT kann die Temperaturänderung im tiefliegenden Gewebe nichtinvasiv erfasst und beobachtet werden. (Gellermann, Hildebrandt et al. 2006)

Mittlerweile kann die Hyperthermie als ein in der Klinik etabliertes Verfahren gesehen werden. Eine solitäre Therapie mit Hyperthermie zeigte jedoch bisher keine erfolgversprechenden Ergebnisse. Aktuell erfolgt daher die Hyperthermie in Kombination mit Chemotherapie, Radiotherapie, kombinierter Radiochemotherapie. Hierbei wurden einige wichtige Mechanismen beschrieben:

Die Kombination von Hyperthermie mit Chemotherapie ermöglicht eine Beschleunigung des Transports, sowie der metabolischen Aktivierung der Zytostatika. Weiterhin hat die erhöhte Temperatur auf Gewebeebene unter anderem eine gesteigerte Perfusion und damit Oxygenierung des Tumors zur Folge. (Issels 2008) Die gesteigerte Perfusion führt hierbei zu einer gesteigerten Anflutung von Zytostatika (Issels 2008, Issels et al. 2010).

In Kombination mit Strahlentherapie werden unter anderem DNA-Reparaturmechanismen gehemmt. Hierdurch können die Strangbrüche, die durch Strahlentherapie verursacht werden, nicht mehr in demselben Maß repariert werden. Diese Effekte treten zusätzlich zu den in 5.1. beschriebenen Effekten der zellulären Ebene auf. (Issels, Kampmann, et al. 2016)

Seit den 90er Jahren wurden erste klinische Phase I/II- Studien zu Kombination Hyperthermie/Chemotherapie bei verschiedenen Tumorentitäten und Patientengruppen durchgeführt:

Eine Studie in der pädiatrischen Onkologie erfolgte an 34 Patienten mit fortgeschrittenem Tumorleiden (11 Patienten mit erstem Lokalrezidiv, 11 Patienten mit 2.-7. Lokalrezidiv, 11 Patienten mit vermindertem oder fehlendem Ansprechen auf bisherige Behandlungen). Es zeigte sich bei 5 Patienten ein komplett nekrotischer Tumor im Anschluss an die Behandlung, weitere 20% waren in kompletter Remission für über ein Jahr, 7 Patienten waren in kompletter Remission für insgesamt 64 Monate. Die Ergebnisse sind jedoch schwierig zu interpretieren bei einer sehr heterogenen Patientengruppe. (Romanowski, Schött et al. 1993)

In einer anderen Studie zu malignen Keimzelltumoren konnte gezeigt werden, dass Patienten von einer Kombinationstherapie profitieren. Die Studie erfolgte an 44 Patienten mit therapierefraktärem oder rezidivierenden Keimzelltumoren (hiervon 9 Patienten mit vermindertem Ansprechen auf bisherige Therapien, 23 Patienten mit einem Rezidiv und 12 Patienten mit mehrfachen Rezidiven). Von den 35 Patienten mit ausreichenden Daten sprachen 30 Patienten auf die Behandlung an. Hiervon hatten 16 Patienten eine komplette Remission und 14 Patienten eine Teilremission. Das 5 Jahres-Überleben der Patienten war 72%. (Wessalowski, Schneider, et al. 2013)

Im Bereich gynäkologischer Tumoren wurde eine Phase II Studie zu Zervixkarzinomen abgeschlossen. Eingeschlossen wurden 23 Patientinnen mit Zervixkarzinom-Rezidiv nach Radiotherapie. Ein Ansprechen zeigte sich bei 12 Patientinnen. Bei 3 der 12 Patientinnen war im Anschluss eine operative Resektion möglich (welche zuvor nicht in Betracht gezogen werden konnte). Die mediane Dauer des Ansprechens war 9,5 Monate, das mediane Überleben 8 Monate. (Rietbroek, Schilthuis et al. 1997)

Eine Phase II/III Studie zu Ösophaguskarzinomen, sowie eine Studie zu Kolonkarzinom mit Peritonealkarzinose zeigten ebenfalls signifikant verlängertes Überleben. (Verwaal, van Ruth et al. 2003)

Bei Hochrisikoweichteilsarkomen im Erwachsenenalter zeigte eine randomisierte Phase III Studie, dass die Kombination von Chemotherapie mit Hyperthermie signifikanten Vorteil im Tumoransprechen ergibt, bzw. das Ansprechen auf die Chemotherapie erhöht. Hierfür wurden 341 Patienten mit Hochrisikoweichteilsarkom eingeschlossen. 172 Patienten erhielten eine Chemotherapie mit EIA (Etoposide, Ifosfamide und Doxorubicin), 169 Patienten eine Kombination aus EIA und regionaler Hyperthermie. Nach einem medianem Follow-up von 34 Monaten zeigte sich bei 132 Patienten ein Lokalrezidiv (hiervon bei 56 Patienten der Kombinationsbehandlung und bei 76 Patienten der anderen Gruppe). Die Patienten der Kombinationsbehandlung hatten eine geringere Wahrscheinlichkeit für ein Lokalrezidiv und eine höhere Überlebenschance. (Issels, Lindner et al. 2010) Diese Ergebnisse konnten auch in einem 10Jahres-follow-up bestätigt werden. Es zeigte sich weiterhin, dass das Gesamtüberleben nach zehn Jahren in der Kombinationsbehandlung ebenfalls besser war (52,6 % und 42,7 %). (Issels, Lindner et al. 2018)

## 5.9. Sarkome

Das Sarkom als maligner Weichteiltumor macht ca. 1% aller bösartigen Tumore des erwachsenen Menschen aus. Männer zeigen eine erhöhte Inzidenz im Vergleich mit Frauen. (Zahm and Jr. 1997) Das Weichteilsarkom zeigt ein vermehrtes Auftreten in zwei Altersgipfeln: bei Kindern und Jugendlichen, sowie bei Erwachsenen zwischen 45-55 Jahren. Es kann jedoch in jedem Lebensalter auftreten. (Cerny, Issels et al. 2006)

Die Gruppe der Weichteilsarkome zeigt heterogene Charakteristiken. Weichteiltumore können im Muskelgewebe, Bindegewebe, Fettgewebe und im umgebenden Gewebe von Blut- und Lymphgefäßen entstehen. Es sind auch Fälle von Sarkomen im peripheren Nervengewebe beschrieben. (Enzinger, Weiss et al. 2001) Weichteilsarkome sind vorwiegend in den Extremitäten, vor allem in den proximalen Abschnitten der unteren Extremität lokalisiert, im Körperstamm ca. 19%, im Retroperitonealraum 13% und im Kopf-Halsbereich 8%. (Cerny, Issels et al. 2006)

Die Ätiologie des Weichteilsarkoms ist nicht abschließend geklärt, jedoch lassen sich einige Faktoren ausmachen, die zur Entstehung eines Sarkoms beitragen können:

Das Humane-Herpes-Virus 8 (HHV8) scheint Einfluss auf die Entstehung des Kaposi-Sarkoms zu haben. Auch die genetische Prädisposition von Patienten mit syndromalen Erkrankungen (Werner Syndrom, Neurofibromatose Typ 1, Li-Fraumeni-Syndrom, Gardner Syndrom) scheint ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Weichteilsarkomen zu zeigen. (Cerny, Issels et al. 2006) Des Weiteren werden exogene Faktoren vermutet, die als kanzerogen gelten: Arsen, Polyvinylchlorid, Chlorophenole, Dioxine sowie ionisierende Strahlung und zurückliegende Strahlenbehandlung. (Beger and Schlegelberger 2009)

Die unspezifische klinische Manifestation ist meist eine indolente, tastbare Schwellung, der anfangs von Seiten der Patienten meist keine größere Bedeutung beigemessen wird, sodass der Arztbesuch erst spät erfolgt. Schmerzen treten meist erst durch die Verdrängung anderer Strukturen auf. Durch die oft späte Erstdiagnose hat der Tumor meist ein fortgeschrittenes lokales Wachstum erreicht, oder ist oft metastasiert. Bei 20% der Patienten ist bereits eine Fernmetastasierung bei Erstdiagnose vorhanden. (Huth J.F. and Eilber F.R. 1988)

Wesentliche Schritte zur Diagnose sind Anamnese, körperliche Untersuchung und Sonographie, die endgültige Diagnosesicherung kann jedoch nur durch eine Probeentnahme und histopathologische Untersuchung des Tumorgewebes erfolgen.

Weichteilsarkome werden durch den vorherrschenden Zelltyp klassifiziert. Entscheidend sind hierbei die phänotypischen Merkmale der Zellen. Die WHO Klassifikation beschreibt über 170 verschiedene Typen von Tumoren des Weichgewebes, hiervon sind mehr als 60 als maligne Formen anzusehen. (Issels, Lindner et al. 2004)

In Deutschland wird vor allem das von der französischen Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer (FNCLCC) entwickelte 3-gradige Klassifikationsschema zur Einteilung der Weichteiltumoren verwendet. Hierbei werden Differenzierungsgrad, Anzahl der Mitosen und Nekrosegrad betrachtet, nach denen dann der Malignitätsgrad eingeschätzt wird. Dieses Schema hat allerdings auch limitierende Faktoren, beispielsweise ist es auf die Anwendung bei Erwachsenen beschränkt. (Guillou, Coindre, et al. 1997)

**Tabelle 2:** FNCLCC Grading System

<b>Tumor differentiation</b>
Score 1: Sarcomas closely resembling normal adult mesenchymal tissue (eg. well-differentiated liposarcoma)
Score 2: Sarcomas for which histologic typing is certain (eg. myxoid liposarcoma)
Score 3: Embryonal and undifferentiated sarcomas, sarcomas of doubtful type, synovial sarcomas, osteosarcomas, PNET
<b>Mitotic count</b>
Score 1: 0–9 mitoses per 10 HPF (A high-power field (HPF) measures 0.1734 mm <sup>2</sup> )
Score 2: 10–19 mitoses per 10 HPF
Score 3: 20 mitoses per 10 HPF
<b>Tumor necrosis</b>
Score 0: No necrosis
Score 1: 50% tumor necrosis
Score 2: 50% tumor necrosis
<b>Histologic grade</b>
Grade 1: Total score 2, 3
Grade 2: Total score 4, 5
Grade 3: Total score 6, 7, 8

*Modifiziert nach: Husain, Verma, (2011); Guillou, Coindre et al. (1997) und Cerny, Issels et al. (2006).*

In der Stadieneinteilung der Weichteilsarkome gemäß Union Internationale des Contre le Cancer (UICC) und des American Joint Committee on Cancer (AJCC) sind zusätzlich zum Malignitätsgrad die Tumorgröße und die Anwesenheit von Lymphknoten- oder Fernmetastasen (TNM) berücksichtigt.

### Klinische TNM-Klassifikation nach UICC/AJCC

Klassifikation	Extremitäten und oberflächlicher Stamm	Retroperitoneum	Kopf-Hals-Bereich	Eingeweide des Thorax und Abdomens
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden			
T0	kein Anhalt für Primärtumor			
T1	Tumor ≤5 cm	Tumor ≤5 cm	Tumor ≤2 cm	Tumor begrenzt auf ein Organ
T2a	T2 Tumor >5 ≤10 cm	T2 Tumor >5 ≤10 cm	T2 Tumor >2 ≤4 cm	Tumor infiltriert Serosa des viszeralen Peritoneums (kein Durchbruch)
T2b				Tumor mit mikroskopischer Ausbreitung jenseits der Serosa
T3	Tumor >10 ≤15 cm	Tumor >10 ≤15 cm	Tumor >4 cm	Tumor infiltriert ein zusätzliches Organ oder makroskopische Ausbreitung jenseits der Serosa
T4a	T4 Tumor >15 cm	T4 Tumor >15 cm	T4a Tumor infiltriert die Orbita, Schädelbasis oder Dura, zentrale Eingeweide, Gesichtsknochen oder Musculi pterygoidei	Multifokaler Tumor mit Beteiligung von mehr als zwei Lokalisationen in einem Organ
T4b			T4b Tumor infiltriert Gehirn, prävertebrale Muskulatur, umschließt die A. carotis oder Beteiligung des ZNS durch eine perineurale Ausbreitung	Multifokaler Tumor mit Beteiligung von mehr als zwei, aber nicht mehr als fünf Bezirken
T4c				Multifokaler Tumor mit Beteiligung von mehr als fünf Bezirken
NX*	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden			
N0*	keine regionäre Lymphknotenmetastasen			
N1	regionäre Lymphknotenmetastasen			
M0	keine Fernmetastasen			
M1	Fernmetastasen			

Aus: Cerny, Issels et al. (2006), Katenkamp et al (2009).

Für eine gute Behandlung von Weichteilsarkomen sollte eine etablierte interdisziplinäre Zusammenarbeit der betroffenen medizinischen Fachbereiche vorliegen, idealerweise in spezialisierten Zentren. Die wesentlichen Säulen Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie können durch Hyperthermie synergistisch oder additiv ergänzt werden und entsprechend der Tumorlokalisation, der histologischen Klassifikation und dem Alter des Patienten aufeinander abgestimmt werden. (Issels, Lindner et al. 2010; Issels, Lindner et al. 2018; Heijkoop et al. 2012)

Das Alter des Patienten, die Größe des Tumors, die Lokalisation des Tumors, der histologische Subtyp, das Grading, sowie das Tumorstadium sind entscheidend für die Prognose des Patienten mit Weichteiltumoren. (Cerny, Issels et al. 2006) Die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit Weichteilsarkomen variiert laut Literatur zwischen 45% und 84%. (Ismann 2016; Alektiar et al. 2000; van Kampen, Eble et al. 2001)

Bei der Therapie der Weichteilsarkome ist in der ersten Linie ein entitätenübergreifender Therapieansatz Standard. Bei Second- und Third-line Therapien folgt dann eine entitätenspezifische Therapie. Weitere Erläuterungen hierzu in 5.10.

## 5.10. Targeted therapy bei Sarkomen

Das maligne Verhalten von Tumorzellen wird verursacht durch genomische Instabilität, genetische Veränderungen und epigenetische Veränderungen, die letztlich über veränderte Proteinexpressionen und fehlgeregelte Signalwege zu unkontrollierter Proliferation und invasivem Verhalten führen. (Hanahan, Weinberg, et al. 2011) Die Untersuchung der zellulären Signalverarbeitung ist ein Hauptforschungsgebiet der onkologischen Grundlagenforschung. In den letzten Jahren konnten zahlreiche tumorspezifische Veränderungen in intrazellulären Signalwegen identifiziert werden und es wurden viele Medikamente entwickelt, um die entsprechenden Signalwege zu modulieren (z.B. TRK (Pollak 2008), RAF (Halilovic 2008), PI3-K, Akt oder mTor (Yap, Garrett et al. 2008)). Die bei diesen Untersuchungen gefundenen Medikamente werden inzwischen in klinischen Studien getestet oder haben sogar die Zulassung zur Behandlung bestimmter Tumorerkrankungen erhalten (z.B. die RTK-Inhibitoren Imatinib, Dasatinib, Erlotinib und Regorafenib (Arora 2008; Hartmann, Haap et al. 2009, Mir et al. 2016), der 26S Proteasominhibitor Bortezomib (Curran and McKeage 2009) oder die PD-1 and CTLA-4-Antikörper (D'Angelo, Mahoney et al. 2018)).

Bei der Therapie der Sarkome werden in der first-, second- und third-line Therapie neben den Zytostatika auch neue Medikamente aus dem Bereich targeted therapy eingesetzt.

Olaratumab, ein monoklonaler Antikörper gegen PDGFR-alpha, zeigt sich in Kombination mit Doxorubicin bei metastasierten Weichteilsarkomen subgruppenübergreifend als sehr vielversprechende Therapieoption. Dies wurde mittlerweile in die Therapieempfehlungen der ESMO Guidelines aufgenommen: Als First-line Therapie bei nicht resektablen und/oder fortgeschrittenen und/oder metastasierten Weichteilsarkomen ist Doxorubicin als Monotherapie, die Kombination Doxorubicin/Ifosfamid oder die Kombination Doxorubicin und Olaratumab in der ESMO-Guideline empfohlen. (Casali, Abecassis, et al. on behalf of the ESMO Guidelines Committee and EURACAN 2018)

Weiterhin wird beispielsweise Eribulin bei Liposarkomen nach Doxorubicin und Olaratumab-Versagen empfohlen. Bei anderen Sarkom-Subgruppen in dieser Situation zeigte Pazopanib positive Effekte. (van der Graaf et al. 2012) Weiterhin ist Trabectedin bei Liposarkomen und Leiomyosarkomen als Second-line Therapie vor Eribulin eine Option. (Demetri G.D. et al, 2017)

Eine interessante Therapieoption ist auch die Immun-checkpoint-Blockade bei Sarkomen. Eine Studie zeigte bei Pembrolizumab (PD-1-Inhibitor) als Monotherapie vielversprechende Aktivität beim undifferenziertem Liposarkom und beim undifferenzierten pleomorphen Sarkom. Hierzu wurden 84 Patienten mit therapierefraktären Sarkomen in die Studie eingeschlossen. Das mediane follow-up betrug 17,8 Monate. 20% der Patienten mit Liposarkom und 40% der Patienten mit undifferenziertem pleomorphem Sarkom zeigten ein objektives Ansprechen auf die Therapie. (Hussein, Burgess et al. 2017)

Möglicherweise führt die Kombination der systemischen Applikation von targeted drugs und lokaler Hyperthermie zu einer deutlich erhöhten lokalen Zytotoxizität, ohne das umliegende Gewebe gravierend zu beschädigen. Hierbei könnten positive Effekte wie eine durch die verbesserte Gewebepерfusion erhöhte Gewebskonzentration, eine erhöhte zelluläre Wirkstoffaufnahme sowie spezifische zelluläre Effekte, z.B. die Hemmung der DNA-Reparatur eine Rolle spielen. Bisher gibt es hierzu jedoch wenig Erfahrungen.

## 6. Zielsetzung

Ziel der Doktorarbeit ist, die spezifische Reaktion von Sarkomzellen auf einen Hitzeschock mit klinisch relevanten Temperaturen in Kombination mit Inhibition von HSP 90 zu analysieren. Es wird untersucht, ob durch die Kombination mit HSP 90 Inhibition die Wirkung der Hitzeschock Behandlung verstärkt wird.

Es wurde hierzu anfangs die zelluläre Stressreaktion von Sarkomzellen nach Hitzeschock im Sinne der HSP-Expression charakterisiert.

Anschließend wurde die zelluläre Wirkung von Einzelbehandlungen und Kombinationsbehandlungen mit steigenden Thermal Dosen und steigenden Inhibitor-Konzentrationen in Zellkultur untersucht.

Hierbei wurden drei verschiedene Methoden verwendet, um zu untersuchen, wie die unterschiedlichen Messpunkte Viabilität, klonogenes Überleben und Proliferation in einem in vitro Versuchsaufbau charakterisiert werden können. Die Methoden selbst wurden im Anschluss nach Beitrag zur Beantwortung dieser Fragestellung, sowie Durchführbarkeit gewertet.

Zuletzt erfolgte die Untersuchung der Aktivität zentraler Schlüsselproteine zweier Signaltransduktionswege unter HSP 90 Inhibition, um Aussagen über wichtige Klientenproteine von HSP 90 und mögliche rescue Mechanismen der Zelle treffen zu können.

Idealerweise können die in diesem Projekt gewonnenen Resultate weitere klinische Studien inspirieren.

## 7. Material und Methoden

### 7.1. Zellbiologische Arbeitstechniken

#### 7.1.1. Allgemeine Zellkulturbedingungen

**Tabelle 3:** Materialien

Material	
17AAG	Calbiochem (Merck Millipore, UK), Mat.-Nr.: 100068
96-Well Platten	Greiner bio-one, Frickenhausen
6-Well Platten	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
20% Ethanol	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Hamburg
0,8% Ammoniumoxalat	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Hamburg
2% Crystal violet	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Hamburg
Albumin Standard	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Dulbecco's modified eagle's serum (DMEM)	Invitrogen (Oregon, USA)
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg
Dulbecco's Phosphat buffered saline (PBS)	Invitrogen (Oregon, USA)
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
CCT018159	Calbiochem, Merck Millipore, UK, Mat. Nr.: 385920,
EDTA (0,5 M)	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Fetal calf serum (FCS)	PAN™ Biotech GmbH (Aidenbach)
Lysispuffer	Thermo Scientific, Rockford, USA
Loadingpuffer,	Roth
Minimum Essential Medium Eagle (MEM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Hamburg)
Natriumchlorid	Merck, Grafing
Natrium Pyruvat	Biochrom AG (Berlin)
Nitrozellulose Membran	Thermo Scientific, Rockford, USA

Non-essential amino acid (NEA)	Biochrom AG (Berlin)
Protease/Phosphataseinhibitor	ThermoScientific, Rockford USA
Protein Standard (Kaleidoskope)	BioRad, München
Pierce BCA Protein Assay-Kits	Thermo Scientific, Rockford, USA
PCR Buffer (15 mmol/l MgCl <sub>2</sub> )	Quiagen
PU-H71	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Hamburg), Mat. Nr.: P0030
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Hamburg)
Taq PCR Polymerase 5 units/μl,	Qiagen
TBS 10x	Apotheke Innenstadt, Klinikum der Universität München
Tris	Apotheke Innenstadt, Klinikum der Universität München
Trypsin-EDTA (0,05%)	Invitrogen (Oregon, USA)
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg
Western-Blot Detection Reagent	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

**Tabelle 4:** Geräte

Geräte	Herkunft
ELISA Reader	SPECTROstar <sup>Nano</sup> , BMG Labtech
Werkbank	Herasafe Thermo Scientific
Plattenphotometer SPECTROstar <sup>Nano</sup>	BMG Labtech
Mini Trans-Blot® Cell Anlage	Bio Rad
Optimax X-Ray Film Processor	PROTEC
Zellzählstift	Novodirect GmbH, Kehl/Rein
Branson Sonifier	250 Branson, Dietzenbach
Brutschrank (37°C und 41,8°C)	Binder, Tuttlingen
Brutschrank (43°C) Hera Cell	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Elektronische Thermometer	Greisinger Electronics, Regenstauf

Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen
Magnetischer Rührer	Heidolph, Schwabach
Mikroskop (konfokal) Leica TCS SP5 II	Leica Microsystems, Wetzlar
Mini Trans-Blot® Cell	BioRad, München
Nassblot-Apparatur 422 Electro Eluter	BioRad, München
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Optimax X-Ray Film Processor	PROTEC, Oberstenfeld
Pipetten (Pipetman)	Gilson, Middleton, WIS, USA
Plattenphotometer SPECTROStar Nano	BMG Labtech, Offenburg
Spannungsquelle PowerPac 3000	BioRad, München
Sterilbank HeraSafe KSP18	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Tiefkühler (-20°C)	Siemens, München
Tiefkühler (-80°C) HeraFreeze	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge Sigma 2K15	SIGMA Laborzentrifugen, Osterode am Harz
Ultraschall	Branson Sonifier 250

**Tabelle 5:** Kits

Pierce™ BCA Protein Assay Kit Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

**Tabelle 6:** Software

ImageJ Analysis Software	„Image processing in Java“, frei verfügbare Version 1.48v (19. April 2014)
EndNote X7	Thomson Reuters, Toronto, Kanada
Microsoft Office 2010	Microsoft
SpectroStar® Nano Software	BMG Labtech, Offenburg

**Tabelle 7:** Puffer und Lösungen

Elektrophorese-Puffer	0,1%SDS mmol/l Glycin 25 mmol/l Tris pH 8,3	192
Geltransfer-Puffer	20% Methanol 25 mmol/l Tris 192 mmol/l Glycin	
Kristallviolett-Lösung	0,8% Ammoniumoxalat 20% Ethanol 2% Kristallviolett	
PBS	1,06 mmol/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mmol/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O NaCl pH 7,4	2,96 155,17 mmol/l
PBS-T	PBS mit 0,05% Tween 20	
SDS-Lösung	10%ig 1 g SDS in 10 ml H <sub>2</sub> O	
TBS (Tris buffered saline)	0,2 mol/l Tris 1,5 mol/l NaCl pH 7,4	
Zelllysepuffer	20 mmol/l Tris-HCl (pH 7,5) 150 mmol/l NaCl 1 mmol/l Na <sub>2</sub> EDTA 1 mol/l IM EGTA 1% Triton X-100 2,5 mmol/l Natriumpyrophosphat 1 mmol/l β-Glycerophosphat 1 mmol/l Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 1 µg/ml Leupeptin	

**Tabelle 8:** Zelllinien

Zelllinien		
MRC-5: Fibroblasten	Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz-Zentrum München	Normal human fetal lung fibroblasts (diploid, 46, XY); Medium: DMEM (4,5 g/L Glucose), 2mM L-Glutamine, 5% FCS; bei Passage 5 eingefroren; Generationszeit ca. 42 h; Split-Ratio: 1:2 bis 1:4, bis zu 25 Passagen, in T75 Flaschen ~ 1,5 Mio.
SKUT-1: Leiomyosarkom	CLS, Bestell-Nr.: 300455	Mixed mesodermal tumor consistent with leiomyosarcoma, uterus, grade III, Hypodiploid bis hyperdiploid (tumorigenic in nude mice); Medium: MEM Eagle in Earle's BSS mit NEA, Na-Pyruvat, 10% FCS, 2 mM L-glutamine; bei Passage 25 eingefroren; Generationszeit ca. 36 h; Split-Ratio: 1:2 bis 1.4; bei Konfluenz: in T25 Flaschen ~ 8 Mio., in T75 Flaschen ~ 15 Mio.
SW-872: Liposarkom	CLS, Bestell-Nr.: 300405	Fibrosarcoma; undifferentiated tumor consistent with liposarcoma, Hypertriploid: 66-81 (tumorigenic in nude mice); Medium: DMEM (4,5 g/L Glucose), 2 mM L-Glutamine, 5% FCS; bei Passage 37 eingefroren; Generationszeit ca. 40 h; Split-Ratio: 1:3 bis 1:6 bei Konfluenz: in T25 ~ 5 Mio., in T75 ~ 9 Mio.

### 7.1.2. Zellkultivierung, Zellsplitting und Zellzahlbestimmung

Die Zellen wurden in T75 Flaschen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz wurde die Kultur gesplittet. Hierbei wurde das überständige Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der Zellrasen mit Trypsin-EDTA für ca. 5 min bis zum Lösen der Zellen (durch Kontrolle unter dem Mikroskop verifiziert) bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Der Prozess wurde in dem vierfachen Volumen Medium mit 10% FCS (Abstopppmedium) gestoppt und die Zellen bei 1500 rpm für 5 min abzentrifugiert. Danach wurden die Zelle in 5 ml Medium resuspendiert. Zur Zellzahlbestimmung wurden 10 µl der Suspension je nach Dichte der Zellen mit 1:2 bis 1:5 mit Trypanblau verdünnt und in eine Neubauer Zählkammer gegeben. Aus der Zellzahl konnte dann über eine entsprechende Formel (Anzahl der Zellen / Anzahl der gezählten Quadranten x Verdünnungsfaktor

x 10000) die Zellzahl pro ml errechnet werden. Es wurden anschließend 1-1,5 Mio. Zellen pro T75 Flasche ausgesät.

Bei der Zellernte für die einzelnen Versuche wurden diese entsprechenden Arbeitsschritte (bis zur Aussaat) angewendet.

### **7.1.3. Mykoplasmentest**

Um die Zellen auf Mykoplasmenkontamination zu testen, wurde in regelmäßigen Abständen eine PCR durchgeführt. Dazu wurden Proben aus der Zellkultur sowie Kontrollen für 5 min bei 98 °C gekocht, dann für 2 min bei 1300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde für die PCR verwendet. Verwendet wurde Taq PCR Polymerase, 10 x PCR Buffer (15 mmol/l MgCl<sub>2</sub>), Primer-Mix und dNTP-Mix.

### **7.1.4. Kryokonservierung**

#### **1. Einfrieren**

Um die Zellen zu konservieren, wurden sie eingefroren. Dazu wurden die Zellen mit einer Zellzahl von 5 Mio. pro ml in Einfriermedium resuspendiert. Zusammensetzung des Einfriermediums: 10% DMSO in FCS, um mechanische Zellschädigung durch Kristallbildung zu verhindern. Die Cryovials mit 1 ml Suspension wurden sofort bei -80 °C eingefroren. Nach einigen Tagen wurden die Cryovials bei -170 °C im Stickstofftank tiefgefroren.

#### **2. Auftauen**

Um Zellen aufzutauen, wurde das gewünschte Cryovial dem Stickstofftank entnommen. Anschließend wurde es bei Raumtemperatur aufgetaut und der Inhalt in ein mit Nährmedium versetztes Eppendorf-Röhrchen gefüllt. Nach 5 min Zentrifugation bei 1500 rpm wurde der Überstand abgenommen und die Zellen 5-6 ml Nährmedium in eine T25 Kulturflasche gefüllt. Diese wurden für mindestens 24 h bei 37 °C ruhen gelassen.

## **7.2. Hitzeschock**

Der Hitzeschock erfolgte im Brutschrank bei 41,8 °C, bzw. 43 °C für 90 min. Hierbei wurde beachtet, dass die Zellkulturen im Brutschrank etwa 30 min benötigen, um die Zieltemperatur im Medium zu erreichen. Es wurden zwei Temperaturen gewählt, um eine Nähe zur klinischen Hyperthermie zu gewährleisten: Die Verwendung dieser zwei Temperaturen spiegelt hierbei den Bereich der inhomogenen Temperaturhöhe wider, die während der klinischen Behandlung mit Hyperthermie im Tumorgewebe erreicht werden. (Harnicek, Kampmann et al. 2016)

### **7.3. HSP 90-Inhibitoren**

#### **7.3.1. 17-AAG**

Die Substanz 17-AAG wurde als Pulver geliefert mit einem Reinheitsgrad von mindestens 98% (bestimmt durch HPLC). 500 µg 17-AAG wurden mit 160 µl DMSO versetzt, sodass eine 5 mM Konzentration entstand, aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

#### **7.3.2. CCT018159**

Die Substanz CCT018159 wurde ebenfalls mit einem Reinheitsgrad von über 98% (bestimmt durch HPLC) bezogen. CCT018159 wurde als Pulver geliefert, 5 mg wurden in 2,84 ml DMSO aufgelöst, sodass ebenfalls eine 5 mM Lösung entstand, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

#### **7.3.3. PU-H71**

Die Substanz PU-H71 wurde ebenfalls mit einem Reinheitsgrad von über 98% (nach HPLC) bezogen. 5 mg PU-H71 wurden in 1,95 ml DMSO gelöst, sodass auch hier ein 5 mM Lösung entstand, die aliquotiert und bei -80°C eingefroren wurde.

### **7.4. WST-Viabilitätsassay**

Der Viabilitätsassay wurde durchgeführt, um die Viabilität der Zellen nachzuweisen. Vitale Zellen, welche eine intakte Atmungskette enthalten, können Tetrazoliumsalze zu farbigen Formazansalzen reduzieren. Diese können mittels ELISA-Reader (bei 420 - 480 nm) photometrisch quantifiziert werden. Die Absorption steht hierbei in indirektem Zusammenhang mit der Anzahl der Zellen, eine direkte Korrelation kann mit der Zellatmung gesehen werden. (Schröterová et al 2009)

#### **7.4.1. Vorversuch Bestimmung der optischen Dichte definierter Zellzahlen pro Well**

Um den WST-Viabilitätsassay aussagekräftig durchzuführen, mussten Vorversuche unternommen werden. Dies ist für die Feststellung des idealen Messbereichs des Gerätes nötig. Für diesen Vorversuch wurden Zellen der drei verwendeten Zelllinien MRC-5, SKUT-1 und SW872 in aufsteigenden Konzentrationen in 96-Well Platten ausgesät. Hierbei wurden verschiedene Konzentrationen von 500 bis 64.000 Zellen pro Well gewählt. Die Platten wurden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert und täglich auf einen Farbumschlag als Hinweis für einen Verbrauch des Mediums, Aussehen und mögliche Verunreinigung kontrolliert. Die Messung der optischen Dichte bei 440 nm nach Inkubation mit dem Cell Proliferation Reagent WST-1 (Mat. Nr.: 11644807001, Roche, Mannheim) erfolgte 4 d nach Aussaat.

#### 7.4.2. Vorversuche Medikamentenkonzentration des WST-Viabilitätsassays

##### 17-AAG

Für die Konzentration des ersten Versuches waren Literaturwerte maßgeblich, um sinnvolle Ausgangswerte für den Vorversuch wählen zu können. (Sausville E.A., Tomaszewski J.E. et al. 2003; Modi, S. et al 2011)

Bei der klinischen Studie von Modi et al wurde eine Konzentration im Menschen von 450mg/m<sup>2</sup> verwendet. (Modi, S. et al 2011) Bei einer molaren Masse von 585,70 g·mol<sup>-1</sup> ergibt dies eine Konzentration von 3414 nM auf 100µl. Es wurden Konzentrationen in diesem Bereich für den folgenden Vorversuch gewählt.

Begonnen wurde mit Konzentrationen von 1, 10, 25 und 100 µM 17-AAG. Nach Ausplattieren von Zellen aller drei Zellreihen mit einer Konzentration von 5.000 Zellen pro Well und 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Nach weiteren 24 h Inkubation wurden die Zellen mittels WST gemessen.

Bei dem anschließenden Vorversuch wurden die Zellen der drei Ziellinien MRC-5, SKUT-1 und SW872 mit einer Zellzahl von jeweils 5.000 Zellen/Well ausplattiert, nach 24 h Inkubationszeit im Brutschrank bei 37 °C mit 17-AAG in Konzentrationen von 5, 50, 500 nM stimuliert und nach weiteren 3 d Inkubationszeit mittels WST gemessen.

Neben einer Kontrolle ohne Inhibitor wurde auch eine Kontrolle mit 0,001% DMSO angesetzt, deren Konzentration der Konzentration an DMSO in dem Well der höchsten Medikamentenkonzentration entspricht.

##### CCT018159

Äquivalent zu den Vorversuchen der Medikamentenkonzentration von 17-AAG wurden auch für CCT018159 Vorversuche durchgeführt.

Hierfür wurde sich ebenfalls an Literaturwerten orientiert. (Sharp S. Y., Boxall K. et al. 2007) Bei einer Behandlung mit 685 nM/L CCT018159 für 24 h zeigte sich eine deutliche Zunahme der PARP-Spaltung und damit eine Zunahme der Apoptose in Colocarzinom-Zellen. (Sharp S. Y., Boxall K. et al. 2007). Es wurden daher unten stehende Konzentrationen für den Vorversuch verwendet.

Die Zellen aller drei Zelllinien wurden mit 5.000 Zellen/Well ausgesät, nach 24 h Inkubationszeit bei 37 °C im Brutschrank mit CCT018159 in den Konzentrationen 50, 500, 5000 nM behandelt und nach weiteren 3 d mittels WST gemessen.

Die DMSO Kontrolle mit 0,01% entspricht der Konzentration an DMSO in dem Well der höchsten Medikamentenkonzentration.

##### PU-H71

Äquivalent zu den Vorversuchen der Medikamentenkonzentration von CCT018159 wurden auch für PU-H71 Vorversuche durchgeführt.

Hierfür wurde sich ebenfalls an Literaturwerten orientiert. (Caldas-Lopes, Cerchietti et al. 2009) In HCC-1806 Mamacarcinom-Zellen führte eine Behandlung für 72h mit einer Konzentration von 100nM PU-H71 zum Absterben der Hälfte der Zellen. (Caldas-Lopes, Cerchietti et al. 2009) Es wurden daher unten stehende Konzentrationen für den Vorversuch verwendet.

5.000 Zellen/Well der drei Zelllinien MRC-5, SKUT-1 und SW872 wurden ausgesät, nach 24 h Inkubationszeit bei 37 °C im Brutschrank mit PU-H71 in den Konzentrationen 5, 50, 500 nM behandelt und nach weiteren 3 d mittels WST gemessen.

Die DMSO Kontrolle mit 0,001% entspricht der Konzentration an DMSO in dem Well der höchsten Medikamentenkonzentration.

### 7.4.3. Ablauf des WST-Viabilitätsassays

Um die zytotoxische Wirkung von Hitzeschock und der HSP 90-Inhibitoren zu quantifizieren, wurde die Viabilität der Sarkomzelllinien mittels WST-Assay gemessen.

Die Zellen wurden in 96-Well Platten ausplattiert (5000 Zellen in 100 µl Medium pro Well). Nach 24 h Inkubation bei 37 °C im Brutschrank erfolgte die Applikation der HSP 90-Inhibitoren.

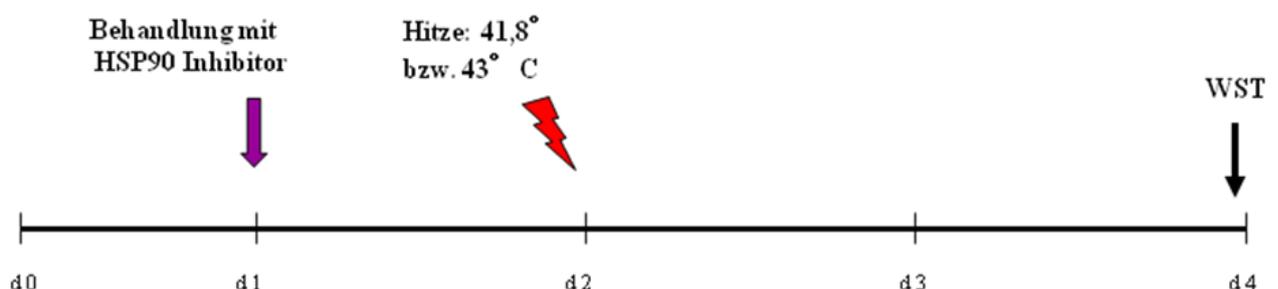
Die Behandlung erfolgte mit den drei verschiedenen HSP 90-Inhibitoren in den oben beschriebenen Konzentrationen.

Nach weiteren 24 h erfolgte ein Hitzeschock für 90 min bei 41,8 °C bzw. 43 °C im Brutschrank, danach weitere Inkubation im Brutschrank bei 37 °C.

Nach weiteren 48 h wurden die Zellviabilität und das zelluläre Überleben mit dem Cell Proliferation Reagent WST-1 gemessen: Applikation von 10 µl WST-Reagenz (entspricht einer Verdünnung von 1:10) pro Well, nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C im Brutschrank Messung mit SPECTROstar bei einer Absorption von 440 nm.

Jede Behandlungsbedingung und Kontrolle wurde in Triplets angesetzt. Es wurden immer Kontrollen ohne Behandlung durchgeführt. Eine weitere Kontrolle wurde mit DMSO angesetzt in derselben Konzentration (maximal 0,08%), in der DMSO in den Medikamentenansätzen zugesetzt wurde.

#### Ablauf



**Abbildung 1:** Ablauf des Viabilitätsassays

### 7.4.4. Auswertung des Viabilitätsassays

Es wurden für jede Behandlungsbedingung Triplets angesetzt. Die Versuche wurden insgesamt dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Normiert wurden die Messergebnisse auf die jeweiligen Mediumkontrollen ohne Zellen des entsprechenden Versuchs und durch Division wurden die Werte der

unterschiedlichen Behandlungsbedingungen auf die Mittelwerte der jeweiligen DMSO-Kontrollen derselben Temperatur bezogen. Hierdurch werden die Messergebnisse um den rein durch die Hitzebehandlung verursachten toxischen Effekt korrigiert. Eine relevante Verstärkung oder Abschwächung der Inhibitorwirkung kann somit bei Auseinanderdriften der unterschiedlichen Temperatur-Überlebenskurven angenommen werden. Es wurde aus den Triplets der drei Versuche der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) für jede Behandlungsbedingung berechnet.

## **7.5. Klonogener Assay**

Um die Klonogenität der Sarkomzellen nach Behandlung über einen längeren Zeitraum darzustellen, wurden klonogene Assays durchgeführt. Der klonogene Assay ist eine Methode zur Langzeitmessung zytotoxischer und antiproliferativer Effekte. Es können neben dem direkten Überleben der Zellen auch der Einfluss der Behandlung auf die Fähigkeit zur Mitose über einen längeren Zeitraum, sowie zur Kolonienbildung veranschaulicht werden.

### **7.5.1. Vorversuch DMSO und unbehandelte Kontrolle**

Um zu sehen, ob DMSO als Substanz Auswirkungen auf die Zellen hat, wurden DMSO und unbehandelte Kontrollen im Vergleich ausgewertet. Hierbei wurden die höchsten DMSO-Konzentrationen verwendet, die auch in der Behandlung mit CCT018159 verwendet wurden. Der Versuchsaufbau, -ablauf und die Auswertung erfolgte wie in 7.5.2. beschrieben.

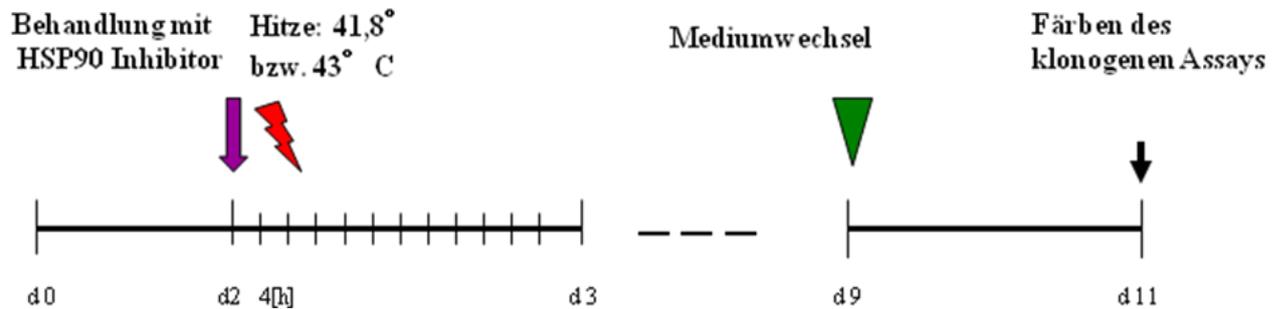
Es wurde für diesen Versuch die höchste Konzentration von 0,81% an DMSO verwendet, die auch bei der Behandlung mit CCT018159 verwendet wurde. Da die Konzentrationen an DMSO bei PU-H71 deutlich geringer waren, wurden diese im Vorversuch nicht berücksichtigt.

### **7.5.2. Ablauf des klonogenen Assays**

Es wurden bei diesem Versuch zwei der Inhibitoren an den beiden Sarkomzelllinien (SW872 und SKUT-1) getestet: CCT018159 und PU-H71. Die Fibroblasten konnten nicht für klonogene Assays verwendet werden. Es ist anzunehmen, dass die dünne Aussaat der Fibroblasten keine Kolonienbildung ermöglichte.

Es erfolgte das Ernten und Zählen der Zellen nach oben beschriebenem Schema. Danach wurden die Zellen in 6-Well Platten ausplattiert (300 Zellen pro Well in 1,5 ml Medium). Jede Behandlungsbedingung und Kontrolle wurde in Triplets angesetzt. Es wurden immer Kontrollen ohne Behandlung durchgeführt. Eine weitere Kontrolle wurde mit DMSO angesetzt in derselben Konzentration (0,81%), in der DMSO in den Medikamentenansätzen zugesetzt wurde. Nach 2 d erfolgte die Behandlung von Triplets mit den jeweiligen Medikamentenkonzentrationen. Nach weiteren 4 h erfolgte ein Hitzeschock im Brutschrank bei 41°C, bzw. 43°C für 90 min, anschließend weitere Inkubation im Brutschrank bei 37 °C. Bei Erreichen einer Gesamtzeit von 9 d erfolgte ein Mediumwechsel. Nach weiteren 48 h erfolgte das Färben der klonogenen Assays: vorsichtiges Abnehmen des Mediums, Waschen mit PBS, mit Fixationslösung bedecken, 30 min vorsichtig schwenken, Fixationslösung abnehmen, mit destilliertem Wasser nachspülen. Danach erfolgte das Zählen der Kolonien unter dem Lichtmikroskop (Eine Kolonie wurde ab einer Größe von 50 Zellen gezählt).

## Ablauf



**Abbildung 2:** Ablauf des klonogenen Assays

### 7.5.3. Auswertung des klonogenen Assays

Es wurden für jede Behandlungsbedingung Triplets angesetzt. Die Versuche wurden insgesamt dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Standardisiert wurden die Werte auch hier auf die Mittelwerte der DMSO-Kontrollen der jeweiligen Temperatur. Hierdurch werden die Messergebnisse wie bei den Viabilitätsassays um den rein durch die Hitzebehandlung verursachten toxischen Effekt korrigiert. Eine relevante Verstärkung oder Abschwächung der Kombinationsbehandlung kann somit bei Auseinanderdriften der unterschiedlichen Temperatur-Überlebenskurven angenommen werden. Es wurde aus den Triplets der drei Versuche der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) für jede Behandlungsbedingung berechnet.

## 7.6. WST-Proliferationsassay

Um die Auswirkungen der Kombinationsbehandlung auf die Proliferation der Sarkomzellen zu testen, wurden Proliferationsassays durchgeführt. Es sollen hierbei die längerfristigen Auswirkungen auf die Proliferation gezeigt werden, im Gegensatz zur zytotoxischen Wirkung, die beim Viabilitätsassay im Vordergrund steht. Weiterhin erfolgte bei dieser Versuchsreihe zuerst der Hitzeschock, dann die Medikamentenbehandlung. Grund hierfür waren die Ergebnisse des Viabilitätsassays. Näher hierzu wird in der Diskussion in Kapitel 9.2.3. und 9.2.4. eingegangen. Es wurden Zellen mit Hitzeschock und Medikament in ähnlicher Weise wie bei dem Viabilitätsassay behandelt, die Inkubationszeit jedoch wesentlich verlängert. Dazu wurde auch die Anzahl der Zellen pro Well in den 96-Well Platten wesentlich verringert, um den Zellen auch während des längeren Zeitraumes ein exponentielles Wachstum zu ermöglichen.

### 7.6.1. Vorversuch Bestimmung der optischen Dichte definierter Zellzahlen pro Well

Um den WST-Proliferationsassay aussagekräftig durchzuführen, mussten Vorversuche unternommen werden. Dies ist für die Feststellung des idealen Messbereichs des Gerätes notwendig. Für diesen Vorversuch wurden Zellen aller drei verwendeten Zelllinien MRC-5, SKUT-1 und SW872 geerntet und gezählt (siehe 7.1.2.), um sie in aufsteigenden Konzentrationen in Wells der 96-Well Platten auszusähen. Hierbei wurden Konzentrationen von 100 bis 4.000 Zellen pro Well gewählt. Die Platten wurden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert und täglich kontrolliert. Der Farbumschlag im Medium in den Wells mit der höheren Zellkonzentration zeigte einen Verbrauch des Mediums, bzw. eine zu hohe Zellkonzentration an. Die Messung der optischen Dichte bei 440 nm erfolgte mittels Cell Proliferation Reagent WST-1 9 d nach Aussaat.

### 7.6.2. Vorversuch Medikamentenkonzentration des WST-Proliferationsassays

17-AAG

Auch für den Proliferationsassay bildeten die angegebenen Literaturwerte die Basis, obgleich viel niedrigere Konzentrationen gewählt wurden, da die Zeitdauer der Inkubation höher war. (Sausville, Tomaszewski et al. 2003; Modi et al 2011).

Bei der klinischen Studie von Modi et al wurde eine Konzentration im Menschen von 450mg/m<sup>2</sup> verwendet. (Modi, S. et al 2011) Bei einer molaren Masse von 585.70 g·mol<sup>-1</sup> ergibt dies eine Konzentration von 3414 nM auf 100µl. Es wurden daher Konzentrationen um diesen Bereich für den folgenden Vorversuch gewählt.

Bei diesem Vorversuch wurden die Zellen der drei Zelllinien MRC-5, SKUT-1 und SW872 mit 800 Zellen pro Well mit 100 µl Medium pro Well ausplattiert, nach 52 h Inkubationszeit im Brutschrank bei 37 °C mit 17-AAG in Konzentrationen von 0,5; 5; 50; 500; 5000; bis 50.000 nM behandelt. Nach weiteren 7 d Inkubationszeit mit Medikament erfolgte der WST-Proliferationsassay.

Jede Konzentration und Kontrolle wurde in Triplets angesetzt. Es wurden immer Kontrollen ohne Behandlung durchgeführt. Eine weitere Kontrolle wurde mit DMSO angesetzt in derselben Konzentration (maximal 0,05%), in der DMSO in den Medikamentenansätzen zugesetzt wurde.

CCT018159

Äquivalent zu den Vorversuchen der Medikamentenkonzentration von 17-AAG wurden auch für CCT018159 Vorversuche durchgeführt.

Hierfür wurde sich ebenfalls an Literaturwerten orientiert. (Sharp S. Y., Boxall K. et al. 2007) Bei Behandlung mit 685 nM/L CCT018159 für 24 h zeigte sich eine deutliche Zunahme der PARP-Spaltung und damit eine Zunahme der Apoptose in Colocarzinom-Zellen. (Sharp S. Y., Boxall K. et al. 2007). Es wurden daher untenstehende Konzentrationen für den Vorversuch verwendet.

Die Zellen aller drei Zelllinien wurden ausgesät, nach 52 h Inkubationszeit bei 37 °C im Brutschrank mit CCT018159 in den Konzentrationen 0,5; 5; 50; 500; 5000; 50.000 nM behandelt. Nach weiteren 7 d Inkubationszeit mit Medikament erfolgte der WST-Proliferationsassay.

Jede Konzentration und Kontrolle wurde in Triplets angesetzt. Es wurden immer Kontrollen ohne Behandlung durchgeführt. Eine weitere Kontrolle wurde mit DMSO angesetzt in derselben Konzentration (maximal 0,05%), in der DMSO in den Medikamentenansätzen zugesetzt wurde.

PU-H71

Äquivalent zu den Vorversuchen der Medikamentenkonzentration von CCT018159 wurden auch für PU-H71 Vorversuche durchgeführt.

Hierfür wurde sich ebenfalls an Literaturwerten orientiert. (Caldas-Lopes, Cerchietti et al. 2009) In HCC-1806 Mamacarcinom-Zellen führte eine Behandlung für 72h mit einer Konzentration von 100nM PU-H71 zum Absterben der Hälfte der Zellen. (Caldas-Lopes, Cerchietti et al. 2009) Es wurden daher unten stehende Konzentrationen für den Vorversuch verwendet.

Die Zellen aller drei Zelllinien wurden ausgesät, nach 52 h Inkubationszeit bei 37 °C im Brutschrank mit PU-H71 in den Konzentrationen 0,5; 5; 50; 500; 5000; 50.000 nM behandelt. Nach weiteren 7 d Inkubationszeit mit Medikament erfolgte der WST-Proliferationsassay.

Jede Konzentration und Kontrolle wurde in Triplets angesetzt. Es wurden immer Kontrollen ohne Behandlung durchgeführt. Eine weitere Kontrolle wurde mit DMSO angesetzt in derselben Konzentration (maximal 0,05%), in der DMSO in den Medikamentenansätzen zugesetzt wurde.

### **7.6.3. Vorversuch DMSO und unbehandelte Kontrolle**

Um zu sehen, ob DMSO als Substanz Auswirkungen auf die Proliferation der Zellen hat, wurden DMSO und unbehandelte Kontrollen im Vergleich ausgewertet. Hierbei wurden die höchsten DMSO-Konzentrationen von maximal 0,05% verwendet, die auch in der Behandlung mit CCT018159 verwendet wurden. Der Versuchsaufbau, -ablauf und die Auswertung erfolgte wie in 7.6.4. beschrieben.

Es wurde für diesen Versuch die höchste Konzentration an DMSO verwendet, die auch bei der Behandlung mit CCT018159 verwendet wurde.

#### 7.6.4. Ablauf des WST-Proliferationsassays

Es erfolgte Ernten und Zählen der Zellen nach oben beschriebenem Schema (Seite 15). Danach wurden die Zellen in 96-Well-Platten (800 Zellen pro Well, 100 µl Medium pro Well) ausplattiert. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C erfolgte ein Hitzeschock für 90 min bei 41,8 °C bzw. 43 °C im Brutschrank, danach weitere Inkubation bei 37 °C. 4 h nach Hitzeschock erfolgte die Applikation der HSP 90-Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen. Danach erfolgte die Inkubation bei 37 °C im Brutschrank für weitere 7 d. Im Anschluss erfolgte die Messung mittels WST-Assay: Applikation von 10 µl Reagenz pro Well (entspricht einer Verdünnung von 1:10), nach einer Stunde Inkubation im Brutschrank bei 37 °C Messung im SPECTROstar.

Jede Behandlungsbedingung und Kontrolle wurde in Triplets angesetzt. Es wurden immer Kontrollen ohne Behandlung durchgeführt. Eine weitere Kontrolle wurde mit DMSO angesetzt in derselben Konzentration (maximal 0,05%), in der DMSO in den Medikamentenansätzen zugesetzt wurde.

#### Ablauf



**Abbildung 3:** Ablauf des Proliferationsassays

#### 7.6.5. Auswertung des WST-Proliferationsassays

In jedem einzelnen Versuch wurden Werte-Triplets angesetzt und gemessen. Diese Triplet-Versuche wurden wiederum dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

Normiert wurden die Messergebnisse auf die jeweiligen Mediumkontrollen ohne Zellen des entsprechenden Versuchs und durch Division wurden die Werte der unterschiedlichen Behandlungsbedingungen auf die Mittelwerte der jeweiligen DMSO-Kontrollen derselben Temperatur bezogen. Hierdurch werden die Messergebnisse wie bei den Viabilitätsassays und den klonogenen Assays um den rein durch die Hitzebehandlung verursachten toxischen Effekt korrigiert. Eine relevante Verstärkung oder Abschwächung der Kombinationsbehandlung kann somit bei Auseinanderdriften der unterschiedlichen Temperatur-Überlebenskurven angenommen werden. Es wurde aus den Triplets der drei Versuche der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) für jede Behandlungsbedingung berechnet.

## 7.7. Western Blot

Durch Western Blots erfolgte die spezifische Untersuchung der Expression verschiedener Hitzeschockproteine.

### 7.7.1 Vorbehandlung der Zellen

Es erfolgte eine entsprechende Vorbehandlung der Zellen:

Für den Versuch der Dynamik der HSP-Expression nach Hitzeschock:

Die Zellen wurden in T 25 Flaschen ausgesät (0,7 Mio. Zellen pro Flasche), danach erfolgte die Inkubation bei 37 °C im Brutschrank. Die konfluenten Zellkulturen wurden im Anschluss bei 43 °C für 90 min inkubiert. Bis zur Proteinisolation nach den Zeitintervallen von 0 h, 1 h, 2 h, 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 48 h und 72 h wurden die Zellen wieder bei 37 °C kultiviert. Als Kontrollen wurden Zellen ausgesät und parallel ohne Hitzeschock kultiviert und geerntet.

Für den Versuch der Untersuchung der Signaltransduktionswege unter Behandlung mit HSP 90-Inhibitor:

Die Zellen wurden in T 25 Flaschen ausgesät (1 Mio. Zellen pro Flasche), danach erfolgte Inkubation bei 37 °C im Brutschrank. Die konfluenten Zellkulturen wurden nach 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von 17-AAG, CCT018159 und PU-H71 behandelt und anschließend für 24 h bei 37 °C inkubiert. Als Kontrollen wurden Zellen ausgesät und mit der gleichen Konzentration an DMSO versetzt, wie in den mit Medikamenten behandelten Flaschen (maximal 1% DMSO)

### 7.7.2. Proteinisolation und -Messung:

Das überständige Medium wurde verworfen und die Proben auf Eis gestellt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit Trypsin geerntet, die Reaktion mit Abstopmedium (mit 10% FCS, siehe 7.1.2.) abgestoppt und in ein 50 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Anschließend folgten Zentrifugation (3 min, 300 g), Aufnahme in 1 ml PBS, und Überführung in ein 1,5 ml Eppendorftube. Hier folgten nochmals Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes. Die Pellets konnten gegebenenfalls bei -20 °C eingefroren werden.

Die Weiterverarbeitung beginnt mit dem Vermengen der auf Eis stehenden Zellpellets mit 100 µl des Puffers (dieser besteht aus 10µl EDTA und 10 µl Protease-/Phosphataseinhibitor) auf 1 ml Lysispuffer (1:10). Danach erfolgte die 15-minütige Inkubation auf Eis. Dann erfolgte Behandlung mit Ultraschall, um die Zellen aufzuschließen. Im Anschluss eine erneute 10-minütige Inkubation auf Eis, dann Zentrifugation bei 4 °C (10 min, 13.000 g). Im Anschluss die Überführung des proteinhaltigen Überstandes in neue Eppendorftubes.

Die Proteinmessung erfolgte mit der BCA-Methode mit Hilfe des *Pierce BCA Protein Assay-Kits*. Dazu wurden die Proben und entsprechenden Standards mit den entsprechenden working-solutions versetzt, für 30 min bei 37 °C inkubiert, und nach ca. 10 min Abkühlzeit im Plattenphotometer gemessen.

Anschließend erfolgte eine Verdünnung der Proben mit Lysispuffer auf eine Konzentration von 1µg Protein/µl Probe. Anschließend wurden die Proben mit 25 µl Loadingpuffer versetzt. Im Anschluss wurden sie im Heizblock 10 min bei 95°C denaturiert.

Die SDS-Page (Sodium-dodecylsulfat) ermöglicht die elektrophoretische Auftrennung der Proteine nahezu nur nach ihrer Masse, da durch das in die Proteine eingelagerte SDS die Eigenladung der Proteine überdeckt wird und die Proteine hierdurch eine SDS-vermittelte mit der Proteingröße korrelierende negative Ladung aufweisen.

Für die SDS-PAGE wurden die Proben kurz abzentrifugiert und gevortext.

Es wurden 1,5 mm dicke Gele in der Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele nach Maniatis (Maniatis T., Sambrook J. et al. 1982) verwendet. Die Proben, sowie der Standard (Protein Marker *Kaleidoskope*) wurden auf das in SDS Gel aufgeladen. Der Lauf erfolgte in Elektrophorese Puffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% SDS, pH 8,2-8,3) mit der *Mini Trans-Blot Cell Anlage* bei 75 V für 15 min, anschließend bei 120 V für 1 h 45 min.

### **7.7.3. Western Blot**

Die mittels SDS Page getrennten Proteine wurden mittels Nassblot-Apparatur auf eine Nitrozellulose-Membran (Porendurchmesser 0,45 µm) transferiert.

Aufbau der Nassblot-Apparatur in Gel-Transferpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% Methanol).

Die Übertragung auf die Nitrozellulosemembran erfolgte durch eine horizontale Elektrophorese für min. 90 min bei 80 V.

Immunfärbung:

**Tabelle 9:** verwendete Antikörper  
(Cell signalling®)

Antikörper	Spezies	Verdünnung
Anti-HSP 90 (Anti HSP 90AA und HSP 90AB) (#E289)	Hase	1:1000
Anti- HSP 70 (#6B3)	Ratte (IgG1)	1:1000
Anti HSC 70 (#D69)	Hase	1:1000
Anti HSP 27 (#G31)	Maus (IgG1)	1:1000
Monoklonaler $\beta$ -Actin-Antikörper (#8457)	Hase	1:1000
AKT Antikörper (AKTpan) (#9272)	Hase	1:1000
Phospho-AKT Antikörper (Ser473) (#4051)	Maus	1:1000
Phospho-AKT Antikörper (Threo308) (#9275)	Hase	1:1000
mTOR Antikörper (#2972)	Hase	1:1000
Phospho-mTOR Antikörper (mTOR 2448) (#2971)	Hase	1:1000
ERK Antikörper #4695	Hase	1:1000
Phospho-ERK Antikörper (ERK1/2, Thr 202/ Tyr 204) (#9102)	Hase	1:1000

Nach dem Blotten wurde die Nitrozellulosemembran mit TBS-T (0,2% Tris; 1,5 M NaCl; 0,05 % Tween; pH 7,4) gewaschen, anschließend wurde die Membran mit TBS-T und 5% Milchpulver für 45 min inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blocken. Danach folgten drei Waschgänge für jeweils 5 min mit TBS-T. Die Nitrozellulosemembran wurde über Nacht bei 4 °C unter ständigem Rollen mit dem ersten Antikörper inkubiert. Der Antikörper wurde in TBS-T mit 5% BSA verdünnt und jeweils 5 ml der Lösung pro Membran eingesetzt.

Am nächsten Tag erfolgte wieder mehrmaliges Waschen mit TBS-T. Anschließend folgte die Inkubation mit dem sekundären HRP-konjugierten Antikörper, verdünnt in TBS-T mit 5% Milchpulver für 1 h.

Die Membranen wurden mit Hilfe des Western-Blot Detection Reagent nach mehreren Belichtungszeiten entwickelt. Die Entwicklung erfolgte im Optimax X-Ray Film Processor. Der Proteinstandard (Protein Marker, *Kaleidoskope*, BioRad) wurde als Vergleich in die entwickelten Folien eingezeichnet, um die Größe der Proteine ablesen zu können und sie damit genau zu identifizieren.

#### **7.7.4. Auswertung des Western Blots**

Die semiquantitative densitometrische Auswertung erfolgte mittels Image J: Die Fotografie der Proteinbanden diente als Vorlage für die Generierung von Histogrammen und Berechnung des Volumens mittels Image J.

Für den Versuch der Dynamik der HSP-Expression nach Hitzeschock:

Die Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Standardisiert wurden die Werte auf die Werte bei 37 °C. Aus diesen Werten wurde der Mittelwert der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) für jede Erholungszeit gebildet.

Für den Versuch der Untersuchung der Signaltransduktionswege unter Behandlung mit HSP 90-Inhibitor:

Die Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Als Kontrolle diente beta-Actin. Für jedes Experiment wurde der Quotient phosphoryliertes Protein/Protein gebildet. Dieses wurde dann zur Standardisierung auf den Quotienten phosphoryliertes Protein/Protein der unbehandelten Kontrolle bezogen. Aus diesen Werten wurde der Mittelwert gebildet. Die Standardabweichung der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) wurde aus den standardisierten Werten bestimmt.

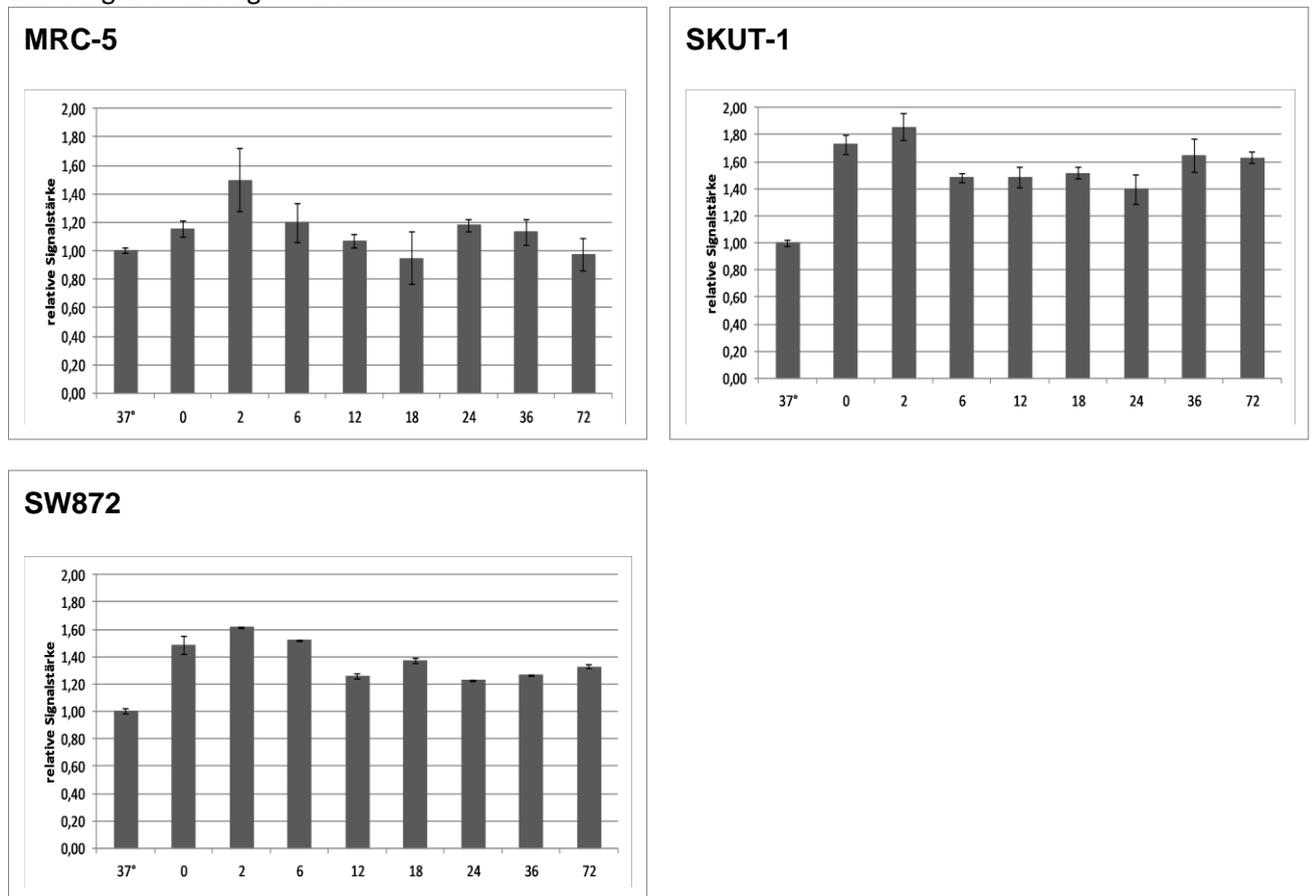
## 8. Ergebnisse

### 8.1. Dynamik der Hitzeschockproteine

Drei verschiedene Zelllinien (SW872 (Liposarkomzellen), SKUT-1(Leiomyosarkomzellen) und MRC-5 (Fibroblasten)) wurden mit 43° für 90 min behandelt und nach verschiedenen Erholungszeiten (0, 2, 6, 12, 18, 24, 36, 72h) in Bezug auf die induzierte Expression von Hitzeschockproteinen untersucht. Bestimmt wurden hierbei die Konzentrationen von HSP 27, HSP 70, HSC 70 und HSP 90.

#### 8.1.1. HSP 90

In Abbildung 4 ist die Dynamik der HSP 90-Expression nach Hitzeschock nach verschiedenen Erholungszeiten dargestellt.



**Abbildung 4:** Hitzeschockprotein 90 (HSP 90AA und HSP90 AB) der drei Zelllinien MRC-5 (Fibroblasten), SKUT-1 (Leiomyosarkom) und SW872 (Liposarkom).

Der Hitzeschock erfolgte mit 43°C für 90 min. Die Balken entsprechen der relativen Expression zu den auf der X-Achse angegebenen Zeitpunkten der Erholungszeit nach dem Hitzeschock. Mittelwert und SEM der relativen Proteinexpression wurde jeweils von drei unabhängigen Wiederholungen mit Image J semiquantitativ densitometrisch ermittelt.

Es zeigt sich bei den untersuchten Zellen zu fast allen Erholungszeiten nach dem Hitzeschock eine relative Zunahme der HSP 90 Expression.

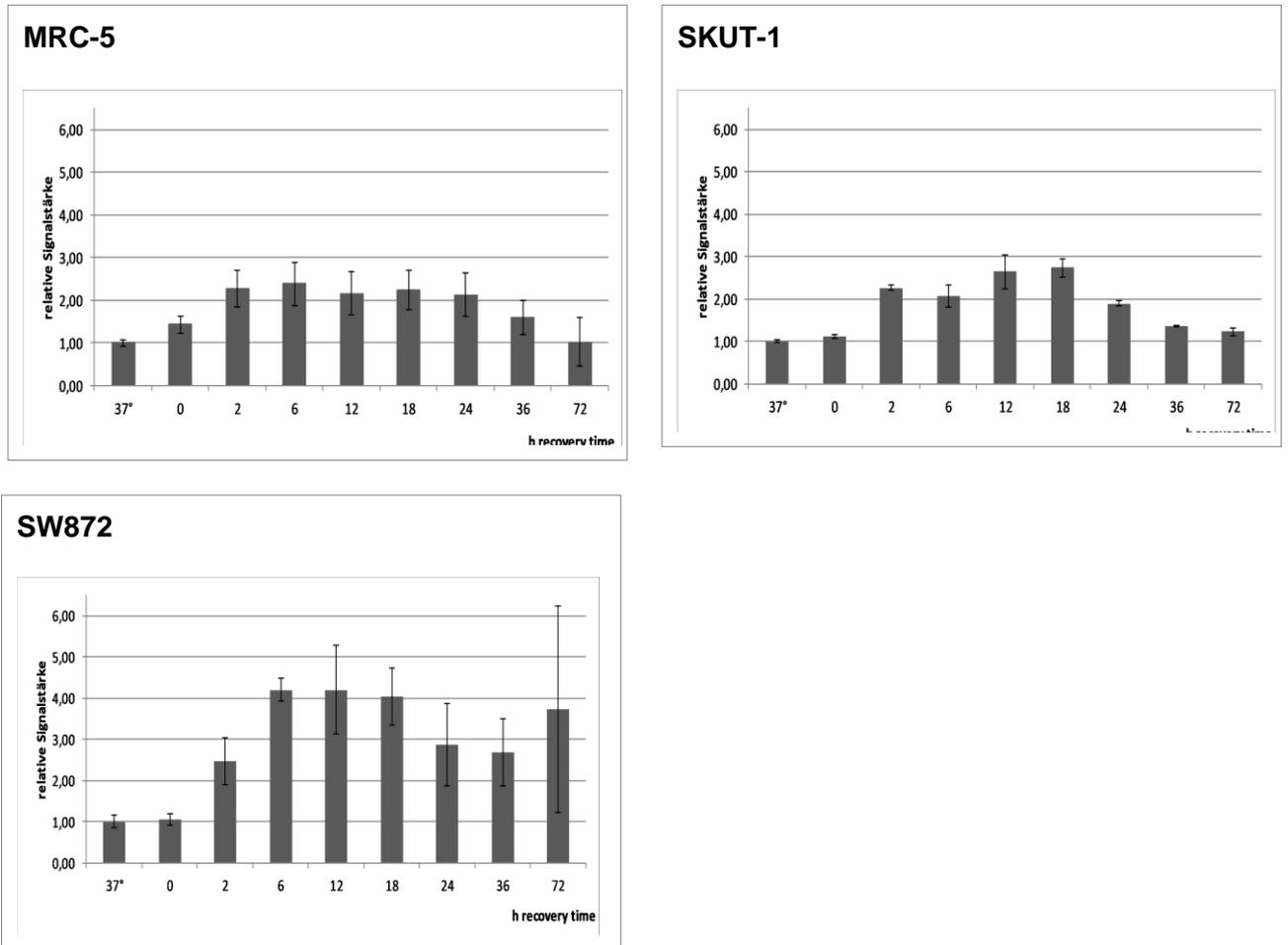
Der Verlauf der Balken in Abbildung 4 zeigt bei den drei Zelllinien zwei peaks. Ein peak - bei zwei Stunden Erholungszeit – zeigt sich bei allen drei untersuchten Zelllinien. Bei den Fibroblasten MRC-5 zeigt sich der zweite peak bei 24 Stunden. Bei den Leiomyosarkomzellen SKUT-1 zeigt sich der zweite peak etwas später- bei 36 Stunden. Bei den Liposarkomzellen SW872 zeigt sich der zweite peak deutlich früher, bereits bei 18 Stunden.

Die stärkste Zunahme der HSP 90 Expression ist bei den Leiomyosarkomzellen SKUT-1 zu sehen. Hier zeigt sich nach zwei Stunden Erholungszeit nahezu eine Verdopplung der HSP Expression.

Die Fibroblasten MRC-5 zeigen nach 72 Stunden Erholungszeit einen Rückgang der HSP Expression auf nahezu den Ausgangswert.

### 8.1.2. HSP 70

Abbildung 5 zeigt die Dynamik der HSP 70-Expression nach Hitzeschock nach verschiedenen Erholungszeiten.



**Abbildung 5:** Hitzeschockprotein 70 der drei Zelllinien MRC-5 (Fibroblasten), SKUT-1 (Leiomyosarkom) und SW872 (Liposarkom). Der Hitzeschock erfolgte mit 43°C für 90 min. Die Balken entsprechen der relativen Expression zu den auf der X-Achse angegebenen Zeitpunkten der Erholungszeit nach dem Hitzeschock. Mittelwert und SEM der relativen Proteinexpression wurde jeweils von drei unabhängigen Wiederholungen mit Image J semiquantitativ densitometrisch ermittelt.

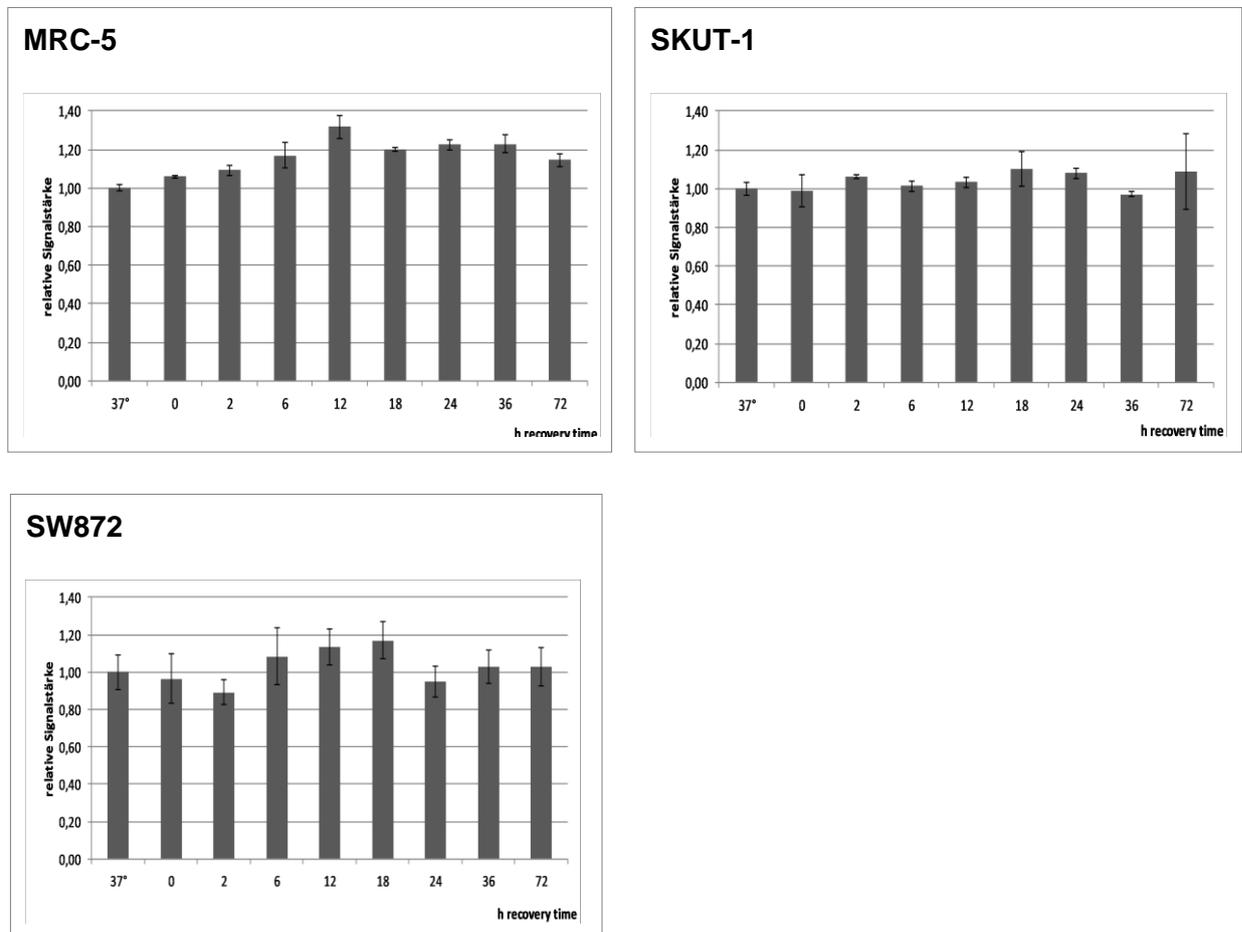
HSP 70 zeigt bei allen drei Zelllinien eine deutlich vermehrte Expression nach Hitzeschock.

Die stärkste Zunahme der HSP 70 Expression zeigt sich bei den Liposarkomzellen SW872. Man sieht eine Zunahme der Expression auf das Vierfache im Vergleich zu den nicht erhitzten Zellen.

Die HSP 70 Expression zeigt im Verlauf der Erholungszeiten ebenfalls einen deutlich ausgeprägten peak. Dieser ist bei allen drei untersuchten Zelllinien zwischen 6 und 18 Stunden. Er ist im Vergleich zur HSP 90 Expression (Abbildung 4) ausgeprägter und länger anhaltend.

### 8.1.3. HSC 70

In Abbildung 6 ist die Dynamik der HSC 70-Expression nach Hitzeschock nach verschiedenen Erholungszeiten dargestellt.



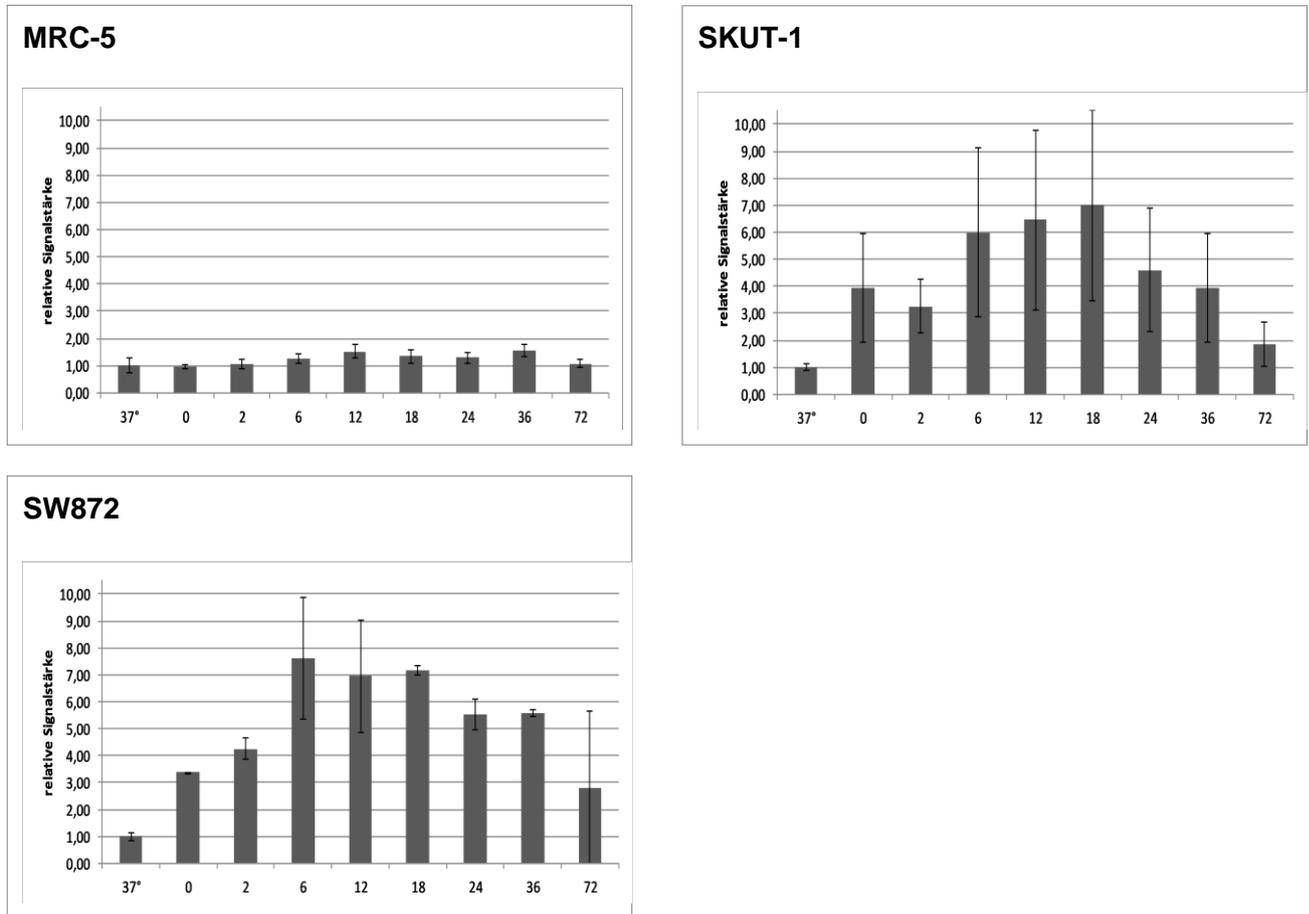
**Abbildung 6:** HSC 70 der drei Zelllinien MRC-5 (Fibroblasten), SKUT-1 (Leiomyosarkom) und SW872 (Liposarkom). Der Hitzeschock erfolgte mit 43°C für 90 min. Die Balken entsprechen der relativen Expression zu den auf der X-Achse angegebenen Zeitpunkten der Erholungszeit nach dem Hitzeschock. Mittelwert und SEM der relativen Proteinexpression wurde jeweils von drei unabhängigen Wiederholungen mit Image J semiquantitativ densitometrisch ermittelt.

HSC 70 zeigt bei keiner der Zelllinien eine auffällige Änderung der Expression nach Hitzeschock.

Es zeigt sich ebenfalls kein auffälliger Unterschied in der HSC 70 Expression bei verschiedenen Erholungszeiten.

### 8.1.4. HSP 27

Abbildung 7 zeigt die Dynamik der HSP 27-Expression nach Hitzeschock nach verschiedenen Erholungszeiten.



**Abbildung 7:** Hitzeschockprotein 27 der drei Zelllinien MRC-5 (Fibroblasten), SKUT-1 (Leiomyosarkom) und SW872 (Liposarkom).

Der Hitzeschock erfolgte mit 43°C für 90 min. Die Balken entsprechen der relativen Expression zu den auf der X-Achse angegebenen Zeitpunkten der Erholungszeit nach dem Hitzeschock. Mittelwert und SEM der relativen Proteinexpression wurde jeweils von drei unabhängigen Wiederholungen mit Image J semiquantitativ densitometrisch ermittelt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean, SEM).

In Abbildung 7 zeigt HSP27 nach Hitzeschock bei allen drei Zelllinien eine vermehrte Expression. Bei den Sarkomzellen ist die Zunahme der Expression ausgeprägter als bei den Fibroblasten.

Es lässt sich ein deutlicher peak im Verlauf der verschiedenen Erholungszeiten ausmachen: bei 6-18 Stunden Erholungszeit zeigt sich die stärkste Ausprägung der Expression bei allen drei Zelllinien.

Die stärkste Zunahme der Expression zeigt sich bei den Liposarkomzellen SW872. Hier ist eine Zunahme auf das Achtfache zu beobachten. Jedoch sind die Messergebnisse stärkeren Schwankungen unterworfen, wie die größeren Fehlerbalken anzeigen.

Bei den Fibroblasten MRC-5 zeigt sich eine deutlich schwächere Zunahme auf etwa das Anderthalbfache der Expression.

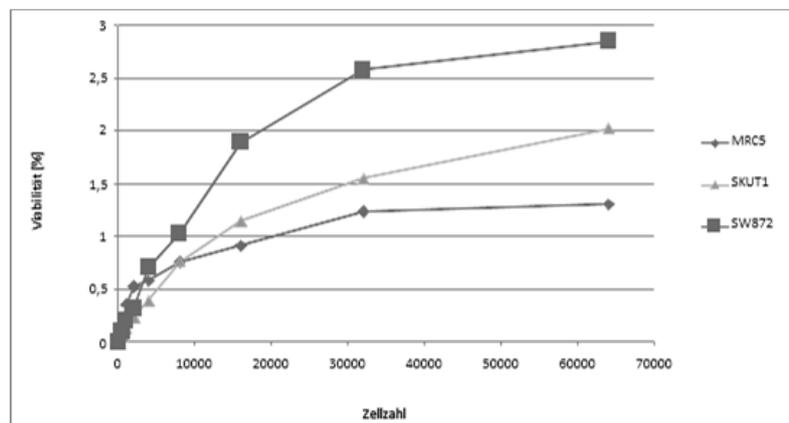
## 8.2. WST Viabilitätsassay

Für die Untersuchung, ob die Wirkung von HSP 90-Inhibitoren in Kombination mit Hitzeschock verstärkt wird, wurden Viabilitätsassays mit Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872, sowie mit Fibroblasten MRC-5 durchgeführt. Dabei wurden die Zellen nach 24 h mit dem HSP 90-Inhibitor behandelt und nach weiteren 24 h für 90 min mit 41,8 °C bzw. 43 °C im Brutschrank erhitzt. Nach 4 d wurde die Viabilität mit Hilfe des WST-Assays gemessen.

### 8.2.1. Vorversuch: Bestimmung der optischen Dichte der einzusetzenden Zellzahl pro Well

Um den WST-Viabilitätsassay aussagekräftig durchzuführen, mussten Vorversuche unternommen werden, um eine ideale Anzahl von Zellen pro Well zu bestimmen. Es sollte eine Zellzahl ausgewählt werden, die eine Messung der Zellen unter idealen Kulturbedingungen ermöglicht.

In Abbildung 8 ist daher die optische Dichte der verschiedenen Zellzahlen der drei Zelllinien gezeigt:



**Abbildung 8:** Einzusetzende Zellzahl pro well eines 4-d-Viabilitätsassays

Dargestellt ist die Viabilität der Zellen, gemessen mittels WST Messung der drei untersuchten Zelllinien, 4 d nachdem die auf der Abszisse angegebenen Zellzahlen ausgesät wurden.

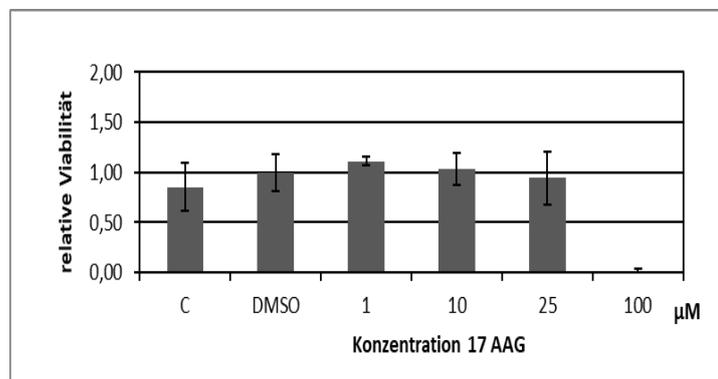
In Abbildung 8 ist der annähernd lineare Verlauf der untersuchten Zelllinien bei Zellzahlen zwischen 0 und 5.000 Zellen pro Well gut sichtbar. Für den Viabilitätsassay wurde daher eine Zellzahl von 5.000 Zellen gewählt.

## 8.2.2. Vorversuch Medikamentenkonzentrationen

Es wurden weiterhin Vorversuche durchgeführt, um den Bereich der idealen Medikamentenkonzentration zu finden. Es wurde sich hierfür an Literaturwerten orientiert (siehe 7.4.2.).

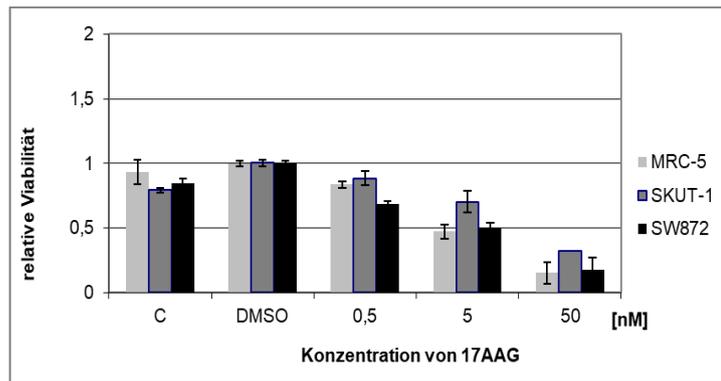
### 8.2.2.1. 17-AAG

Für die gewählten Konzentration des ersten Versuches wurde sich an publizierten Vorversuchen orientiert, und es wurden Konzentrationen von 17-AAG von 1  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  gewählt. (Sausville E.A., Tomaszewski J.E. et al. 2003) Diese Konzentrationen zeigten in ersten Vorversuchen mit 24 stündiger Exposition nur sehr geringe Wirksamkeit, bei der höchsten Konzentration jedoch einen sehr abrupten Abfall der Viabilität (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Relative Viabilität von Leiomyosarkomzellen SKUT-1 Zellen nach 24 Stunden Behandlung mit 17-AAG. Auf der Y-Achse ist die relative Viabilität dargestellt (Mittelwert und SEM dreier unabhängiger Experimente), die X-Achse zeigt die unterschiedlichen Medikamentenkonzentrationen der Behandlung mit 17-AAG.

Es zeigt sich ein sehr abrupter Abfall der Viabilität bei der höchsten Konzentration. Da ein sukzessiver Abfall für weitere Untersuchungen genauere Beobachtungen zulässt, wurden zusätzlich geringere Konzentrationen für die folgenden Versuche gewählt (Abbildung 10). Da 17-AAG in klinischen Studien über mehrere Tage verabreicht wird (Saif, Erlichman et al. 2013) wurde weiterhin eine längere Expositionsdauer von 3 d bei niedrigeren Konzentrationen gewählt.



**Abbildung 10:** Relative Viabilität von Fibroblasten MRC-5, Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872 nach 3 d Behandlung mit 17-AAG. Auf der Y-Achse ist die relative Viabilität dargestellt (Mittelwert und SEM dreier unabhängiger Experimente), die X-Achse zeigt die unterschiedlichen Medikamentenkonzentrationen der Behandlung mit 17-AAG.

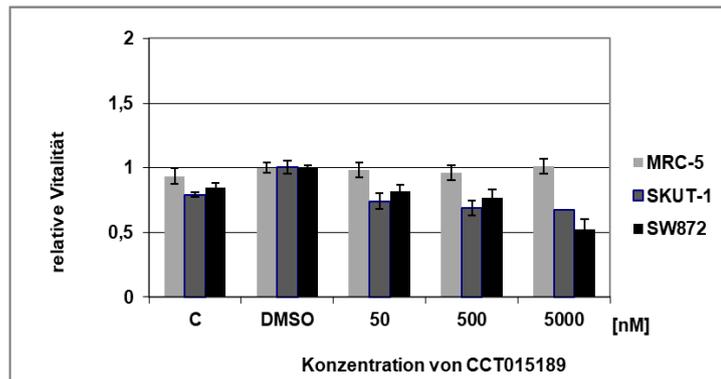
In Abbildung 10, d.h. nach 3 d Expositionsdauer, zeigte sich die gewünschte stärkere Reduktion (im Vergleich zur Abbildung 12, d.h. nach 24 Stunden Expositionsdauer) der Viabilität der Zellen für den gewählten Konzentrationsbereich. Diese Konzentrationen und die Expositionsdauer wurden daher für die weiteren Versuche ausgewählt.

Weiterhin zeigt sich in dieser Abbildung, dass kein relevanter Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrolle und der DMSO-Kontrolle besteht.

### 8.2.2.2. CCT018159

Ähnlich dem Vorversuch von 17-AAG wurden auch für den HSP 90-Inhibitor CCT018159 Vorversuche durchgeführt, um eine für die Versuche sinnvolle Medikamentenkonzentration einsetzen zu können.

Auch hierbei bot die Orientierung an Literaturwerten die entsprechende Grundlage. (Sharp S. Y., Boxall K. et al. 2007) Der Versuch wurde im Hinblick auf die klinische Anwendung jedoch gleich mit höherer Zeitdauer (Viabilitätsassay über 4 d) durchgeführt:



**Abbildung 11:** Relative Viabilität von Fibroblasten MRC-5, Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872 nach 3 d Behandlung mit CCT018159. Auf der Y-Achse ist die relative Viabilität dargestellt (Mittelwert und SEM dreier unabhängiger Experimente), die X-Achse zeigt die unterschiedlichen Medikamentenkonzentrationen der Behandlung mit CCT018159.

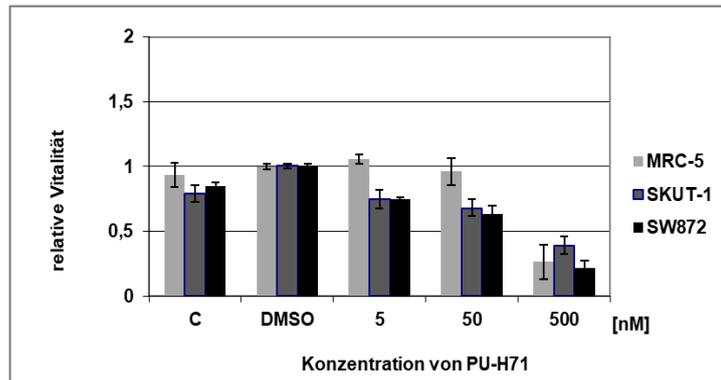
In Abbildung 11 zeigt sich die gewünschte Reduktion der Viabilität bei den Sarkomzelllinien SKUT-1 und SW872 für den gewählten Konzentrationsbereich. Die Fibroblasten MRC-5 hingegen zeigen hier keinen Abfall der relativen Viabilität. Aufgrund der Reduktion der Viabilität der Sarkomzelllinien wurden diese Konzentrationen und die Expositionsdauer von 3 d daher für die weiteren Versuche ausgewählt.

Weiterhin zeigt sich auch in dieser Abbildung, dass kein relevanter Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrolle und der DMSO-Kontrolle besteht.

### 8.2.2.3. PU-H71

Ähnlich dem Vorversuch von CCT018159 wurden auch für PU-H71 entsprechende Vorversuche durchgeführt, um Medikamentenkonzentrationen zu finden, die eine Untersuchung der Reaktion der Zellen auf das Medikament ermöglichen.

Auch hierbei bot die Orientierung an Literaturwerten die entsprechende Grundlage. (Nayar, Lu et al. 2013) Der Versuch wurde im Hinblick auf die klinische Anwendung jedoch ebenfalls direkt mit höherer Zeitdauer (Viabilitätsassay über 4 d) durchgeführt:



**Abbildung 12:** Relative Viabilität von Fibroblasten MRC-5, Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872 nach 3 d Behandlung mit PU-H71. Auf der Y-Achse ist die relative Viabilität dargestellt (Mittelwert und SEM dreier unabhängiger Experimente), die X-Achse zeigt die unterschiedlichen Medikamentenkonzentrationen der Behandlung mit PU-H71.

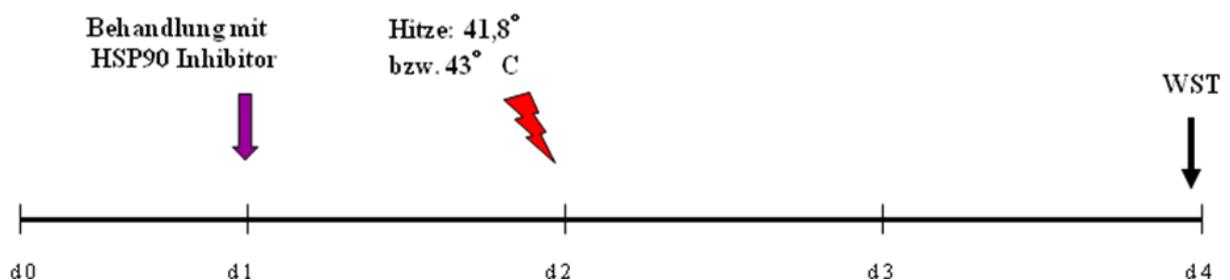
Es zeigt sich die gewünschte Reduktion der Viabilität aller Zellen für den gewählten Konzentrationsbereich. Diese Konzentrationen und die Expositionsdauer von 3 d wurden daher für die weiteren Versuche ausgewählt.

Auch hier zeigt sich, wie bei 17-AAG und CCT018159, kein relevanter Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrolle und der DMSO-Kontrolle.

### 8.2.3. Kombination von klinisch relevantem Hitzeschock und HSP 90-Inhibitor

Um eine Wirkungsverstärkung der Kombination von Hitzeschock und der HSP 90-Inhibitoren zu untersuchen, wurde die Viabilität der Zellen mittels WST-Assay gemessen: In Experimenten mit den drei verschiedenen HSP 90-Inhibitoren wird der Effekt der Kombination von Hitzeschock mit der des Medikaments bestimmt.

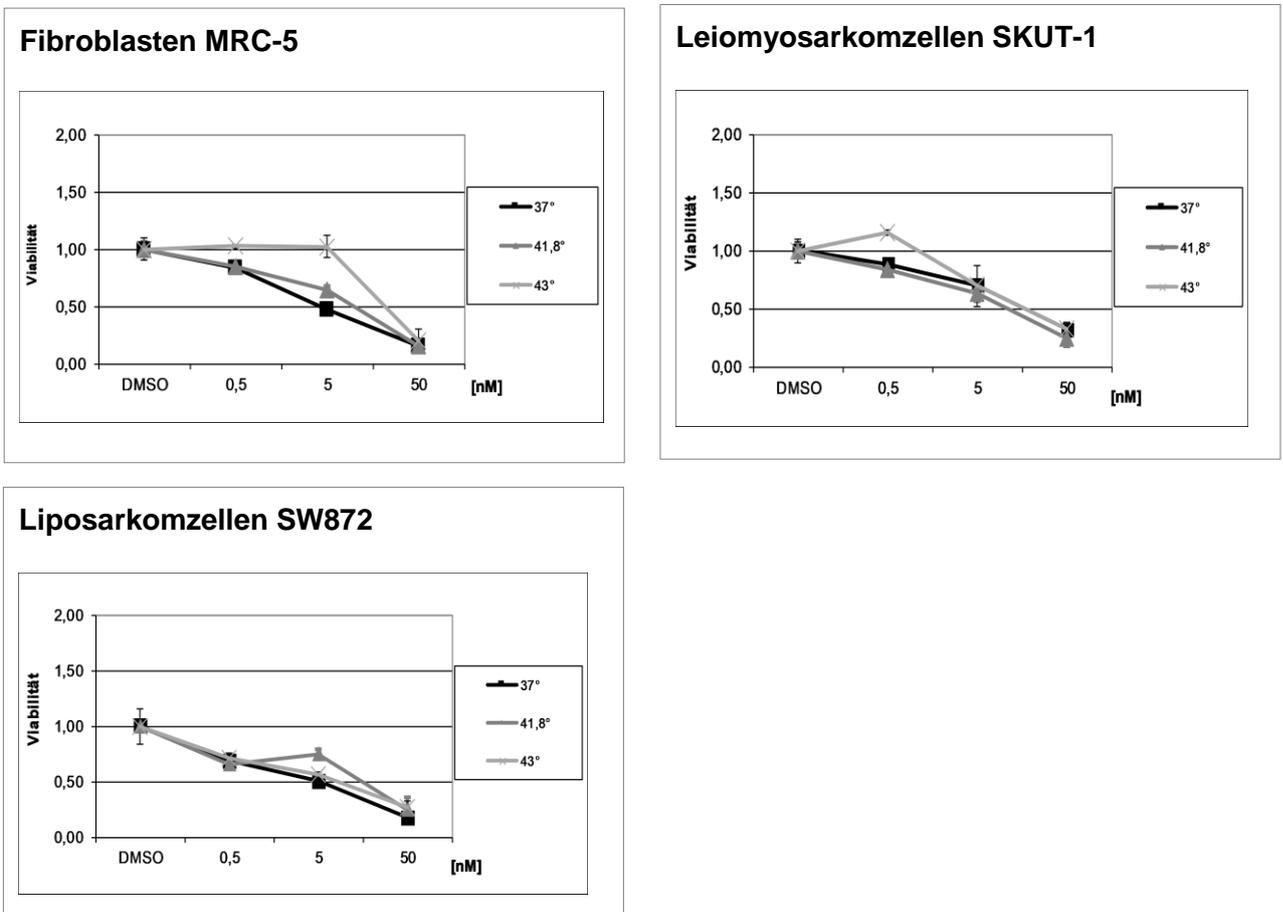
Die Behandlung erfolgte mit den drei verschiedenen HSP 90-Inhibitoren, darauffolgend der Hitzeschock:



**Abbildung 13:** Ablauf des Viabilitätsassays

#### 8.2.3.1. 17-AAG

In Abbildung 14 wird die Viabilität der drei Zelllinien (Fibroblasten MRC-5, Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872) unter Kombinations-behandlung Hitze und 17-AAG gezeigt:



**Abbildung 14:** Behandlung von Fibroblasten MRC-5, Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872 mit 17-AAG, sowie in Kombination mit Hitze.

Messung des Viabilität nach 4 d. Die Y-Achse zeigt die relative Viabilität der Zellen (Mittelwert und SEM dreier unabhängiger Experimente), die X-Achse die unterschiedlichen Medikamentenkonzentrationen. Der Verlauf mit den quadratischen Markierungen entspricht einer Behandlung ohne Hitzeschock. Die Verläufe mit Dreiecken und Kreuzen entsprechen der Kombination von 17-AAG mit Hitzeschock bei 41,8 °C, bzw. 43 °C für 90 min.

In Abbildung 14 zeigt sich, dass alle drei Zelllinien auf die Behandlung mit 17-AAG reagieren. Es zeigt sich ein deutlicher Abfall der Viabilität unter steigenden Konzentrationen an 17-AAG.

Bei Fibroblasten (MRC-5) zeigt sich im Bereich der mittleren Konzentration mit 17-AAG eher eine höhere Viabilität der bei 43°C erhitzten Zellen gegenüber den nicht, oder nur geringer erhitzten Zellen. Es zeigt sich ein Auseinanderdivergieren der hitzekorrigierten Kurven. Dieser Effekt ist bei der höchsten Konzentration nicht mehr nachweisbar. Die Hitze scheint also eher einen protektiven Effekt auf die Zellen auszuüben und die Wirkung der Inhibition abzumildern.

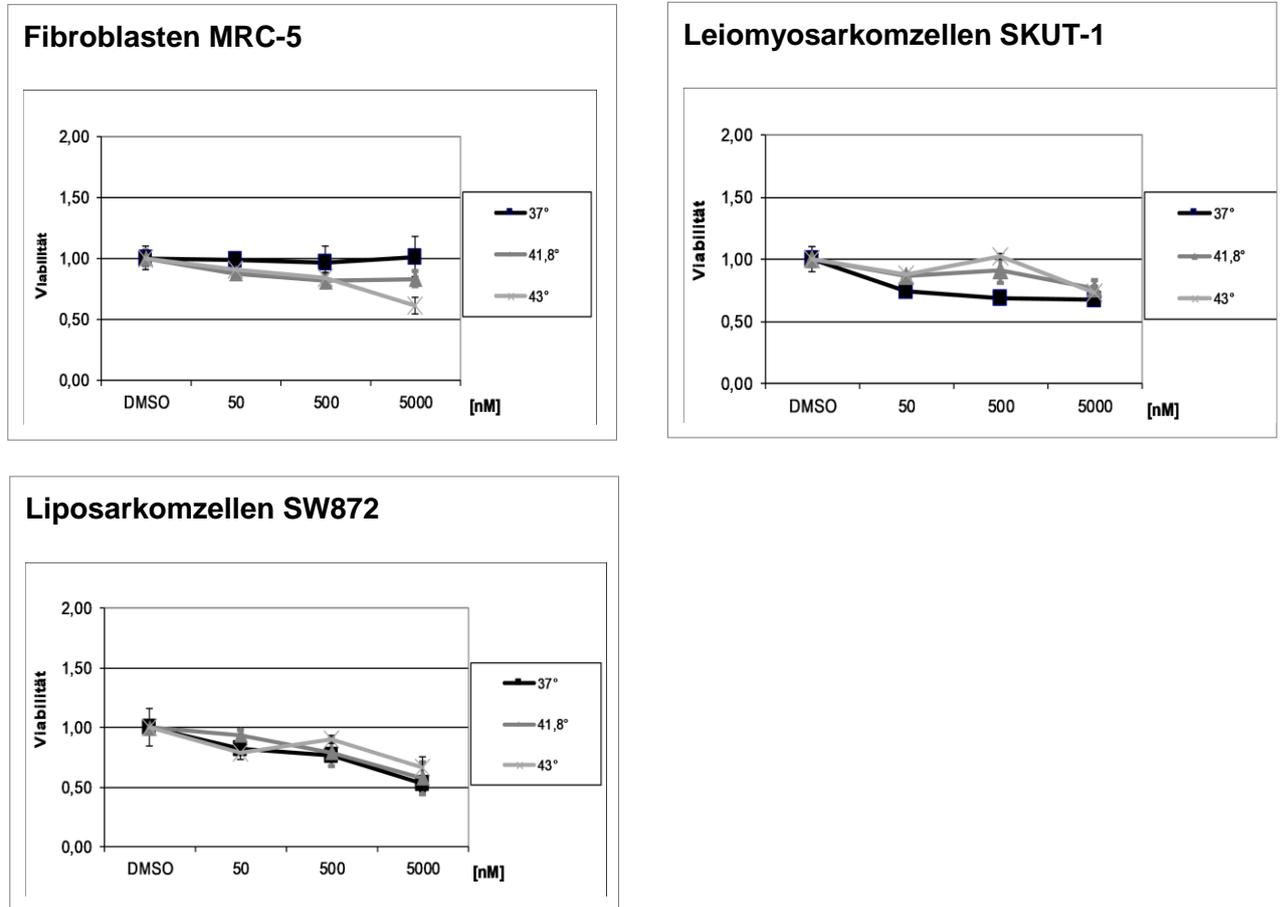
Bei den Leiomyosarkomzellen SKUT-1 zeigt sich dieser Effekt der höheren relativen Viabilität der erhitzten gegenüber den nicht erhitzten Zellen tendenziell in der schwachen Dosis, jedoch geringer

ausgeprägt. Hier sind die Standardabweichungen auch deutlich größer, sodass sich diesbezüglich keine sichere Aussage treffen lässt.

Bei den Liposarkomzellen SW872 schließlich zeigt sich kein auffälliger Unterschied der hitzebehandelten Zellen gegenüber den nicht mit Hitze behandelten.

### 8.2.3.2. CCT018159

In Abbildung 15 wird die Viabilität der drei Zelllinien unter Kombinationsbehandlung Hitze und CCT018159 gezeigt:



**Abbildung 15:** Behandlung von Fibroblasten MRC-5, Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872 mit CCT018159, sowie in Kombination mit Hitze. Messung der Viabilität nach 4 d. Die Y-Achse zeigt die relative Viabilität der Zellen (Mittelwert und SEM dreier unabhängiger Experimente), die X-Achse die unterschiedlichen Medikamenten-konzentrationen. Der Verlauf mit den quadratischen Markierungen entspricht einer Behandlung ohne Hitzeschock. Die Verläufe mit Dreiecken und Kreuzen entsprechen der Kombination von CCT018159 mit Hitzeschock bei 41,8 °C, bzw. 43 °C für 90 min.

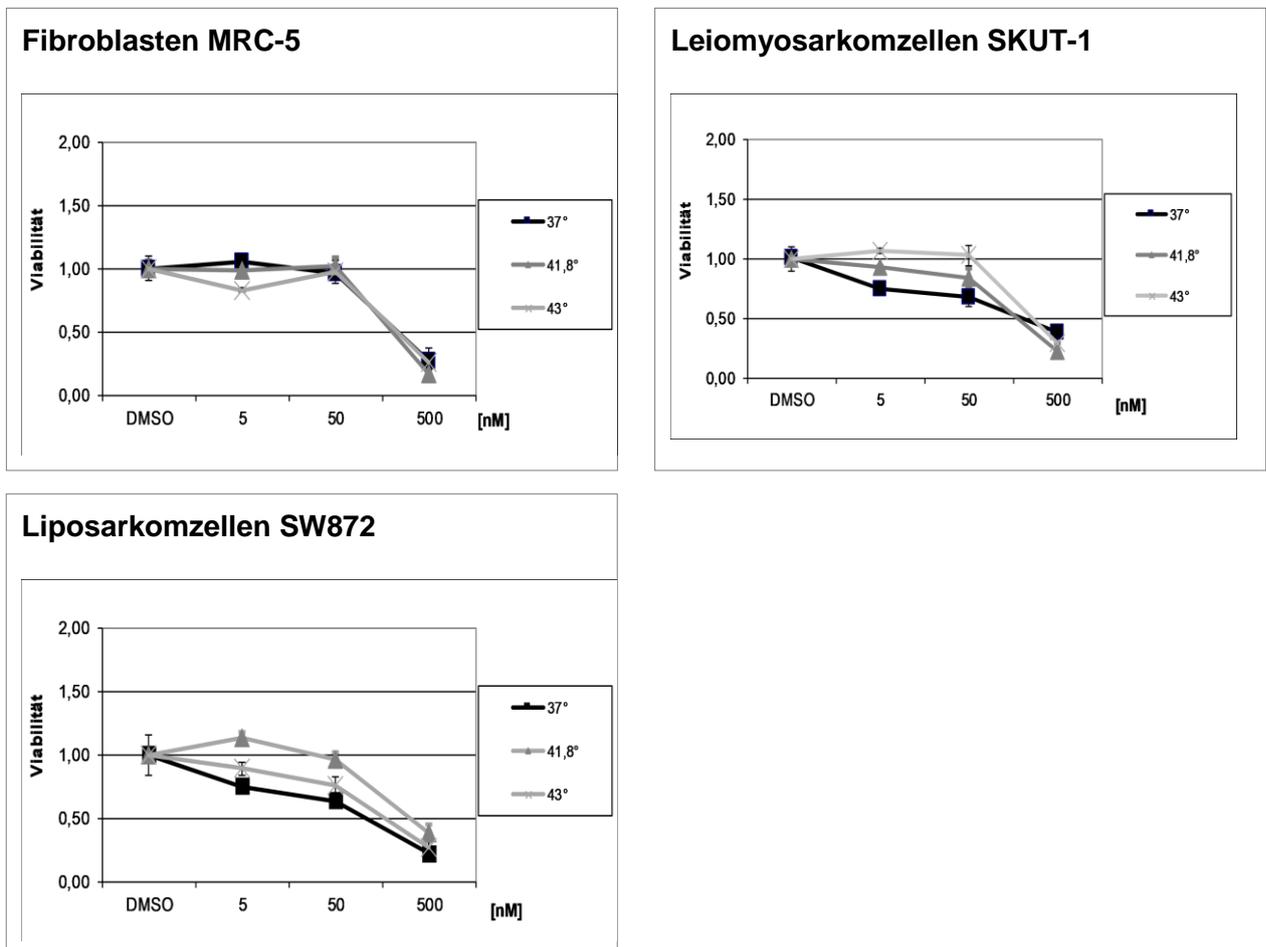
In Abbildung 15 zeigt sich, dass alle drei Zelllinien auf die Behandlung mit CCT018159 reagieren. Es zeigt sich ein deutlicher Abfall der Viabilität unter steigenden Konzentrationen an CCT018159. Die Fibroblasten MRC-5 zeigen, wie schon im Vorversuch, ein schlechtes Ansprechen auf die Medikamentenbehandlung. Die Behandlung mit CCT018159 führt insgesamt zu einer weniger deutlichen Reduktion der Viabilität als die Behandlung mit 17-AAG (Abbildung 14), was den Ergebnissen der Vorversuche entspricht.

Bei den Fibroblasten MRC-5 zeigt sich eine erhöhte relative Viabilität der nicht erhitzten Zellen bei steigenden Konzentrationen an CCT018159. Hier zeigt sich eine Verstärkung der Kombinationsbehandlung.

Die Liposarkomzellen SW872 reagieren auf die Behandlung mit CCT018159 schwächer als auf die Behandlung mit 17-AAG (Abbildung 14). Bei Leiomyosarkomzellen SKUT-1 zeigt sich im Bereich der mittleren Konzentration mit CCT018159 eher eine höhere relative Viabilität der erhitzten Zellen gegenüber den nicht, oder nur geringer erhitzten. Dieser Effekt ist bei der höchsten Konzentration nicht mehr nachweisbar. Die Hitze scheint auch hier einen protektiven Effekt auf die Zellen auszuüben. Dieser Effekt ist ähnlich wie bei der Behandlung mit 17-AAG (Abbildung 14). Bei den Liposarkomzellen SW872 schließlich zeigt sich kein Unterschied der hitzebehandelten Zellen gegenüber den nicht mit Hitze behandelten, wie bei der Behandlung mit 17-AAG

### 8.2.3.3. PU-H71

In Abbildung 16 wird die Viabilität der drei Zelllinien unter Kombinationsbehandlung Hitze – PU-H71 gezeigt.



**Abbildung 16:** Behandlung von Fibroblasten MRC-5, Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872 mit PU-H71, sowie in Kombination mit Hitze. Messung der Viabilität nach 4 d. Die Y-Achse zeigt die relative Viabilität der Zellen (Mittelwert und SEM dreier unabhängiger Experimente), die X-Achse die unterschiedlichen Medikamentenkonzentrationen. Der Verlauf mit den quadratischen Markierungen entspricht einer Behandlung ohne Hitzeschock. Die Verläufe mit Dreiecken

und Kreuzen entsprechen der Kombination von PU-H71 mit Hitzeschock bei 41,8 °C, bzw. 43 °C für 90 min.

In Abbildung 16 zeigt sich, dass alle drei Zelllinien auf die Behandlung mit PU-H71 reagieren. Es zeigt sich ein Abfall der Viabilität unter steigenden Konzentrationen an PU-H71.

Die Fibroblasten MRC-5 zeigen einen Abfall der Viabilität erst unter der höchsten Konzentrationen PU-H71.

Bei Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872 zeigt sich im Bereich der mittleren Konzentration mit PU-H71 eher eine höhere relative Viabilität der erhitzten Zellen gegenüber den nicht, oder nur geringer erhitzten. Es zeigt sich ein Auseinanderdivergieren der hitzekorrigierten Kurven. Dieser Effekt ist bei der höchsten Konzentration nicht mehr nachweisbar. Die Hitze scheint also auch hier einen protektiven Effekt auf die Zellen auszuüben. Dieser Effekt ist ähnlich wie bei den Leiomyosarkomzellen und der Behandlung mit 17-AAG (Abbildung 14) und CCT018159 (Abbildung 15).

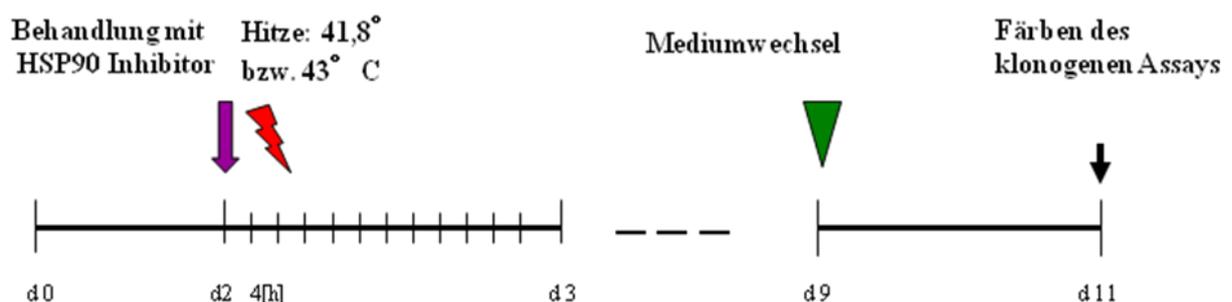
### 8.3. Klonogener Assay

Um die Klonogenität der Sarkomzellen nach Behandlung über einen längeren Zeitraum darzustellen, wurden klonogene Assays durchgeführt. Es wurde auch hier untersucht, ob die Wirkung von HSP 90-Inhibitoren in Kombination mit Hitzeschock verstärkt wird. Hierfür wurden klonogene Assays mit Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872 durchgeführt. Dabei wurden die Zellen nach 48 h mit dem HSP 90-Inhibitor behandelt und nach 4 h für 90 min mit 41,8 °C bzw. 43 °C im Brutschrank erhitzt. Nach insgesamt 11 d wurde die klonogenen Assays ausgezählt.

#### 8.3.1. Kombination von klinisch relevantem Hitzeschock und HSP 90 Inhibitor

Bei der Kombination Hitze und Inhibitorbehandlung wurden zwei der Inhibitoren (CCT018159 und PU-H71) an den beiden Sarkomzelllinien SW872 und SKUT getestet. Die Fibroblasten konnten nicht für klonogene Assays verwendet werden. Es ist anzunehmen, dass die dünne Aussaat wie für den klonogenen Assay erforderlich den Fibroblasten keine Kolonienbildung ermöglichte.

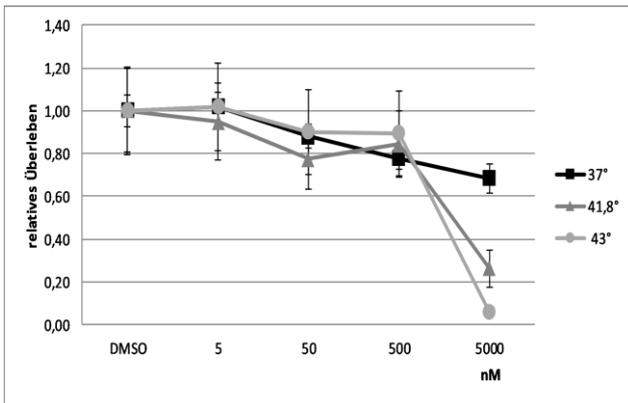
Es erfolgte die Behandlung mit dem HSP 90 Inhibitor, nach 4 h der Hitzeschock und 9 d nach Behandlung das Auszählen:



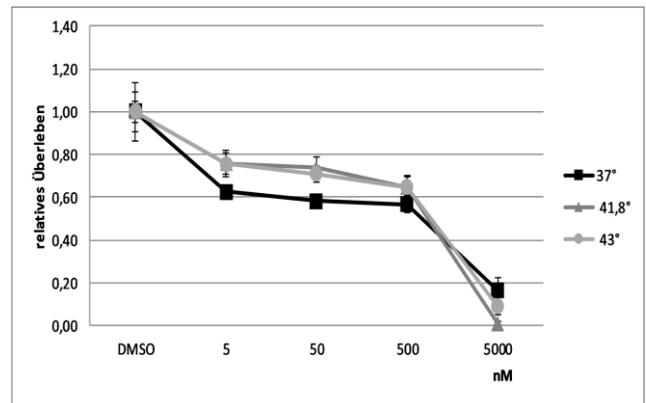
**Abbildung 17:** Ablauf des klonogenen Assays

**8.3.1.1. CCT018159**

In Abbildung 18 wird die Kombinationsbehandlung Hitze und CCT018159 an Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872 gezeigt.



**Leiomyosarkomzellen SKUT-1**



**Liposarkomzellen SW872**

**Abbildung 18:** Behandlung von Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872 mit CCT018159, sowie in Kombination mit Hitze. Messung des klonogenen Überlebens nach 11 d. Auf der Y-Achse ist das relative klonogene Überleben dargestellt (Mittelwert und SEM dreier unabhängiger Experimente), die X-Achse zeigt die unterschiedlichen Medikamentenkonzentrationen. Der Verlauf mit Vierecken entspricht den Zellen ohne Hitzeschock. Die Verläufe mit Dreiecken und Kreisen entsprechen der Kombination von CCT018159 mit Hitzeschock bei 41,8 °C, bzw. 43 °C für 90 min.

Es zeigt sich auch im klonogenen Assay eine deutliche Medikamentenwirkung bei den beiden Zelllinien. Es zeigt sich unter steigenden Konzentrationen CCT018159 ein deutlicher Abfall des klonogenen Überlebens.

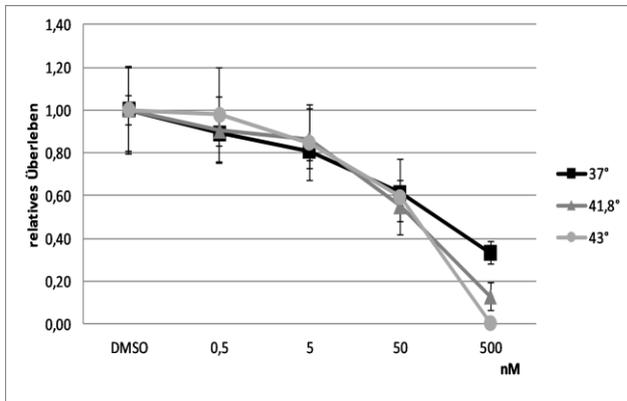
Im Bereich der höchsten Konzentration zeigt sich bei den Leiomyosarkomzellen SKUT-1 eine Wirkungsverstärkung der Kombinationsbehandlung bei der höchsten Konzentration mit CCT018159 durch ein Auseinanderdriften der unterschiedlichen Temperaturkurven.

Bei den Liposarkomzellen SW872 zeigt sich im niedrigen Konzentrationsbereich von 5- 500 nM eher ein Vorteil im klonogenen Überleben der bei 41.8 °C und 43 °C erhitzten Zellen gegenüber den nicht, oder nur geringer erhitzten. Die Hitze scheint also auch hier eher einen protektiven Effekt auf die Zellen auszuüben.

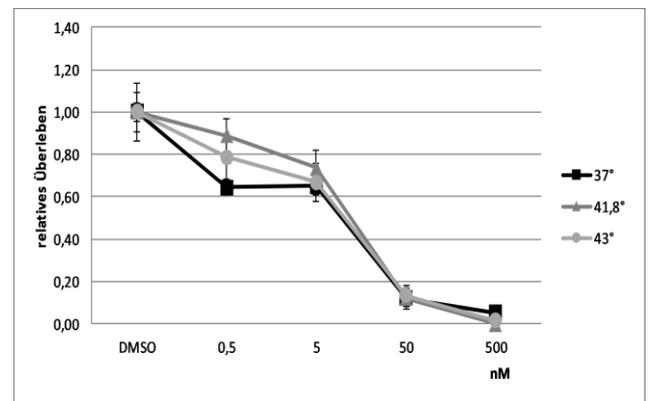
Betrachtet man außerdem die zur Auszählung eingefärbten Platten der beiden Zelllinien, zeigten sich deutliche Unterschiede: mit zunehmender Medikamentenkonzentration in Kombination mit Hitze sind die einzelnen Kolonien schwächer eingefärbt, wirken kleiner und unregelmäßiger.

**8.3.1.2. PU-H71**

In Abbildung 19 wird die Kombinationsbehandlung Hitze und PU-H71 an Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872 gezeigt:



**LeiomyosarkomzellenSKUT-1**



**Liposarkomzellen SW872**

**Abbildung 19:** Behandlung von Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872 mit PU-H71 sowie in Kombination mit Hitze. Messung des klonogenen Überlebens nach 11 d. Auf der Y-Achse ist das relative klonogene Überleben dargestellt (Mittelwert und SEM dreier unabhängiger Experimente), die X-Achse zeigt die unterschiedlichen Medikamentenkonzentrationen. Der Verlauf mit Vierecken entspricht den Zellen ohne Hitzeschock. Die Verläufe mit Dreiecken und Kreisen entsprechen der Kombination von PU-H71 mit Hitzeschock bei 41,8 °C, bzw. 43 °C für 90 min

Es zeigt sich eine deutliche Medikamentenwirkung bei den beiden Zelllinien. Es zeigt sich unter steigenden Konzentrationen PU-H71 ein deutlicher Abfall des klonogenen Überlebens. Die Wirkung ist stärker als bei der Behandlung mit CCT018159 (Abbildung 19).

Im Bereich der höchsten Konzentration zeigt sich bei den Leiomyosarkomzellen SKUT-1 eine Wirkungsverstärkung der Kombinationsbehandlung bei der höchsten Konzentration mit PU-H71, wie schon bei der Behandlung mit CCT018159 (Abbildung 19).

Bei den Liposarkomzellen SW872 zeigt sich kein deutlicher Unterschied im Überleben bei der Behandlung mit PU-H71.

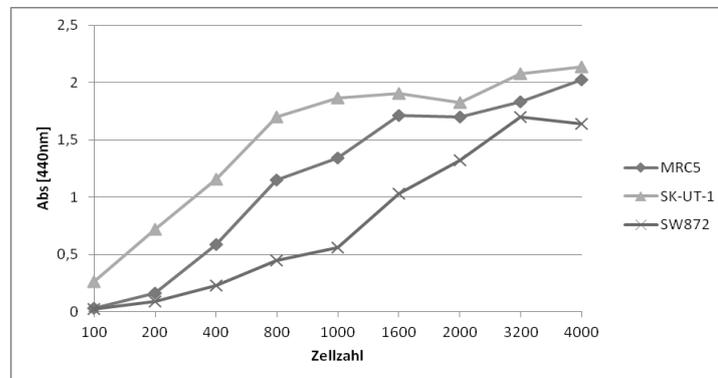
Auch bei der Behandlung mit PU-H71 zeigten die eingefärbten Platten deutliche Unterschiede. Auch hier sind mit zunehmender Medikamentenkonzentration in Kombination mit Hitze die einzelnen Kolonien schwächer eingefärbt, wirken kleiner und unregelmäßiger.

## 8.4. WST Proliferationsassay

Für die weitergehende Untersuchung, ob die Wirkung von HSP 90-Inhibitoren in Kombination mit Hitzeschock verstärkt wird, wurden Proliferationsassays mit Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872, sowie mit Fibroblasten (MRC-5) als Vergleich durchgeführt. Dabei wurden die Zellen nach 24 h für 90 min mit 41,8 °C bzw. 43 °C im Brutschrank erhitzt und nach weiteren 4 h mit dem HSP 90-Inhibitor behandelt. Nach 8 d wurde die Proliferation mit Hilfe des WST-Assays gemessen.

### 8.4.1. Vorversuch: Bestimmung der optischen Dichte der einzusetzenden Zellzahl pro Well

Für den WST-Proliferationsassay waren ebenso wie beim Viabilitätsassay Vorversuche notwendig, um eine ideale Anzahl von Zellen pro Well zu evaluieren.



**Abbildung 20:** Einzusetzende Zellzahl bei 8 d-Proliferationsassay.

Dargestellt ist die Absorption bei 400 nm (optische Dichte) einer WST Messung der drei untersuchten Zelllinien MRC-5, SKUT-1 und SW872, 8 d nachdem die auf der Abszisse angegebenen definierten Zellzahlen ausgesät wurden.

Aus dem Verlauf der Kurven in Abbildung 20 ist ersichtlich, dass im Bereich von 0 bis 800 Zellen ein annähernd linearer Verlauf aller drei Kurven, respektive aller drei Zelllinien erreicht ist. Es wurde daher für die folgenden Versuche eine Zellzahl von 800 Zellen gewählt.

#### 8.4.2. Kombination klinisch relevanter Hitzeschock und HSP 90-Inhibitor

Für den Proliferationsassay wurde eine höhere Anzahl verschiedener Konzentrationen ausgewählt.

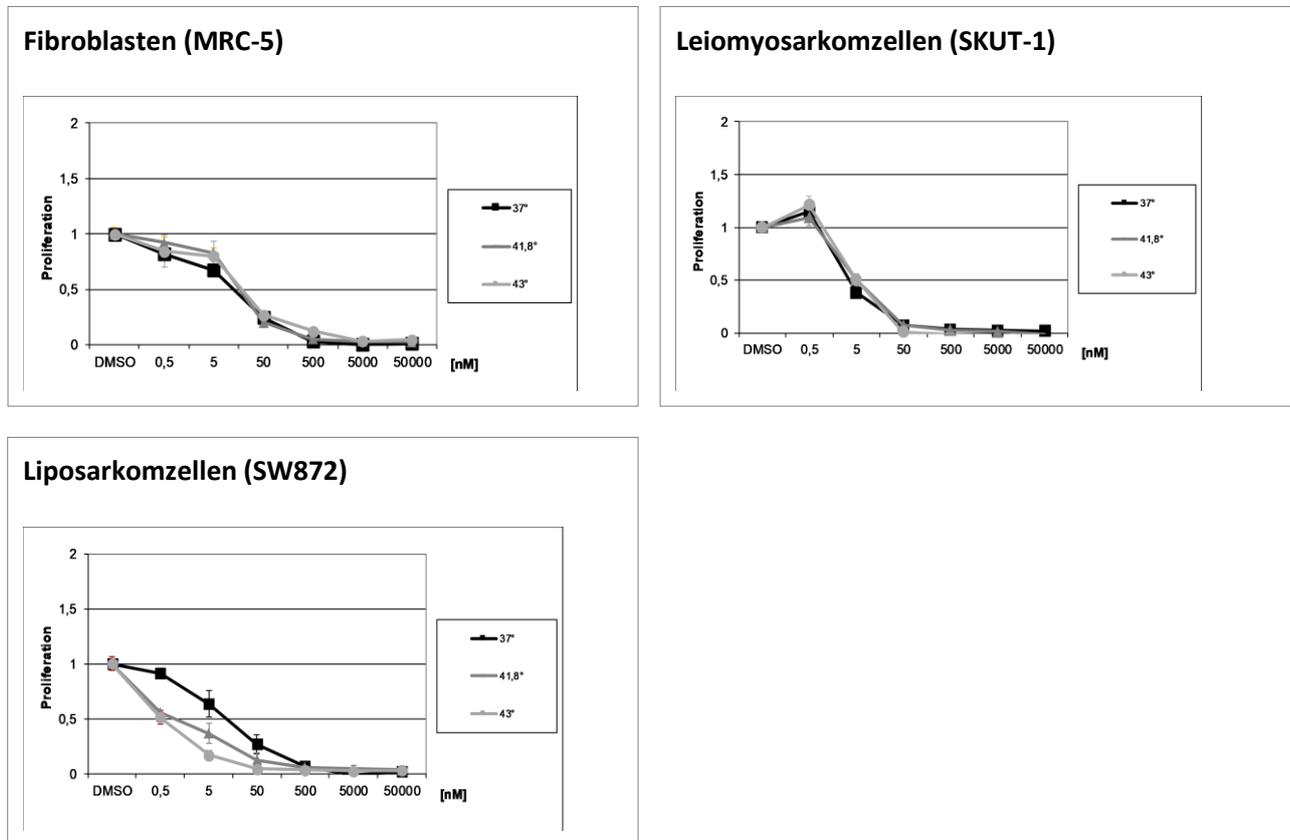
Hier erfolgte **zuerst** der Hitzeschock, **dann** nach 4 h die Behandlung mit dem HSP 90 Inhibitor:



**Abbildung 21:** Ablauf des Proliferationsassays

### 8.4.2.1. 17-AAG

In Abbildung 22 wird die Kombinationsbehandlung Hitze – 17AAG an drei Zelllinien gezeigt



**Abbildung 22:** Behandlung von Fibroblasten MRC-5, Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872 mit 17-AAG, sowie in Kombination mit Hitze.

Messung der Proliferation nach 8 d. Auf der Y-Achse ist die relative Proliferation dargestellt (Mittelwert und SEM dreier unabhängiger Experimente), die X-Achse zeigt die unterschiedlichen Medikamentenkonzentrationen. Der Verlauf mit den quadratischen Markierungen entspricht einer Behandlung ohne Hitzeschock. Die Verläufe mit Dreiecken und Kreuzen entsprechen der Kombination von 17-AAG mit Hitzeschock bei 41,8 °C, bzw. 43 °C für 90 min.

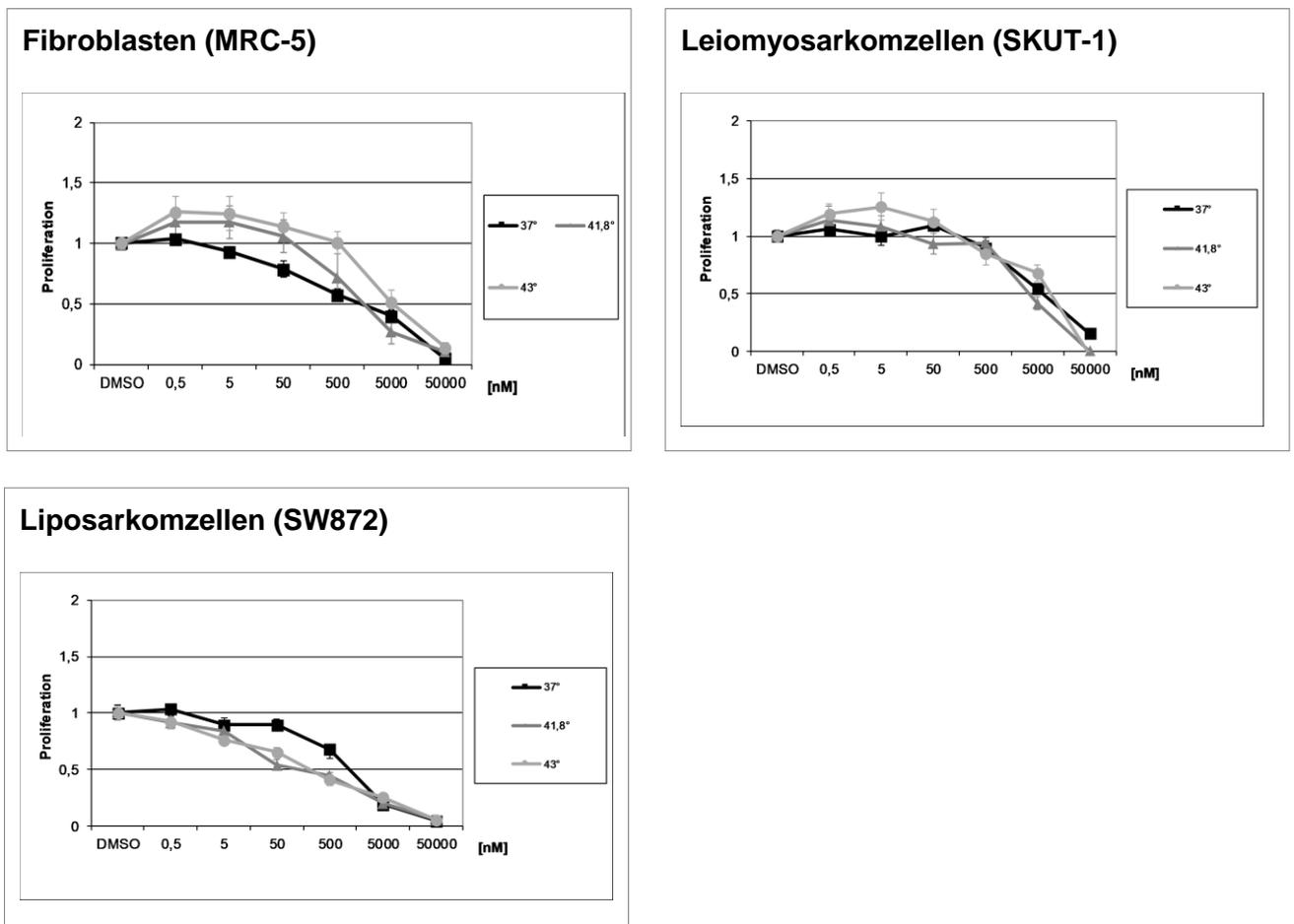
Alle drei Zelllinien in Abbildung 22 reagieren auf die Behandlung mit 17-AAG. Es zeigt sich ein deutlicher Abfall der relativen Proliferation schon bei niedrigen Konzentrationen 17-AAG.

Bei MRC-5 Zellen (Fibroblasten) und Leiomyosarkomzellen SKUT-1 zeigt sich kein Unterschied der Proliferation zwischen den nicht erhitzten und den erhitzten Zellen.

Bei den Liposarkomzellen SW872 zeigt sich im Bereich der mittleren Konzentrationen eine verringerte relative Proliferation der zusätzlich mit Hitzeschock behandelten Zellen. Es zeigt sich ein Auseinanderdriften der hitzekorrigierten Kurven. Es deutet sich hier also eine Wirkungsverstärkung der Kombinationsbehandlung an.

### 8.4.2.2. CCT018159

In Abbildung 23 wird die Kombinationsbehandlung Hitze – CCT018159 an drei Zelllinien gezeigt:



**Abbildung 23:** Fibroblasten MRC-5, Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872 mit CCT018159 behandelt, sowie in Kombination mit Hitze. Messung der Proliferation nach 8 d. Auf der Y-Achse ist die relative Proliferation dargestellt (Mittelwert und SEM dreier unabhängiger Experimente), die X-Achse zeigt die unterschiedlichen Medikamentenkonzentrationen. Der Verlauf mit den quadratischen Markierungen entspricht einer Behandlung ohne Hitzeschock. Die Verläufe mit Dreiecken und Kreuzen entsprechen der Kombination von CCT018159 mit Hitzeschock bei 41,8 °C, bzw. 43 °C für 90 min.

Abbildung 23 zeigt, dass alle drei Zelllinien auf die Behandlung mit CCT018159 reagieren, wenngleich die Abnahme der Proliferation erst bei höheren Dosen einsetzt. Die Abnahme der Proliferation ist in geringen Dosen nicht so deutlich wie bei 17-AAG (Abbildung 22).

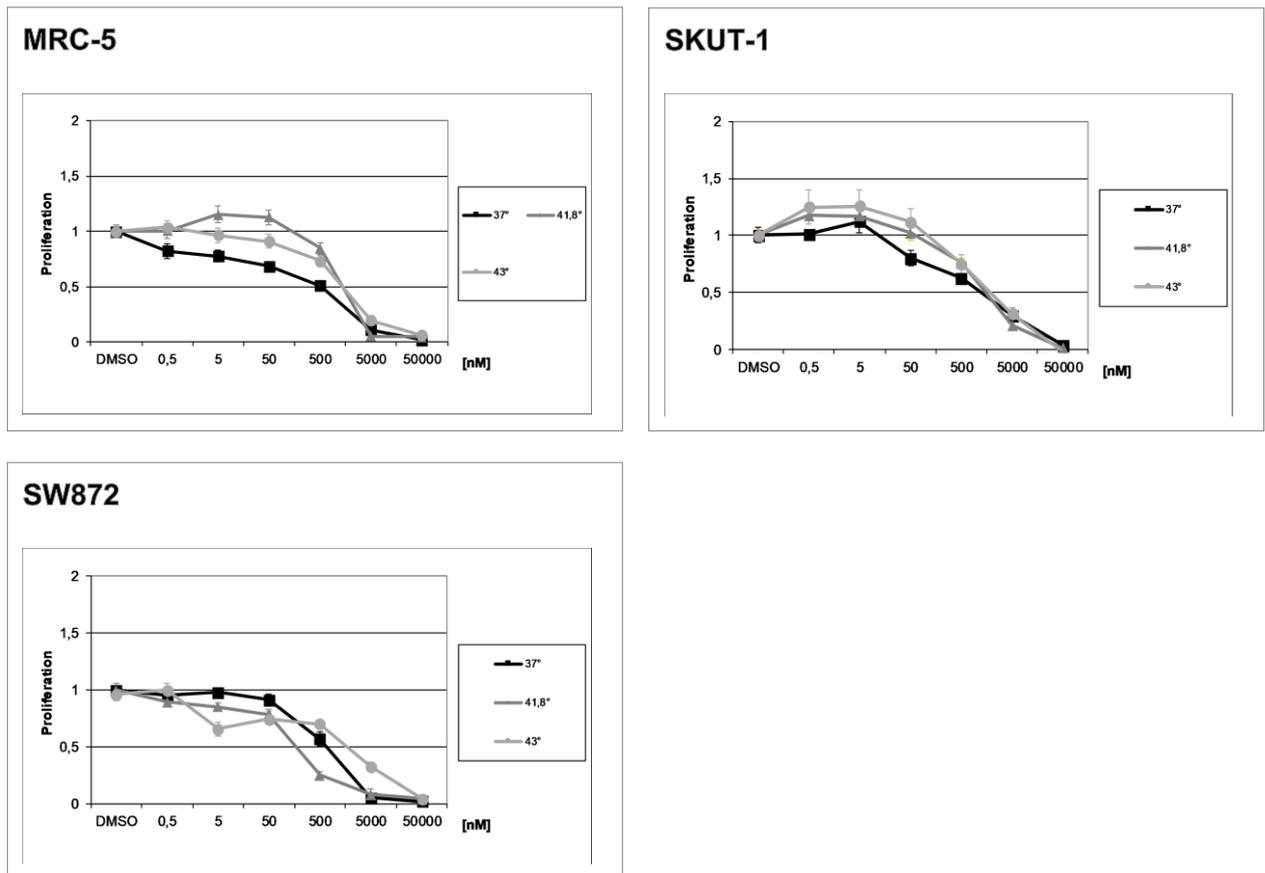
Bei Fibroblasten MRC-5 und Leiomyosarkomzellen SKUT-1 zeigt der Verlauf der Kurven bei der Behandlung mit CCT018159 im Bereich der niedrigen Konzentrationen eher eine Zunahme der relativen Proliferation der hitzebehandelten Zellen. Dieser Effekt ist bei der Kombinationsbehandlung mit Hitze am ausgeprägtesten. Es scheint, dass die Kombination Hitze mit niedrigen Konzentrationen des Medikamentes eine protektive Wirkung auf die Zellen haben, sodass sich eine verbesserte Proliferation der Zellen zeigt.

Bei den Liposarkomzellen SW872 ist ein deutlicher Unterschied der Verläufe von erhitzten und nicht erhitzten Zellen zu sehen. Es zeigt sich ein Auseinanderdivergieren der hitzekorrigierten Kurven. Vor

allein im Bereich der mittleren Konzentrationen zeigt sich eine höhere relative Proliferation der nicht hitzebehandelten Zellen. Es zeigt sich also eine Wirkungsverstärkung der Kombinationsbehandlung.

### 8.4.2.3. PU-H71

In Abbildung 24 wird die Kombinationsbehandlung Hitze und PU-H71 an drei Zelllinien gezeigt.



**Abbildung 24:** Fibroblasten MRC-5, Leiomyosarkomzellen SKUT-1 und Liposarkomzellen SW872 mit PU-H71 behandelt, sowie in Kombination mit Hitze.

Messung der Proliferation nach 8 d. Auf der Y-Achse ist die relative Proliferation dargestellt (Mittelwert und SEM dreier unabhängiger Experimente), die X-Achse zeigt die unterschiedlichen Medikamentenkonzentrationen. Der Verlauf mit den quadratischen Markierungen entspricht einer Behandlung ohne Hitzeschock. Die Verläufe mit Dreiecken und Kreuzen entsprechen der Kombination von PU-H71 mit Hitzeschock bei 41,8 °C, bzw. 43 °C für 90 min.

In Abbildung 24 zeigt sich, dass alle drei Zelllinien auf die Behandlung mit PU-H71 reagieren, wenngleich die Abnahme der Proliferation erst bei höheren Dosen einsetzt. Der Verlauf ist ähnlich wie bei CCT018159 (Abbildung 23) und ebenfalls schwächer als bei 17-AAG (Abbildung 22).

Bei Fibroblasten MRC-5 und Leiomyosarkomzellen SKUT-1 zeigt der Verlauf der Kurven bei der Behandlung mit PU-H71 im Bereich der niedrigen Konzentrationen eher eine Zunahme der relativen Proliferation der hitzebehandelten Zellen. Dieser Effekt ist bei der Kombinationsbehandlung mit Hitze am ausgeprägtesten. Es scheint, dass die Kombination Hitze mit niedrigen Konzentrationen des Medikamentes eine protektive Wirkung auf die Zellen haben, sodass sich eine verbesserte relative

Proliferation der Zellen zeigt. Dieser Effekt ist bei der Behandlung mit PU-H71 ähnlich wie bei der Behandlung mit CCT018159 (Abbildung 23).

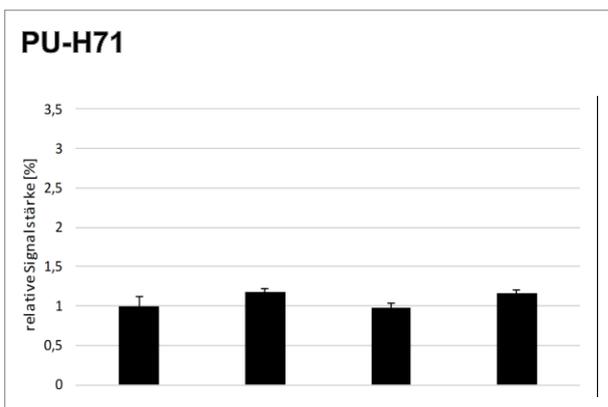
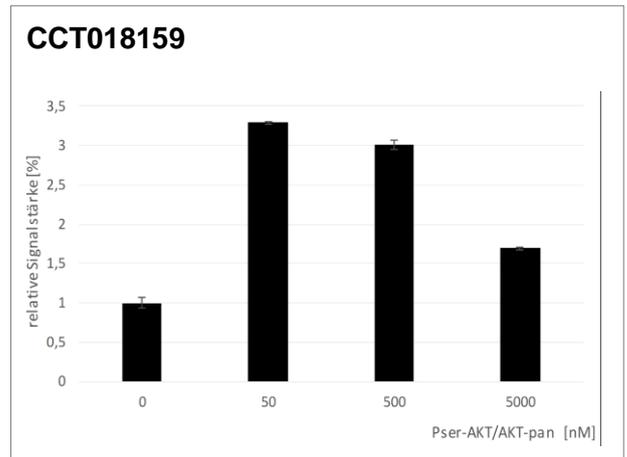
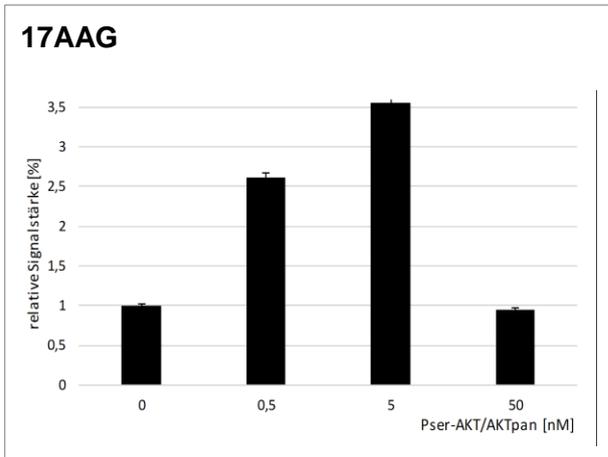
Weder bei den Fibroblasten noch bei den Leiomyosarkomzellen zeigt sich eine Wirkungsverstärkung der Kombinationsbehandlung. Bei den Liposarkomzellen zeigt sich jedoch ein leichtes Auseinanderdivergieren der hitzekorrigierten Kurven. Liposarkomzellen zeigen also in der Kombinationsbehandlung mit allen drei Inhibitoren eine Tendenz zu einer verstärkten Wirkung der Kombinationsbehandlung (Abbildungen 22-24).

## **8.5. Untersuchung des AKT-Signalweges und des MAP-Kinase-Signalweges**

Konfluente Zellkulturen von SKUT-1 wurden mit verschiedenen Konzentrationen von 17-AAG, CCT018159 und PU-H71 für 24 Stunden behandelt. Die Leiomyosarkomzellen SKUT-1 wurden deshalb verwendet, weil bereits die klonogenen Assays mit Leiomyosarkomzellen durchgeführt wurden. Es lassen sich hierdurch eventuell leichter kongruente Erklärungen für die Ergebnisse finden.

### **8.5.1. Pser- AKT / AKT- pan**

In der folgenden Abbildung wird der Quotient Pser- AKT / AKT- pan nach Behandlung mit den drei verschiedenen HSP 90-Inhibitoren dargestellt:



**Abbildung 25:** Pser- AKT / AKT- pan nach Behandlung mit HSP 90-Inhibitoren.

Es erfolgte die Behandlung in den angegebenen Konzentrationen für 24 h. Die Y-Achse zeigt den Quotienten Pser- AKT / AKT- pan (Mittelwert und SEM dreier unabhängiger Experimente), die x-Achse die unterschiedlichen Medikamentenkonzentrationen.

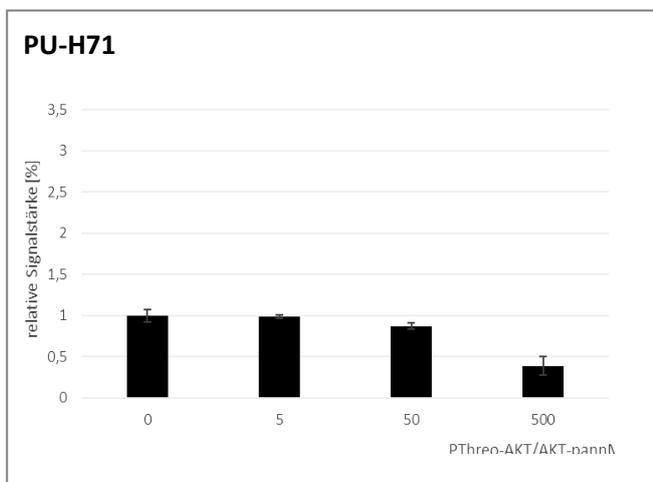
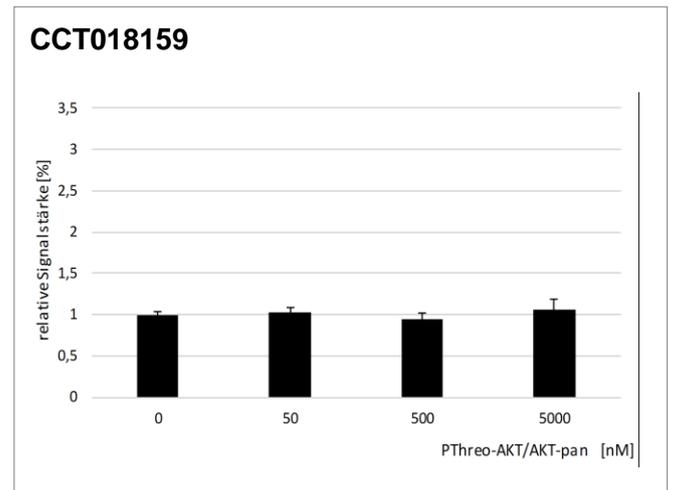
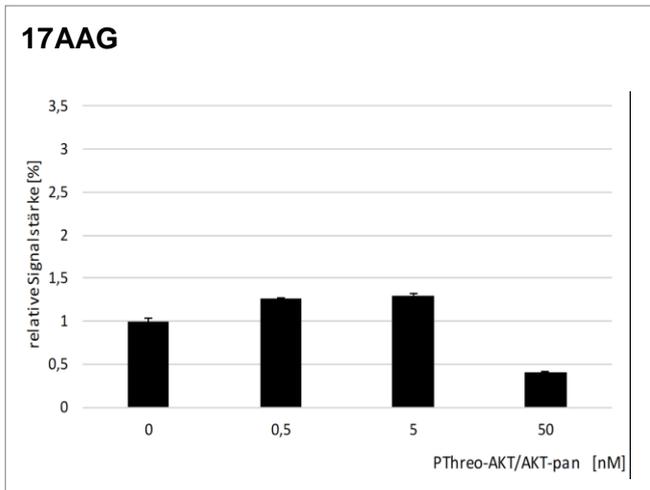
Der in der Abbildung 25 dargestellte Quotient Pser- AKT / AKT- pan zeigt bei Behandlung mit 17AAG und CCT018159 eine deutliche Zunahme unter HSP90-Inhibitor Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Bei der Behandlung mit der höchsten Konzentration zeigt sich wiederum eine Abnahme.

Unter der Behandlung mit PU-H71 lässt sich weder eine Zu- noch eine Abnahme beobachten.

### 8.5.2. P<sup>Threo</sup>- AKT / AKT- pan

In der folgenden Abbildung wird der Quotient P<sup>Threo</sup>- AKT / AKT-pan nach Behandlung mit den drei verschiedenen HSP 90-Inhibitoren dargestellt:



**Abbildung 26:** P<sub>Threo</sub>- AKT / AKT-pan nach Behandlung mit HSP 90-Inhibitoren.

Es erfolgte die Behandlung in den angegebenen Konzentrationen für 24 h. Die Y-Achse zeigt den Quotienten P<sub>Threo</sub>- AKT / AKT-pan (Mittelwert und SEM dreier unabhängiger Experimente), die x-Achse die unterschiedlichen Medikamentenkonzentrationen.

Der in Abbildung 26 dargestellte Quotient P<sub>Threo</sub>- AKT / AKT-pan zeigt bei Behandlung mit 17-AAG eine Abnahme bei der höchsten Konzentration.

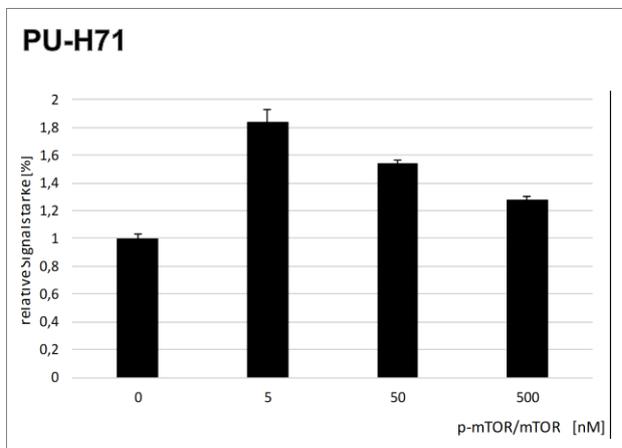
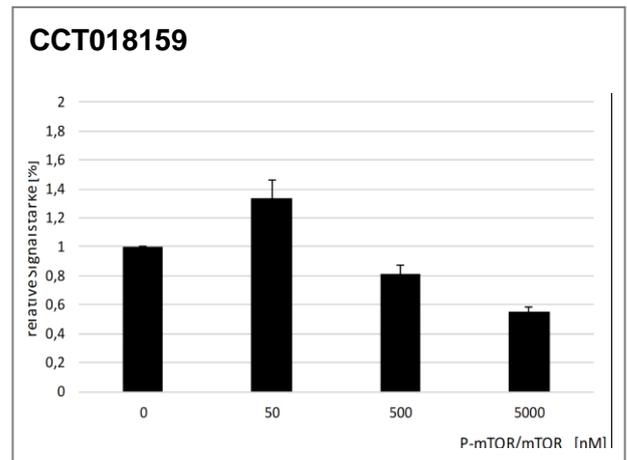
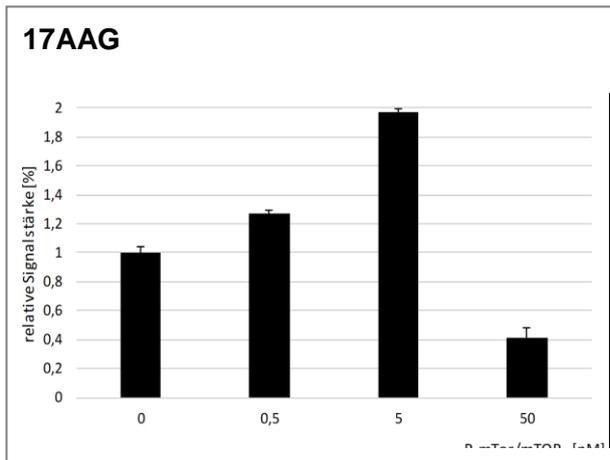
Bei der Behandlung mit CCT018159 zeigen sich keine deutlichen Unterschiede.

Bei der Behandlung mit PU-H71 zeigt sich eine Abnahme unter steigenden Inhibitor-Konzentrationen.

Auch hier lässt sich in der höchsten Inhibitor-Konzentration bei allen drei Inhibitoren eine Abnahme des Quotienten verzeichnen.

### 8.5.3. P- mTOR / mTOR

In der folgenden Abbildung wird der Quotient P-mTOR / mTOR nach Behandlung mit den drei verschiedenen HSP 90-Inhibitoren dargestellt:



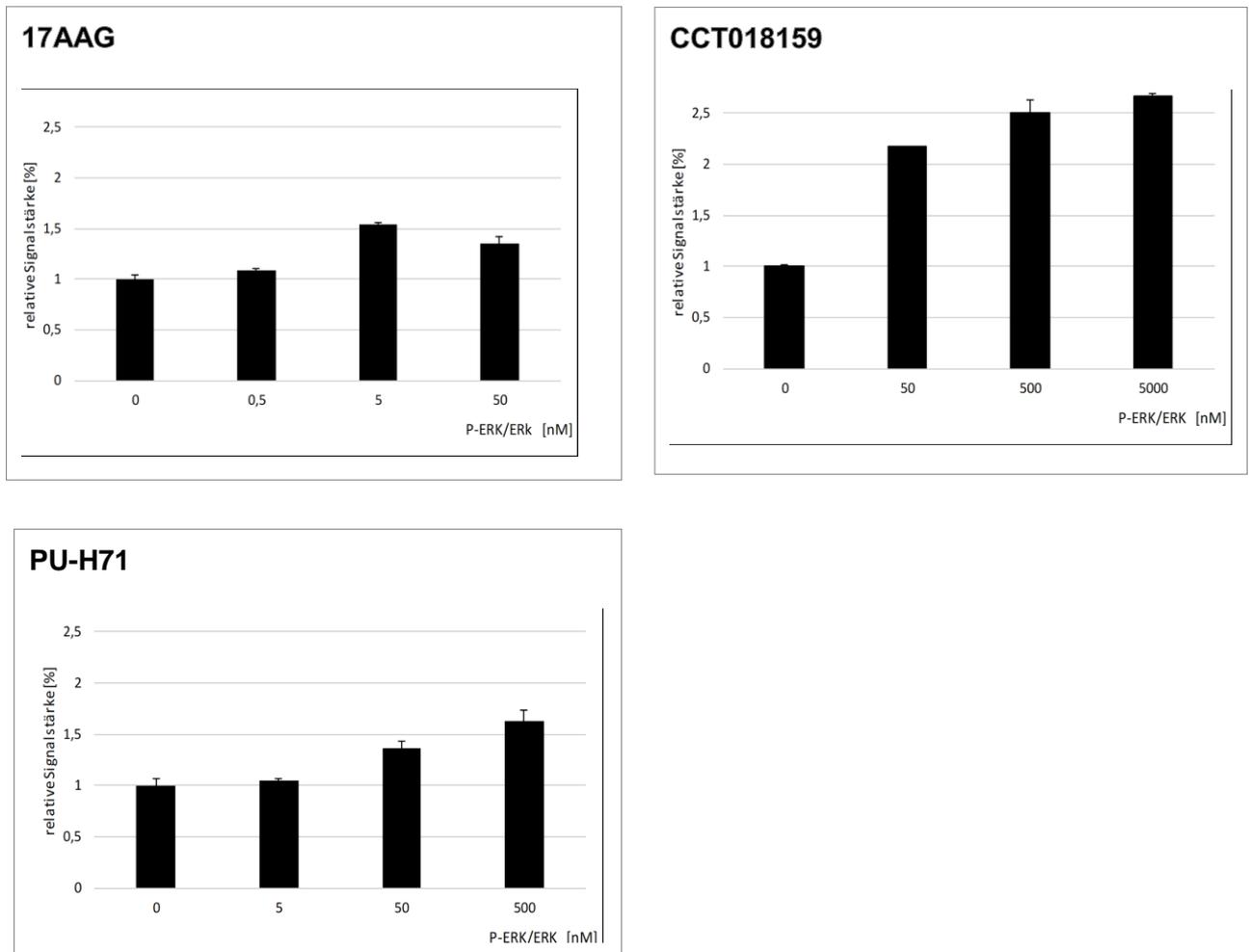
**Abbildung 27:** P- mTOR / mTOR nach Behandlung mit HSP 90-Inhibitoren. Es erfolgte die Behandlung in den angegebenen Konzentrationen für 24 h. Die Y-Achse zeigt den Quotienten P- mTOR / mTOR (Mittelwert und SEM dreier unabhängiger Experimente), die x-Achse die unterschiedlichen Medikamentenkonzentrationen.

Der in der Abbildung 27 dargestellte Quotient P- mTOR / mTOR zeigt bei der Behandlung mit allen drei Inhibitoren eine Zunahme bei der niedrigsten Inhibitor Konzentration im Vergleich zur nicht behandelten Kontrolle.

Unter steigenden Inhibitor Konzentrationen zeigt sich dann vor allem bei der Behandlung mit CCT018159 und PU-H71 eine sukzessive Abnahme des Quotienten.

#### 8.5.4. P- ERK / ERK

In der folgenden Abbildung wird der Quotient P- ERK / ERK nach Behandlung mit den drei verschiedenen HSP 90-Inhibitoren dargestellt:



**Abbildung 28:** P-ERK / ERK nach Behandlung mit HSP 90-Inhibitoren.

Es erfolgte die Behandlung in den angegebenen Konzentrationen für 24 h. Die Y-Achse zeigt den Quotienten P-ERK / ERK (Mittelwert und SEM dreier unabhängiger Experimente), die x-Achse die unterschiedlichen Medikamentenkonzentrationen.

Der in Abbildung 28 dargestellte Quotient P-ERK / ERK zeigt bei der Behandlung mit allen drei Inhibitoren eine deutliche Zunahme im Vergleich zur nicht behandelten Kontrolle.

Unter steigenden Inhibitor-Konzentrationen zeigt sich dann bei der Behandlung mit 17AAG nur ein leichter weiterer Anstieg, bei der Behandlung mit CCT018159 und PU-H71 zeigt sich eine deutliche weitere sukzessive Zunahme des Quotienten unter steigenden Konzentrationen.

## 9. Diskussion

Weichteilsarkome sind noch heute eine Tumorentität mit einer schlechten Prognose. Um weitere Behandlungsmöglichkeiten zu erforschen, erfolgten in dieser Arbeit Versuche zu medikamentöser Behandlung mit HSP90-Inhibitoren in Kombination mit klinisch relevantem Hitzeschock an Kulturen von humanen Sarkom-Zelllinien.

Am Beginn stand die Untersuchung der Expression verschiedener Hitzeschockproteine bei Fibroblasten, Leiomyosarkomzellen und Liposarkomzellen. Aufgrund einer deutlichen Zunahme der Expression der Hitzeschockproteine HSP 90, HSP 70 und HSP 27 nach Hitzeschock erfolgte die weitere Untersuchung zur Wirksamkeit von HSP 90-Inhibitoren an Sarkomzellen in Kombination mit Hitzeschock. Um die Stressreaktion und mögliche rescue-pathways der Zellen unter HSP 90 Inhibition zu untersuchen, erfolgten abschließend Messungen von AKT-, mTor- und ERK- Phosphorylierungen unter HSP 90 Inhibition.

Der Einsatz von HSP 90-Inhibitoren als Therapieoption bei Weichteiltumoren erfolgte bisher lediglich im Rahmen präklinischer Studien. Es gibt jedoch bereits HSP 90-Inhibitoren, wie 17-AAG, die in klinischen Phase II Studien an anderen Tumorentitäten, wie z.B. dem Mammakarzinom, getestet werden. (Modi et al 2011). 17-AAG zeigt dabei Effekte bei Patienten mit HER2-positiven Mammakarzinomen. Es zeigte sich unter 17 AAG eine deutlich verbesserte Ansprechrate nach den RECIST-Kriterien. (Modi et al 2011) Die Untersuchung der Kombinationsbehandlung von HSP 90-Inhibitoren und Hitzeschock ist im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung interessant. Durch eine Kombinationsbehandlung könnte neben einer besseren Wirksamkeit auch eine mögliche Senkung der Medikamentendosen und damit der Toxizität erreicht werden.

Die Hyperthermie ist in der Therapie des Weichteilsarkoms mittlerweile eine in die internationalen Leitlinien aufgenommene Therapieoption. (Isman 2016; Casali, Abecassis, et al. on behalf of the ESMO Guidelines Committee and EURACAN 2018) Bei Hochrisikoweichteilsarkomen im Erwachsenenalter konnte in einer randomisierten Phase III Studie gezeigt werden, dass die Kombination von Chemotherapie mit Hyperthermie einen signifikanten Vorteil im Tumorsprechen ergibt. Die Patienten der Kombinationsbehandlung hatten darüber hinaus nach zehn Jahren sogar ein verbessertes Gesamtüberleben und ein geringeres Lokalrezidiv-Risiko (52,6 % und 42,7 %). (Issels, Lindner et al. 2018) Die Hyperthermie kann als eine ergänzende Therapieoption zur Strahlen- oder Chemotherapie gesehen werden.

Der Hitzeschock in dieser Arbeit mit zwei Temperaturen (41.8 and 43 °C) für die Dauer von 90 min ist an die klinische Applikation der Hyperthermie angelehnt. Die Verwendung zweier Temperaturen spiegelt hierbei den Bereich der inhomogenen Temperaturhöhe wider, die während der klinischen Behandlung mit Hyperthermie im Tumorgewebe erreicht wird. (Harnicek, Kampmann et al. 2016)

### 9.1. Dynamik der Expression verschiedener Hitzeschockproteine nach Hitzeschock

Bei humanen Zelllinien von Fibroblasten, Liposarkomzellen und Leiomyosarkomzellen erfolgte eine Messung der Expression von HSP 90 (mit den Subgruppen HSP90AA und HSP90AB), HSP 70, HSC 70,

und HSP 27 nach einem Hitzeschock mit 43 °C für 90 min und nach acht unterschiedlichen Erholungszeiten von 0-72 h.

Es zeigte sich bei allen drei Zelllinien eine deutliche HSP 90 Induktion nach Hitzeschock um 40 – 80% (Abbildung 4). Dies wurde bereits in anderen Studien in ähnlicher Form bestätigt. (Tang; Khaleque; et al. 2005). Bei den drei Zelllinien zeichneten sich zwei Peaks der HSP 90 Induktion ab: die stärkere Induktion nach 2-6 h und eine erneute, aber schwächere Zunahme der Induktion nach 18-36 h Erholungszeit nach Hitzeschock. Dies wurde ebenfalls schon in anderen Studien berichtet. (Tang; Khaleque; et al. 2005) Die vermehrte HSP 90 Expression nach Hitzeschock ist als Antwort der Zelle auf den Stress, in diesem Fall durch den Hitzeschock, zu sehen.

Das Hitzeschockprotein 70 wurde sowohl in seiner konstitutiv exprimierten Form (HSC 70), als auch in seiner induzierbaren Form (HSP 70) untersucht. Die Experimente der HSP 70 Induktion zeigten hierbei bei allen untersuchten Zelllinien eine vermehrte Expression von HSP 70 nach Hitzeschock um den Faktor 2 bis 4 (Abbildung 5). Diese Ergebnisse sind ebenfalls übereinstimmend mit den aus anderen Veröffentlichungen bekannten. (Willot; Gueydan; et al. 2017). Es zeigt sich bei allen drei Zelllinien ein deutlicher Peak bei 6-18 h Erholungszeit nach Hitzeschock.

Die HSC 70 Expression zeigt sich unter Hitzeschock nahezu unverändert (Abbildung 6). Dieses Ergebnis der Untersuchung des als konstitutiv exprimiert und somit nicht induzierbar beschriebenen Hitzeschock-Proteins HSC 70 ist zu erwarten gewesen. (Iftinca, Flynn, et al. 2016)

Die HSP27-Expression zeigte bei allen drei Zelllinien nach Hitzeschock eine Zunahme, jedoch in unterschiedlicher Ausprägung. Die beiden Sarkomzelllinien zeigten eine deutlich erhöhte Expression nach Hitzeschock. Die Fibroblasten nur in geringem Maße (Abbildung 7). Man kann hieraus auf eine höhere Abhängigkeit dieser beiden Sarkomzelllinien von HSP27 als Kompensationsmechanismus nach Hitzeschock schließen. Die Sarkomzellen besitzen weniger vielfältige Kompensationsmechanismen bei Stress, dies zeigt sich in der oben beschriebenen deutlichen Hochregulation von HSP 27. Dies ist für andere Sarkome, beispielsweise das Osteosarkom, bereits beschrieben. (Uozaki, Ishida, et al. 2000).

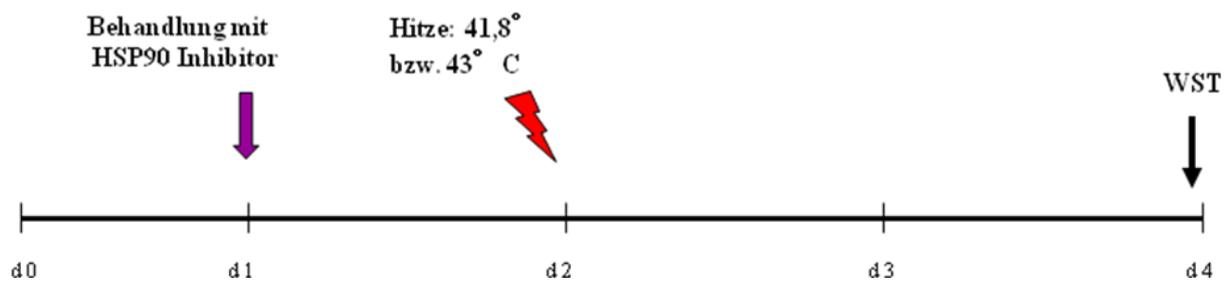
Insgesamt sieht man eine deutlich vermehrte Expression der Hitzeschockproteine bis auf HSC 70 bei allen untersuchten Zelllinien nach Hitzeschock. Dieses Ergebnis war die Rationale für die folgenden Kombinationsbehandlungen eines medikamentösen HSP 90-Inhibitors mit Hitzeschock.

## **9.2. Kombinationsversuche - Viabilität, Klonogenes Überleben und Proliferation nach Kombinationsbehandlung von klinisch relevantem Hitzeschock und HSP 90-Inhibitor**

Um die Auswirkung der verschiedenen HSP 90-Inhibitoren in Kombination mit klinisch relevantem Hitzeschock auf die Viabilität, auf das klonogene Überleben und die Proliferation der Zelllinien zu untersuchen, wurden Kombinationsversuche durchgeführt. Der rein durch die Hitzebehandlung verursachte toxische Effekt wurde bei diesen Versuchen durch den Bezug auf die Kontrolle der jeweiligen Temperatur korrigiert. Eine relevante Verstärkung oder Abschwächung der Inhibitorwirkung durch den Hitzeschock kann somit bei Auseinanderdriften der unterschiedlichen Temperatur-Überlebenskurven angenommen werden (weitere Ausführung siehe Material und Methoden, Kapitel 7.4.4.).

### 9.2.1. Viabilität von Sarkomzellen nach der Kombinationsbehandlungen mit HSP 90 Inhibition und Hitze

Die Behandlung bei dieser Versuchsreihe erfolgte an drei humanen Zelllinien (MRC-5, SKUT-1 und SW872) mit den drei verschiedenen HSP 90-Inhibitoren (17-AAG, CCT018159 und PU-H71). Es erfolgte die Behandlung mit dem HSP 90 Inhibitor, nach 24 h der Hitzeschock und 3 d nach Behandlung das Messen mittels WST-Assay:



**Abbildung 29:** Ablauf des Viabilitätsassays

Für die Kombinationsbehandlung wurde sich bezüglich der Medikamentenkonzentrationen der HSP 90-Inhibitoren zunächst an Literaturwerten orientiert (Siehe Material und Methoden, Kapitel 7.4.2.). (Modi et al, 2011), (Sharp S. Y., Boxall K. et al. 2007), (Caldas-Lopes, Cerchiatti et al. 2009)

Die Abbildung fasst farblich die Ergebnisse Viabilitätsmessung zusammen.

	<b>MRC-5</b>	<b>SKUT-1</b>	<b>SW872</b>
<b>17-AAG</b>			
<b>CCT</b>			
<b>PU-H71</b>			

- relevante Wirkungsverstärkung
- kein relevanter Unterschied
- Abschwächung der Wirkung

**Abbildung 30:** Überblick über die Ergebnisse des Viabilitätsassays

Gezeigt sind die Ergebnisse der Kombinationsbehandlung Hitze-Medikament des Viabilitätsassays. Rot steht hierbei für ein Auseinanderdivergieren der hitzekorrigierten Kurven und damit eine relevante Wirkungsverstärkung der Kombinationsbehandlungen.

Gelb steht für keinen relevanten Unterschied der Kombinationsbehandlung.

Grün steht ebenfalls für ein Auseinanderdivergieren der Kurven mit einer Abschwächung der Wirkung der Kombinationsbehandlungen.

Es zeigte sich beim Viabilitätsassay in der getesteten Zeitspanne bei keiner der Zelllinien ein starkes Ansprechen auf die HSP 90-Inhibitoren (Abbildung 14-16). Bei den Experimenten mit CCT018159 wurden die LC 50 Dosen mit den getesteten Konzentrationen nicht erreicht (Abbildung 15). Bei 17-AAG und PU-H71 wurden die LC 50 Dosen erst mit der jeweils höchsten Konzentration überschritten (Abbildung 14 und 16).

In den Experimenten zur Kombinationsbehandlung Medikament mit Hitzeschock mit 41,8 °C und 43 °C über 90 min konnte keine relevante Wirkungsverstärkung der HSP 90-Inhibitoren durch Hitze gezeigt werden. Die Erwartung, durch die Inhibition von HSP 90 eine Reduktion der Viabilität unter Hyperthermie zu erreichen, bestätigte sich in dieser Versuchsreihe nicht (Abbildungen 14-16).

Interessanterweise zeichnete sich jedoch bei den unterschiedlichen Inhibitoren ein tendenziell anderer, unerwarteter Effekt ab. Bei niedrigen und mittleren Medikamentendosen von CCT018159 und PU-H71 zeigten sich bei den beiden Sarkomzelllinien (SKUT-1 und SW872) ein Auseinanderdivergieren der Kurven mit einer höheren relativen Viabilität der erhitzten Zellen gegenüber den nicht erhitzten Zellen (Abbildung 15 und 16). Bei 17-AAG ist dieser Effekt der verbesserten Viabilität der Kombinationsbehandlung ebenfalls sichtbar, wenngleich auch in geringerer Ausprägung (Abbildung 14).

Es ist somit zu überlegen, ob die Hitze eine Art protektiven Effekt auf die mit HSP 90-Inhibitor behandelte Zelle haben könnte. Die behandelten Zellen könnten durch die vermehrte HSP- Expression durch Hitzeschock einen Überlebensvorteil bekommen haben. Man könnte vermuten, dass der Hitzeschock in den Zelle Ressourcen aktivieren könnte, wodurch diese entsprechend der Thermotoleranz den medikamenteninduzierten Stress besser verarbeiten und überleben können.

### **9.2.2. Klonogene Aktivität von Sarkomzellen nach der Kombinationsbehandlungen mit HSP 90 Inhibition und Hitze**

Die Behandlung bei dieser Versuchsreihe erfolgte an den beiden humanen Sarkomzelllinien SW872 und SKUT-1 mit zwei der Inhibitoren (CCT018159 und PU-H71). Es erfolgte die Behandlung mit dem HSP 90 Inhibitor, nach 4 h der Hitzeschock und 9 d nach Behandlung die Auswertung:



**Abbildung 31:** Ablauf des klonogenen Assays

Bei den klonogenen Assays erfolgte wie bei den Viabilitätsassays die medikamentöse Behandlung mit einem HSP 90-Inhibitor, dann die Behandlung mit einem klinisch relevanten Hitzeschock. Es erfolgte der Hitzeschock jedoch bereits im Abstand von 4 h, nicht nach 24 h wie beim Viabilitätsassay. Die Zeitspanne wurde verkürzt, da sich beim Viabilitätsassay nicht der gewünschte stärkere Effekt der Kombinationsbehandlung zeigte. Die Rationale war, die Zellen in einem Stadium der Vulnerabilität (welches durch die Behandlung mit dem HSP 90-Inhibitor erzeugt wurde) durch den Hitzeschock zu schädigen.

Auch hier ein Überblick über die Ergebnisse der Kombinationsbehandlung:

Klonogener Assay			
		SKUT-1	SW872
17-AAG			
CCT			
PU-H71			

- relevante Wirkungsverstärkung
- kein relevanter Unterschied
- Abschwächung der Wirkung

**Abbildung 32:** Überblick über die Ergebnisse des klonogenen Assays

Gezeigt sind die Ergebnisse der Kombinationsbehandlung Hitze-Medikament des klonogenen Assays. Rot steht hierbei für ein Auseinanderdivergieren der hitzekorrigierten Kurven und damit eine relevante Wirkungsverstärkung der Kombinationsbehandlungen. Gelb steht für keinen relevanten Unterschied der Kombinationsbehandlung. Grün steht ebenfalls für ein Auseinanderdivergieren der Kurven mit einer Abschwächung der Wirkung der Kombinationsbehandlungen.

Der klonogene Assay erfolgte zur Überprüfung des klonogenen Überlebens, um eine weitere Messgröße neben der Viabilität zu erfassen. Neben der Viabilität wird bei diesem Assay die Fähigkeit der behandelten Zelle sich zu teilen und Kolonien zu bilden bewertet. Indirekt können sogar anhand des Aussehens der Kolonien Rückschlüsse auf den Zustand der Zellen gewonnen werden. (Sommer 2010)

Es wurden Versuche mit Liposarkom- und Leiomyosarkomzellen durchgeführt. Die Fibroblasten konnten nicht für klonogene Assays verwendet werden. Es ist anzunehmen, dass die dünne Aussaat der Fibroblasten keine Kolonienbildung ermöglichte. (Schmitz 2009)

Es zeigte sich bei den untersuchten Zelllinien nach der Behandlung durch die beiden Inhibitoren eine deutliche Reduktion des klonogenen Überlebens. Das Liposarkom reagierte hierbei etwas sensibler auf die Behandlung mit den Inhibitoren als das Leiomyosarkom. Die LC50 Dosis wurde bei CCT018159 jedoch erst mit der höchsten Konzentration (50.000 nM) erreicht. Bei PU-H71 war dies schon im Bereich der mittleren Dosis (50 nM) der Fall.

Insgesamt zeigten sich bei den klonogenen Assays die höchsten Fehlerabweichungen.

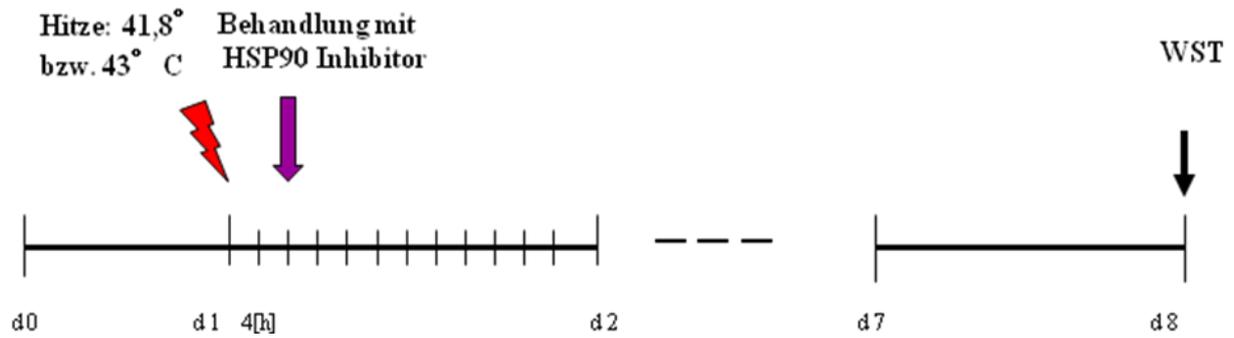
In den Kombinationsversuchen Medikament – Hitzeschock zeigt sich bei den Liposarkomzellen SW872 ein Auseinanderdivergieren der Kurven mit einem eher verbesserten klonogenen Überleben der in Kombinationsbehandlung mit CCT018159 und Hitze behandelten Zellen (Abbildung 18). Dieser Effekt ist bei der Behandlung mit PU-H71 ebenfalls leicht angedeutet (Abbildung 19). Bei den Leiomyosarkomzellen SKUT-1 zeigt sich kein deutlicher Unterschied der Überlebenskurven der unterschiedlichen Temperaturen, weder bei der Kombinationsbehandlung mit CCT018159 noch bei der Behandlung mit PU-H71 (Abbildungen 18 und 19).

Der Grund für die fehlende Wirkungssteigerung und die sogar vermuteten antagonistischen Effekte der Hitze bei CCT018159 und PU-H71 könnte, wie auch bei den Viabilitätsassays, eine vermehrte Expression der Hitzeschockproteine sein. Ein weiterer zusätzlicher möglicher Grund wäre eine unvollständige HSP 90 Hemmung durch den Inhibitor.

Betrachtet man die zur Auszählung eingefärbten Platten der beiden Zelllinien, sieht man jedoch deutliche Unterschiede: bei den in Kombinationsbehandlung mit Hitzeschock behandelten Zellen sind mit zunehmenden Medikamentenkonzentrationen die einzelnen Kolonien schwächer eingefärbt, wirken kleiner und unregelmäßiger. Dies könnte daraufhin weisen, dass die Zellen zwar noch fähig sind Kolonien zu bilden, die Qualität der Zellverbände jedoch eingeschränkt ist und die Zellen selbst in ihrer Vitalität eingeschränkt sind. Diese Vermutung, dass die HSP 90-Inhibitoren unspezifische antiproliferative Effekte neben der direkten Zytotoxizität auslösen, wurde bereits nach Behandlung mit dem HSP 90-Inhibitor 17-AAG geäußert (Powers, Valenti et al. 2013) und könnte bei den beiden Inhibitoren CCT018159 und PU-H71 in ähnlicher Weise vorhanden sein. Leider ließ sich dieser Effekt in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen nicht genauer quantifizieren oder objektiv messbar machen. Nach Literaturrecherche liegen auch keine Studien vor, die diesen Effekt in vitro beschreiben. In vivo hingegen könnte dieser Effekt eine Rolle spielen, da er sich in einer verminderten Wachstumsgeschwindigkeit des einzelnen Tumors, sowie einer veränderten Aktivität und Malignität des Tumors widerspiegeln könnte.

### **9.2.3. Proliferation von Sarkomzellen nach Kombinationsbehandlung mit Hitze und HSP 90 Inhibition**

Die Behandlung bei dieser Versuchsreihe erfolgte an drei Zelllinien (MRC-5, SKUT-1 und SW872) mit den drei verschiedenen HSP 90-Inhibitoren (17-AAG, CCT018159 und PU-H71). Es erfolgte hierbei zuerst der Hitzeschock (nicht wie bei beim Viabilitätsassay und klonogenen Assay zuerst die Behandlung mit dem HSP 90-Inhibitor), nach 4h die Behandlung mit dem HSP 90 Inhibitor und 7 d nach Behandlung das Messen mittels WST-Assay:



Da bei den Viabilitätsassays und klonogenen Assays mit oben beschriebenem Versuchsaufbau keine relevante Wirkungsverstärkung der Kombinationsbehandlung auftrat, erfolgten Proliferationsassays mit verändertem Versuchsaufbau. Bei den Versuchen zur Induktion der HSPs nach Hitzeschockbehandlung konnte eine vermehrte HSP 90 Expression nach Hitze mit einem Peak bei 2-6 Stunden Erholungszeit gezeigt werden (Abbildung 4). Daher erfolgte in diesen Experimenten die medikamentöse HSP 90 Inhibition 4 h nach Hitzeschock.

Es wurden bei dieser Experimentreihe niedrigere Medikamentendosen verwendet und eine längere Behandlungsdauer von 7 d, um eine weitere Annäherung an klinische Studien zu gewährleisten. Die Messung erfolgte nach 7 d. Auch in klinischen Phase-II-Studien erfolgte die Gabe von HSP 90-Inhibitoren an mehreren Tagen mit kurzen Abständen (beispielsweise Tag 1, 4, 8) um einen stabil hohen Plasmaspiegel zu erreichen, gefolgt von einer Pause nach Tag acht. (Gartner, Silverman et al. 2012) (Pedersen, Kim et al. 2015)

Zunächst ein Überblick über die Kombinationsbehandlung:

<b>Proliferationsassay</b>			
	<b>MRC-5</b>	<b>SKUT-1</b>	<b>SW872</b>
<b>17-AAG</b>			
<b>CCT</b>			
<b>PU-H71</b>			

- relevante Wirkungsverstärkung
- kein relevanter Unterschied
- Abschwächung der Wirkung

**Abbildung 33:** Überblick über die Ergebnisse des Proliferationsassays

Gezeigt sind die Ergebnisse der Kombinationsbehandlung Hitze-Medikament des Proliferationsassays. Rot steht hierbei für ein Auseinanderdivergieren der hitzekorrigierten Kurven und damit eine relevante Wirkungsverstärkung der Kombinationsbehandlungen. Gelb steht für keinen relevanten Unterschied der Kombinationsbehandlung. Grün steht ebenfalls für ein Auseinanderdivergieren der Kurven mit einer Abschwächung der Wirkung der Kombinationsbehandlungen.

In den Proliferationsassays zeigte sich insgesamt ein starkes Ansprechen auf die Medikamente, auch im Bereich deutlich niedrigerer Dosierungen, als bei den Viabilitätsassays und klonogenen Assays. Die LC 50 Dosen von 17-AAG bei den beiden Sarkomzelllinien lagen bei etwa 5 nM. Bei den anderen beiden HSP 90-Inhibitoren CCT018159 und PU-H71 lag die LC 50 Dosis mit jeweils 5000 nM höher, aber auch hier wurden in anderen Studien ähnliche, oder höhere Konzentrationen verwendet. (Siehe Material und Methoden 7.6.2.) (Sharp S. Y., Boxall K. et al. 2007; Caldas-Lopes, Cerchietti et al. 2009)

Ein Auseinanderdivergieren der hitzekorrigierten Kurven mit einer reduzierten relativen Proliferation der erhitzten Zellen zeigt sich im Proliferationsassay bei den Versuchen mit den Liposarkomzellen. Damit zeigt sich eine relevante Wirkungsverstärkung der HSP 90-Inhibitoren durch die Hitzeschockbehandlung für das Liposarkom bei den Inhibitoren 17-AAG, etwas weniger deutlich ausgeprägt CCT018159 und PU-H71 (Abbildungen 22-24).

Bei den anderen Kombinationen zeigte sich entgegen meiner Erwartung keine Wirkungsverstärkung der Kombinationsbehandlung. Im Gegenteil: bei der Kombinationsbehandlung mit CCT018159 und Hitzeschock zeigt sich bei den Fibroblasten und Leiomyosarkomzellen das schon bei den Viabilitätsassays und klonogenen Assays sichtbare Auseinanderdivergieren der Kurven mit Hinweis auf eine protektive Wechselwirkung der Kombinationsbehandlung (Abbildung 23). Vor allem im Bereich der mittleren Behandlungsdosen zeigt sich eine deutlich höhere relative Proliferation der in Kombination mit Hitzeschock behandelten Zellen.

#### **9.2.4. Diskussion der Ergebnisse der HSP 90 Inhibition**

Betrachtet man die Wirkung der HSP 90-Inhibitoren 17-AAG, CCT018159 und PU-H71 zeigt sich bei allen drei Inhibitoren insgesamt eine starke Reduktion der Proliferation, etwas schwächer des klonogenen Überlebens und der Viabilität. Die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen wurden an die Literaturwerte angelehnt:

Bei der klinischen Studie von Modi et al. wurde eine Konzentration von 17-AAG im Menschen von 450mg/m<sup>2</sup> verwendet. (Modi, S. et al 2011) Bei einer molaren Masse von 585.70 g·mol<sup>-1</sup> ergibt dies eine Konzentration von 3414 nmol auf 100µl. Es wurde in dieser Arbeit für die Behandlung mit 17-AAG

mit Konzentrationen von 0,5 nM bis 50.000 nM verwendet. Der Grund für die Breite an Konzentrationen war der abrupte Abfall der Viabilität der Zellen im Vorversuch (Abbildung 9). Eine weitere Intention war, 17-AAG, welches in der Literatur als nebenwirkungsreiches Medikament beschrieben wird, durch die Kombination mit Hyperthermie in einer besser verträglichen Dosis in der Klinik einsetzen zu können. (Saif, Erlichman et al. 2013)

Für die Konzentrationen von CCT018159 wurde sich ebenfalls an Werten bereits veröffentlichter Studien orientiert. (Sharp S. Y., Boxall K. et al. 2007) Bei Behandlung mit 685 nM CCT018159 für 24 h zeigte sich eine deutliche Zunahme der PARP-Spaltung und damit eine Zunahme der Apoptose in Colocarcinom-Zellen. (Sharp S. Y., Boxall K. et al. 2007). Es wurden daher Konzentrationen um diesen Bereich gewählt (von 0,5 nM - 50.000 nM).

Bei der Behandlung mit PU-H71 wurde sich ebenfalls an Literaturwerten orientiert. (Caldas-Lopes, Cerchietti et al. 2009) In HCC-1806 Mamacarcinom-Zellen führte eine Behandlung über 72h mit einer Konzentration von 100nM PU-H71 zum Absterben der Hälfte der Zellen. (Caldas-Lopes, Cerchietti et al. 2009) Es wurden daher Konzentrationen von 0,5 nM - 50.000 nM gewählt.

Bei allen drei HSP 90-Inhibitoren ist die Zytotoxizität in dieser Arbeit mit den Werten in der Literatur vergleichbar. (Saif, Erlichman et al. 2013; Sharp S. Y., Boxall K. et al. 2007; Nayar, Lu et al. 2013; Caldas-Lopes, Cerchietti et al. 2009)

Die häufigste Nebenwirkung der drei HSP90-Inhibitoren ist die Hepatotoxizität. Diese ist bei 17-AAG der stärkste therapielimitierende Faktor. Bei diesem in vitro Setting kann die Hepatotoxizität jedoch nicht getestet werden.

In der Literatur zeigt sich als weiterer wesentlicher Unterschied von CCT018159 und PU-H71 zu 17AAG die Unabhängigkeit von der NADPH-Dehydrogenase und von P-Glykoprotein. (Sharp S. Y., Boxall K. et al. 2007) Hierdurch ergeben sich vor allem vor dem Hintergrund einer möglichen Resistenzentwicklung Vorteile der beiden neueren Inhibitoren gegenüber 17-AAG. Dieser Vorteil konnte in dieser Arbeit jedoch nicht gemessen werden. Besonders im Hinblick auf klinische Studien könnte er jedoch eine relevante Rolle spielen.

Für den synthetischen Inhibitor CCT018159 ist weiterhin im Unterschied zu 17-AAG und PU-H71 eine verbesserte Wasserlöslichkeit beschrieben. (Sharp S. Y., Boxall K. et al. 2007)

### 9.2.5. Diskussion der Ergebnisse der Kombinationsbehandlungen

Die erwartete Wirkungsverstärkung einer Kombinationsbehandlung von HSP 90-Inhibitoren und Hitzeschock zeigte sich in dieser Arbeit nur beim Proliferationsassay und nur bei der Zelllinie des Liposarkoms (Abbildungen 22-24). Sowohl bei den Viabilitätsassays als auch den klonogenen Assays zeigte sich keine Wirkungsverstärkung der Kombinationsbehandlungen.

Sowohl beim Viabilitätsassay als auch beim Proliferationsassay zeichnete sich im Bereich mittlerer Inhibitorenkonzentrationen ein leicht gegenteiliger Effekt ab, der eine gegenseitige Wirkungsabschwächung von HSP 90 Inhibition und Hitzeschock andeuten könnte: Vor allem im Bereich der mittleren Behandlungsdosen der Inhibitoren CCT018159 und PU-H71 zeigt sich bei den Fibroblasten und Leiomyosarkomzellen ein Auseinanderdivergieren der Kurven mit einer deutlich höheren relativen Viabilität bzw. Proliferation der in Kombination mit HSP 90-Inhibitor und Hitzeschock behandelten Zellen (Abbildungen 15,16 und 23,24).

Grund hierfür könnte die Hitzeschock vermittelte vermehrte Expression von HSP 90 sein. Hierdurch könnte die Zelle den Stress in Form von Hitze besser verarbeiten. Diese Zunahme der Expression konnte bereits in den Versuchen zur HSP-Expression gezeigt werden (siehe 8.1.). Durch den Hitzeschock und die damit zusammenhängende vermehrte HSP 90 Expression können Ressourcen -im Sinne von aktivem HSP 90- aktiviert werden, welche Viabilität, klonogene Aktivität und Proliferation verbessern. Beispielsweise wird durch die HSP 90-vermittelte Aktivierung von Klientenproteinen wie CDK4, CDK6, Cyclin D, welche für Zellzyklus und Zellteilung entscheidend sind, das Überleben der Zellen verbessert. (Wandinger, Richter et al. 2008)

Ein weiterer Grund könnte eine bei diesen Medikamentendosen nicht vollständige Inhibition von HSP 90 durch den Inhibitor sein. Durch die vermehrte Expression von HSP 90 könnten höhere Dosen der HSP 90-Inhibitoren nötig sein, um das in der Zelle vorhandene HSP 90 zu hemmen.

Weiterhin könnte die vermehrte Aktivierung der anderen Hitzeschockproteine eine Rolle spielen. Hierdurch könnte die Zelle den Stress in Form von Hitze evtl. besser verarbeiten. Dies wurde in einer präklinischen Studie ebenfalls bereits gezeigt. Auch hier kam es unter HSP 90 Inhibition in Kombination mit Stress (in Form von Bestrahlung) zu einer Hochregulation der HSP 70-Expression. Dies wurde von den Autoren ebenfalls als eine Art Kompensationsmechanismus gedeutet. (Kudryavtsev, Khokhlova et al. 2017)

In der Literatur finden sich zu einer gegenseitigen Beeinflussung von Hitzeschock und HSP 90 Inhibition nur wenige Publikationen, die keine ausreichende Erklärung bieten.

Ein weiterer Grund für eine fehlende Wirkungsverstärkung der Kombinationsbehandlung bei den Viabilitätsassays und klonogenen Assays könnte sein, dass die Behandlungszeitpunkte mit Hitze und HSP 90-Inhibitor ungünstig zueinander lagen. In Studien zeigte der Hitzeschock Zytotoxizität insbesondere in der S-Phase des Zellzyklus (Powell and Kachnic 2011). Die Behandlung mit einem HSP 90-Inhibitor resultiert jedoch eher in einem Stop in einer anderen Phase des Zellzyklus: der G0/1-Phase. (Sharp, Boxall et al. 2007). Bei den Viabilitätsassays und den klonogenen Assays erfolgte die Behandlung mit dem HSP 90-Inhibitor vor dem Hitzeschock. Dies führte dazu, dass sich die Zellen zum Zeitpunkt des Hitzeschocks in G0/1-Phase befinden. In dieser Zellzyklusphase sind die Zellen vermutlich weniger anfällig für die zytotoxische Wirkung des Hitzeschockes.

Bei der Kombination Chemotherapie und Hyperthermie gibt es weitere Quellen, die auf die Bedeutung der Behandlungszeitpunkte hinweisen. Bereits Lazlo vermutete 1998, dass die Zelle durch zeitliche Abstimmung von Therapien (beispielsweise mit einem Zytostastikum zur Hyperthermie) einen

zusätzlichen Effekt haben könnte. Die Therapieeffekte könnten beispielsweise durch Zusammenwirken in einer Teilungsphase des Zellzyklus verstärkt werden. (Laszlo 1998)

Weitere Hinweise dafür, dass die zeitliche Abfolge eine Rolle spielen könnte, sind die Ergebnisse der unterschiedlichen HSP Expression nach verschiedenen Erholungszeiten. Ein deutlicher Peak der HSP 90-Expression zeigte sich bei 2-6 h Erholungszeit nach Hitzeschock.

Beim Proliferationsassay erfolgte aufgrund dieser Überlegungen die Medikamentengabe nach 4 h nach Hitzeschock, am Zeitpunkt einer vermehrten Expression.

Bei den Proliferationsassays konnte eine Wirkungsverstärkung der Kombinationsbehandlung bei den Liposarkomzellen gezeigt werden (Abbildungen 22-24). Es bestätigte sich hier die Erwartung, dass die Kombinationsbehandlung bei Sarkomzellen effektiver ist als bei den Fibroblasten.

Ein möglicher Grund hierfür könnten einerseits die fehlenden oder weniger effektiven Kompensationsmechanismen für Stress in Tumorzellen sein, welche die Abhängigkeit von Hitzeschockproteinen verstärken. (Johnson, V.A., Singh, E.K. et al. 2010) Durch die HSP 90 Inhibition am Zeitpunkt einer vermehrten HSP 90-Expression scheint die Zelle bereits unter einem gewissen Maß an Stress zu stehen. Es scheint, dass die Zelle wie beabsichtigt für den Hitzeschock nicht mehr ausreichende Kompensationsmechanismen besitzt, um diesen verarbeiten zu können.

Ein weiterer Grund könnte die Hypothese sein, dass HSP 90 in Tumorzellen vermehrt in aktivem Zustand vorliegt, wodurch HSP 90-Inhibitoren in Tumorzellen besser HSP 90 binden als in nicht malignen Zellen. (Kamal A., Sensitaffar J. et al. 2003) Dies würde zu demselben Effekt führen: die Tumorzelle kann den Stress durch die HSP 90 Inhibition in Kombination mit Hitze nicht verarbeiten.

Die Liposarkomzellen zeigten jedoch auch in den Viabilitätsassays im Vergleich zu den Leiomyosarkomzellen eine höhere Empfindlichkeit auf die Inhibitoren. Vielleicht ist diese höhere Abhängigkeit der Liposarkomzellen von HSP 90 eine Voraussetzung für die Wirkungssteigerung durch Hyperthermie. Der Grund hierfür ist bisher nicht geklärt. In einigen Studien wurden die L-Sarkome öfter als eine Entität gegenüber den Nicht-L-Sarkomen (Synovialsarkom, Ewing-Sarkom) zusammengefasst. Studien zur weiteren Erforschung der unterschiedlichen Charakteristika im Hinblick auf HSP 90 Expression liegen bisher weder für das Liposarkom, noch für das Leiomyosarkom vor.

Der verbesserte Effekt der Kombinationsbehandlungen von 17-AAG (und - geringer ausgeprägt - auch CCT018159 und PU-H71) mit klinisch relevantem Hitzeschock bei den Liposarkomzellen könnte vorbereitend für weitere Versuche sein. Da sowohl die Medikamentendosierungen (siehe oben), als auch die Behandlungsdauer bereits an klinische Studien angelehnt sind, wären weitere Studien in dieser Kombination anzudenken. Auch in klinischen Phase-II-Studien erfolgte die Gabe von HSP 90-Inhibitoren an mehreren Tagen mit kurzen Abständen (beispielsweise Tag 1, 4, 8) um einen stabil hohen Plasmaspiegel zu erreichen, gefolgt von einer Pause nach Tag acht. (Gartner, Silverman et al. 2012) (Pedersen, Kim et al. 2015). Da in dieser Arbeit der Proliferationsassay die besten Ergebnisse zeigte, wären aufgrund der Studienlage sicherlich die Versuche mit einer längeren Behandlungsdauer auch für weitere klinische Studien besser geeignet.

Mehrere wichtige komplexere in vitro und in vivo Mechanismen konnten in den vorliegenden Untersuchungen nicht mitberücksichtigt werden:

Ein Mechanismus ist die vermehrte Aktivität des Immunsystems nach Hitzeschock, insbesondere natürliche Killerzellen. Es konnte gezeigt werden, dass die vermehrte Expression vor allem von HSP 70 und HSP 90 nach Hitze zu einer erhöhten Aktivität des Immunsystems führt. Diese richtet sich unter anderem gegen den Tumor und erfolgt durch die Freisetzung der Hitzeschockproteine in den Extrazellulärraum. (Milani V., Noessner E. et al. 2002)

Ein zweiter Effekt ist die Hyperthermie-bedingte verbesserte Perfusion des Tumors. Hierdurch können Zytostatika eine höhere und vor allem schnellere Konzentration im Tumorgewebe erreichen. (Issels 2008) Diese Versuchen fanden unter Zellkulturbedingungen statt. Etliche Wirkungen des menschlichen Gewebes und Körpers wie beispielsweise hormonelle Wirkungen, Wirkungen des Stoffwechsels und das Mikromilieu der Gewebe (insbesondere die unterschiedliche Oxygenierung) konnten nicht mit abgebildet werden. Experimente in vivo, welche die oben genannten Mechanismen widerspiegeln, sind daher für die weitere Untersuchung der Kombinationsbehandlungen unerlässlich.

### **9.2.6. Vergleich der Methoden Viabilitätsassay- klonogener Assay-Proliferationsassay**

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Methoden verwendet, um das Verhalten der Zellen nach den Kombinationsbehandlungen bezüglich Viabilität, klonogenem Überleben und Proliferation zu charakterisieren.

Initial begonnen wurde mit dem Viabilitätsassay als einfach anzuwendende Screening-Methode. Im Viabilitätsassay wird die Aktivität der Atmungskette in den Zellen und indirekt die Zahl der vitalen Zellen dargestellt. (Schröterová et al 2009) Gemessen wurde hierbei also eine enzymatische Aktivität und hierdurch indirekt die Viabilität. Berücksichtigt wurden hierbei jedoch weder die Generationszeit noch die Fähigkeit der Zellen, sich zu reproduzieren.

In dieser Arbeit zeigt sich ein Rückgang der relativen Viabilität nur in hohen Medikamentendosen und kein zusätzlicher Effekt der Kombinationsbehandlung (Abbildungen 14-16). Es zeigen sich tendenziell eher schwächere Dosis-Effekt-Beziehungen beim Viabilitätsassay. Die enzymatische Aktivität nach vier Tagen als Messgröße ist sowohl von der Behandlung mit dem HSP 90 Inhibitor als auch in der Kombinationsbehandlung nur wenig betroffen.

Es wurden, um nicht nur die Viabilität als Messgröße heranzuziehen, klonogene Assays durchgeführt (Abbildungen 18,19). Der klonogene Assay ist ein Test mit hoher Sensitivität und Spezifität für das klonogene Überleben. (Hoffmann 1991) Bei diesem Test wird neben dem Überleben auch die Fähigkeit der Zelle, Kolonien zu bilden, sich zu reproduzieren, abgebildet. Indirekt können sogar anhand des Aussehens der Kolonien Rückschlüsse auf den Zustand der Zellen gewonnen werden. (Sommer 2010) Ein weiterer Vorteil des klonogenen Assays ist, dass auch die unterschiedliche Generationszeit der Zelllinien in die Bewertung mit einfließt, da lediglich Kolonien ab einer gewissen Größe nach der determinierten Zeit (11 Tage) gezählt werden. Weiterhin spiegelt der klonogene Assay durch die dünne Aussaat der Zellen die Messgrößen 'Überleben' und 'Fähigkeit zur Reproduktion' unter Stressbedingungen auf die Zelle wider. Das Zellverhalten in diesem Test ermöglicht hierdurch einen höheren Bezug auf das Tumorstadium in vivo. Ein Nachteil war in dieser Arbeit die hohe Fehlerabweichung dieses Assays.

Es zeigte sich bei den beiden Zelllinien und bei beiden Inhibitoren eine deutliche Dosis-Effekt-Beziehung des klonogenen Überlebens, jedoch kein zusätzlicher Effekt der Kombinationsbehandlung

mit Hitzeschock (Abbildungen 18,19). Es zeigen sich allerdings Hinweise, dass die Zellen zwar noch fähig sind Kolonien zu bilden, die Qualität der Zellverbände jedoch eingeschränkt ist und die Zellen nach morphologischen Gesichtspunkten in ihrer Vitalität eingeschränkt erscheinen (siehe Kapitel 9.2.2.). Dieser Effekt zeigte sich am deutlichsten in den mit Kombinationsbehandlung behandelten Zellen.

Als dritte Untersuchungsmethode wurde der Proliferationsassay verwendet (Abbildungen 22-24). Hierbei wurde das gleiche biochemische Nachweisverfahren zum Nachweis vitaler Zellen verwendet. Die Versuche erfolgten jedoch über einen deutlich längeren Zeitraum. Hierdurch konnte beobachtet werden, ob die Zellen sich reproduzieren, vitale Tochterzellen bilden. Da die Generationszeit bei den verwendeten Zelllinien zwischen 36 und 42 Stunden liegt (siehe Tabelle 5), waren nach 8 Tagen, d.h. nach mehreren erfolgten Zellteilungen, Aussagen zur Proliferationsfähigkeit der Zellen möglich. Die in diesem Assay gemessene Viabilität ist also proportional zu den durch Proliferation hervorgegangenen Tochterzellen. Es erfolgt damit eine weitreichendere Messung, als die kurzfristigen Stoffwechsellerscheinungen direkt nach der Behandlung wie beim Viabilitätsassay.

Zusammenfassend ergänzen sich die drei Methoden, da sie unterschiedliche Messpunkte darstellen. Stoffwechsellerscheinungen wie beim Viabilitätsassay sind deutlich schwieriger zu interpretieren (auch im Hinblick auf mögliche folgende klinische Studien) als das klonogene Überleben oder die Proliferation. Die beiden letztgenannten Tests geben neben dem reinen Überleben außerdem noch andere Messgrößen (beispielsweise die Fähigkeit zur Reproduktion) wieder. Das Zellverhalten in diesen Tests ist daher eher mit Tumorwachstum in vivo in Bezug zu setzen. Aus diesen Gründen sind sowohl der klonogene Assay als auch der Proliferationsassay für die klinische Forschung interessanter.

Weiterhin erfolgte in klinischen Studien die Gabe des Medikaments ebenfalls über einen längeren Zeitraum (Gartner, Silverman et al. 2012) (Pedersen, Kim et al. 2015). Daher bietet – auch im Hinblick auf mögliche nachfolgende klinische Studien – die Anwendung von Proliferations- und klonogenem Assay eine gute Kombination, die wichtige Aspekte neben der reinen enzymatischen Aktivität der Zellen berücksichtigt. Gerade bei den neueren Krebsmedikamenten erfolgt im Gegensatz zu den Zytostatika oft eine kontinuierliche Gabe. Eine längere Beobachtungszeit wie beim Proliferationsassay und klonogenen Assay ist somit sinnvoll.

Der Proliferationsassay könnte hierbei aufgrund wesentlich einfacherer Durchführbarkeit als Screening-Methode dienen, der klonogene Assay zur Bestätigung und weiteren Vertiefung der Ergebnisse.

### **9.3. Untersuchung verschiedener Signaltransduktionswege (AKT-mTor und MAP-Kinase) unter HSP 90 Inhibition**

Der AKT-mTor-Signalweg ist ein intrazellulärer Signaltransduktionsweg. Er hat eine zentrale Funktion inne bei Stoffwechsel-, Wachstum- und Proliferation der Zelle. Zwei Kinasen -AKT und mTOR- haben im Signalweg entscheidende zentrale Funktionen. (Wan and Helman 2007) AKT ist eines der wichtigsten Klientenproteine von HSP 90. Diese Signaltransduktionskaskade weist bei Weichteiltumoren häufig einen dysregulierten Zustand auf. In vielen Sarkomen ist der AKT-Signalweg

konstitutiv aktiviert und führt zu vermehrter Proliferation und verminderter Apoptose der betroffenen Zellen, was letztendlich zu einem vermehrten Tumorstadium führt. (Kelleher and Thomas 2012)

Der mTor Komplex, welcher unter anderem durch AKT aktiviert werden kann, hat ebenfalls eine zentrale Rolle in der zellulären Regulation inne. Insbesondere wird durch den mTor Signalweg der Übergang der G1-Phase zur S-Phase des Zellzyklus begünstigt, was zur Zellteilung führt. (Chou, Prince et al. 2012) In dieser Arbeit erfolgte daher die Untersuchung der Aktivierung der Signalwege dieser wichtigen Klientenproteine von HSP 90 unter HSP 90 Inhibition. Intention war, hiermit mögliche Rescue-Pathways der Zelle genauer zu untersuchen.

Der Quotient  $P_{Ser}\text{-AKT} / \text{AKT-pan}$  zeigt nach Behandlung mit 17AAG und CCT018159 eine deutliche Zunahme unter HSP 90-Inhibition im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, nicht nach der Behandlung mit PU-H71. Bei der Behandlung mit der höchsten Konzentration zeigt sich wiederum eine deutliche Abnahme (Abbildung 25). Dies könnte durch den toxischen Effekt des Inhibitors bedingt sein.

Der Quotient  $P_{Threo}\text{-AKT} / \text{AKT-pan}$  zeigt nur eine minimale initiale Zunahme nach Behandlung mit HSP 90-Inhibitoren. Dann zeigt sich eine deutliche Abnahme unter steigenden Inhibitor-Konzentrationen, bei PU-H71 bereits unter geringen Konzentrationen, bei 17-AAG nur bei den höheren Dosen (Abbildung 26).

Betrachtet man ein direktes Downstream-target von AKT, den mTOR1-Komplex, zeigt der Quotient  $P\text{-mTOR} / \text{mTOR}$  bei der Behandlung mit allen drei Inhibitoren eine deutliche Zunahme bei der niedrigsten Inhibitor Konzentration im Vergleich zur nicht behandelten Kontrolle. Unter steigenden Inhibitor Konzentrationen zeigt sich dann bei der Behandlung mit allen drei Inhibitoren wieder eine sukzessive Abnahme des Quotienten (Abbildung 27).

Die initiale Zunahme der beiden Quotienten  $P_{Ser}\text{-AKT} / \text{AKT-pan}$ ,  $P_{Threo}\text{-AKT} / \text{AKT-pan}$  und  $P\text{-mTOR} / \text{mTOR}$  könnte als Stressreaktion der Zelle gedeutet werden. Durch den Stress auf die Zelle durch die Medikamentengabe könnte der Signalweg aktiviert werden.

Eine Folge der HSP 90 Inhibition, vor allem bei hohen Konzentrationen, scheint eine Abnahme der Aktivität des promotogenen AKT-Signalweges zu sein. Die Abnahme der Aktivität des Signalweges ist kongruent mit bereits veröffentlichten Studien. (Nam, Kim et al. 2017) Erste Studien zu einer Kombination von HSP 90 Inhibition mit Inhibition des AKT-Signalweg zeigen bereits vielversprechende Ergebnisse. (Martins, Ordoñez et al. 2008)

Die verminderte mTor-Aktivierung unter zunehmender HSP 90 Inhibition bestätigt die Annahme der reduzierten Aktivität des AKT-Signalweges unter HSP 90 Inhibition. Die verminderte mTor-Aktivierung ist ebenfalls kongruent mit anderen Studien (beispielsweise der P-mTOR Abnahme unter Behandlung mit PU-H71 beim Burkitt-Lymphom). (Giulino-Roth, van Besien, et al. 2017) In dieser Studie konnte auch schon ein zusätzlicher Effekt einer Kombinationstherapie HSP 90 Inhibition – mTOR Inhibition gezeigt werden.

Studien zeigen weiterhin, dass eine mTOR-Inhibition, vor allem mTORC1-Inhibition, in vivo wiederum zu einer verminderten HSP 90, HSP 70 und HSP 100 Expression führt. (Chou, Prince et al. 2012) Es scheint eine indirekte Inhibition in beide Richtungen möglich.

Die MAP-Kinase-Signalkaskade, eine weitere wichtige Signalkaskade, übt sich ebenfalls promotogen auf die Zelle aus. Ein Schlüsselprotein dieser Signalkaskade ist ERK. Dieser Signalweg greift unter anderem über das Klientenprotein S6K in die Translation ein und wirkt sich so stimulierend auf Proliferation und Zellwachstum aus. (Zimmermann and Moelling 1999)

Der Quotient  $P\text{-ERK} / \text{ERK-pan}$  zeigt bei der Behandlung mit allen drei Inhibitoren eine deutliche Zunahme im Vergleich zur nicht behandelten Kontrolle. Unter steigenden Inhibitor-Konzentrationen

zeigt sich dann bei der Behandlung mit 17AAG kein weiterer Anstieg, bei der Behandlung mit CCT018159 und PU-H71 zeigt sich eine weitere sukzessive Zunahme des Quotienten unter steigenden Konzentrationen (Abbildung 28).

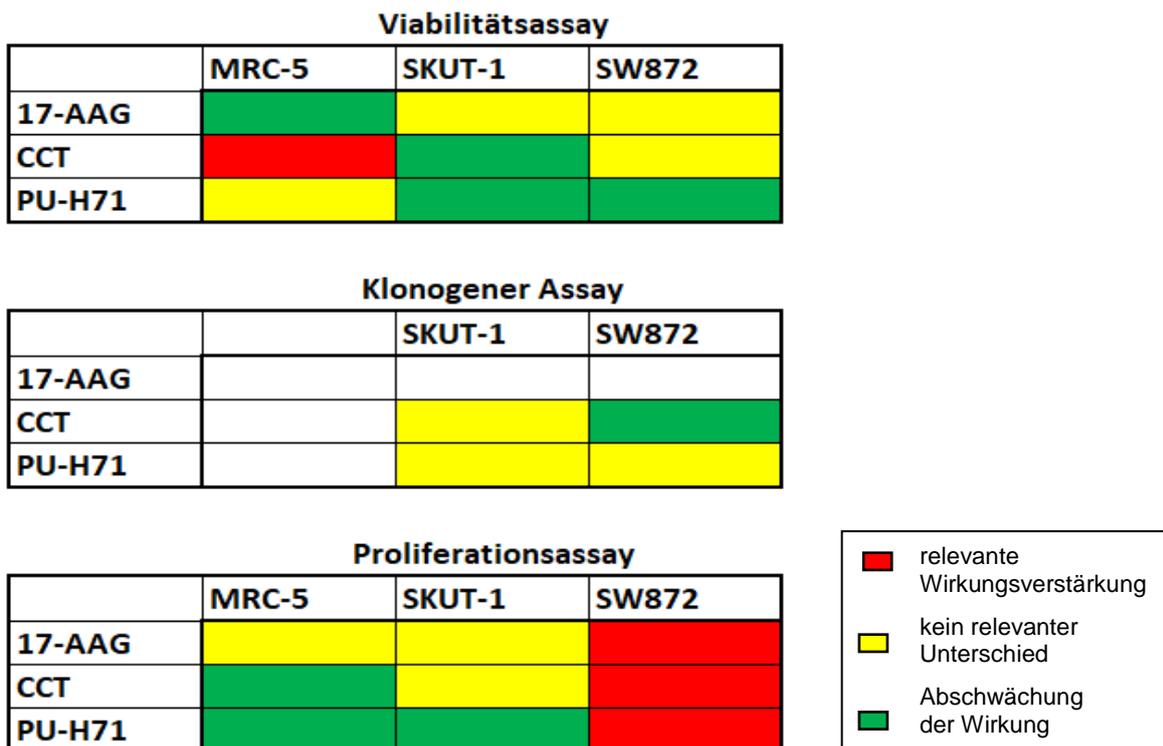
Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine Aktivierung des ERK-Signalweges als rescue-Pathway sein. In der Tumorzelle könnte unter HSP 90 Inhibition bei diesen Sarkomzellen eine vermehrte ERK-Aktivität als Überlebensmechanismus der Zelle dienen.

## 10. Zusammenfassung und Ausblick

Die mittels Western Blot gezeigte vermehrte HSP 90 Expression nach Hitzeschock war Ausgangspunkt dieser Arbeit. Es wurde die Expression verschiedener Hitzeschockproteine nach Hitzeschock mit verschiedenen Erholungszeiten untersucht. Hierbei zeigte sich eine deutliche Hochregulation der HSP 90 Expression mit zwei Höhepunkten nach 2-6 Stunden und nach 18-36 Stunden Erholungszeit nach Hitzeschock. Dies bestätigte einerseits die Erwartungen, da die vermehrte HSP 90 Expression nach Hitzeschock bereits in der Literatur an anderen Tumorentitäten in ähnlicher Weise beschrieben wurde. (Willot, Gueydan et al. 2017; Iftinca, Flynn, et al. 2016) Andererseits diente diese Erkenntnis als Grundlage für weitere Experimente mit Kombinationstherapie Hitzeschock - HSP 90 Inhibition. Die Hypothese war, durch die vermehrte HSP 90-Expression eine stärkere Wirkung der Kombinationsbehandlung HSP 90-Inhibitor – Hitzeschock zu erreichen.

Es erfolgten daher drei verschiedene Assays mit Kombinationsbehandlungen. Die Kombinationsbehandlungen erfolgten mit den drei verschiedenen HSP 90-Inhibitoren 17-AAG, CCT018159 und PU-H71 und klinisch relevantem Hitzeschock in zwei Temperaturen an Fibroblasten (MRC-5) und zwei Sarkomzelllinien (SKUT-1 und SW872).

Zunächst ein erneuter Überblick über die Ergebnisse der Kombinationsbehandlungen:



**Abbildung 34:** Überblick über die Ergebnisse der Kombinationsbehandlungen

Gezeigt sind die Ergebnisse der Kombinationsbehandlung Hitze - Medikament des Viabilitätsassays, klonogenen Assays und Proliferationsassays. Rot steht hierbei für ein Auseinanderdivergieren der hitzekorrigierten Kurven und damit eine relevante Wirkungsverstärkung der Kombinationsbehandlungen. Gelb steht für keinen relevanten Unterschied der Kombinationsbehandlung. Grün steht ebenfalls für ein Auseinanderdivergieren der Kurven mit einer Abschwächung der Wirkung der Kombinationsbehandlungen.

Die Viabilitätsassays wurden zuerst in Monotherapie mit den drei verschiedenen HSP 90-Inhibitoren durchgeführt. Hierbei zeigte sich ein mäßiges Ansprechen auf die HSP 90-Inhibitoren. Es erfolgte daher die Kombinationstherapie mit Hitzeschock. Es zeigte sich bei keiner der Kombinationen eine relevant vermehrte Zytotoxizität der Kombinationstherapie, teilweise sogar tendenziell der gegenteilige Effekt einer verbesserten relativen Viabilität der in Kombinationsbehandlung behandelten Zellen.

Um eine weitere Methode neben der Viabilitätsmessung zu erfassen, erfolgten klonogene Assays. Das Experiment konnte jedoch nicht mit Fibroblasten erfolgen. In den in dieser Arbeit durchgeführten klonogenen Assays zeigt sich bei der Kombinationsbehandlung Hitze – Medikament bei den Liposarkomzellen SW872 eher eine vermehrte Kolonienbildung. Bei den Leiomyosarkomzellen zeigte sich kein deutlicher Unterschied der Überlebenskurven der unterschiedlichen Temperaturen bei den Kombinationsbehandlungen. Weiterhin zeigte sich jedoch ein interessanter Effekt: bei der in Kombination mit Medikament und Hitze behandelten Zellen zeigten sich mit zunehmender Medikamentenkonzentration die einzelnen Kolonien schwächer eingefärbt, wirken kleiner und unregelmäßiger.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit Proliferationsassays durchgeführt, bei denen der Hitzeschock vor der Medikamentengabe erfolgte. Da in klinischen Studien die Behandlung mittels HSP 90-Inhibitor über einen längeren Zeitraum erfolgte (Pedersen, Kim et al. 2015), wurde in diesem Versuchsaufbau außerdem eine Behandlungsdauer über 7 Tage gewählt. Es wurde des Weiteren die Induktion der HSP 90 Expression mit einem Peak nach 2-6 Stunden berücksichtigt, indem die medikamentöse HSP 90 Inhibition 4 h nach Hitzeschock erfolgte. Bei den Proliferationsassays zeigten sich zwei verschiedene Reaktionsmuster: Es zeigte sich bei der Kombinationsbehandlung Hitze - Inhibitor die schon bei den Viabilitätsassays festgestellte nicht beeinflusste oder verminderte Zytotoxizität bei den Fibroblasten und Leiomyosarkomzellen. Bei den Liposarkomzellen zeigte die Kombinationsbehandlung jedoch eine deutliche Wirkungsverstärkung des Inhibitors und damit einen verbesserten Effekt der Kombinationsbehandlung.

Weiterführende Studien in der Kombination 17-AAG – Liposarkom interessant, vor allem da bei den in dieser Arbeit durchgeführten in vitro Experimenten wichtige Effekte (wie 9.2.4. beschrieben), die die Behandlung mit Hyperthermie in vivo weiter verstärken, in dieser Arbeit nicht berücksichtigt werden konnten. Wichtig erscheint die Berücksichtigung der zeitlichen Abfolge der Behandlungen. Beim Liposarkom zeigte der Proliferationsassay die stärkste Wirkungsverstärkung der Behandlung mit Hitzeschock vor der Medikamentengabe.

Zusammenfassend zeigten die Kombinationsversuche teils widersprüchliche Ergebnisse, hohe Fehlerabweichungen und nicht die erwarteten Abschwächungen der Inhibitorwirkungen mit Ausnahme des Proliferationsassays bei den Liposarkomzellen. Weitere Untersuchungen sind daher zu empfehlen.

Es erfolgte schließlich die Untersuchung der zwei wichtigen Signaltransduktionswege AKT-mTor und MAP-Kinase unter HSP 90 Inhibition. In dieser Arbeit zeigten sich unter HSP 90 Inhibition bei allen drei HSP 90-Inhibitoren mit steigenden Konzentrationen eine verminderte Aktivität des AKT-mTor-Signalweges.

Bei der Betrachtung der MAP-Kinase-Kaskade zeigte sich unter HSP 90 Inhibition mit allen drei Inhibitoren eine vermehrte Expression der phosphorylierten Form von ERK, eines Schlüsselenzymes der Signalkaskade.

Bezüglich der Methoden wäre bei weiterführenden Versuchen die Verwendung von Proliferationsassays und klonogenen Assays sinnvoll, da diese durch die zeitlich längere

Medikamentenwirkung auf die Zellen näher an die klinische Behandlung angelehnt sind. Der Proliferationsassay ist für das Screening unter verschiedenen Behandlungsbedingungen sinnvoll, da dieser weitere Messgrößen neben der reinen Viabilität darstellt und dennoch Zeit- und Material sparend durchführbar ist. Zur Bestätigung, weiteren Vertiefung wäre dann der klonogene Assay eine geeignete Methode. Ideal wären im Anschluss in vivo Modelle, um komplexere in vivo Mechanismen ebenfalls zu berücksichtigen.

Weichteilsarkome sind bei Erstdiagnose oft bereits weit fortgeschritten. Effiziente Therapieoptionen sind daher für die Patienten oft lebenswichtig. Es sollten aufgrund der aktuell noch fehlenden langfristig wirksamen Therapien weitere Therapiemöglichkeiten weiterverfolgt und erforscht werden.

## 11. Literatur

- Alektiar, K. M., K. Hu, et al. (2000). "High-dose-rate intraoperative radiation therapy (HDR-IORT) for retroperitoneal sarcomas." Int J Radiat Oncol Biol Phys **47(1)**: 157-163.
- Alberts, B. (2002). " Ras Activates a Downstream Serine/Threonine Phosphorylation Cascade That Includes a MAP-Kinase. ." Molecular Biology of the Cell **4**.
- Ambati, R. S., et al. (2014). "Pre-clinical efficacy of PU-H71, a novel HSP 90-inhibitor, alone and in combination with bortezomib in Ewing sarcoma." Mol Oncol. **8(2)**( 323–336).
- Arora, E. M. (2008). "Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy." J.Pharmacol.Exper. **3**: 971-979.
- Bagatell, R., L. Gore, et al. (2007). "Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of 17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in pediatric patients with recurrent or refractory solid tumors: a pediatric oncology experimental therapeutics investigators consortium study." Clin cancer res **13(6)**: 1783-1788.
- Bauer, K. D. and K. J. Henle (1979). "Arrhenius analysis of heat survival curves from normal and thermotolerant CHO cells." Radiation research **78(2)**: 251-263.
- Beger, C. and B. Schlegelberger (2009). "Genetische Veränderungen bei Weichteilsarkomen." Der Onkologe **15 (4)**: 359-363.
- Bellacosa, et al. (2004). " A Portrait of AKT kinases." Cancer Biology and Therapy **3**: 268–275.
- Bekki, H., K. Kohashi, et al. (2015). "Elevated expression of HSP90 and the antitumor effect of an HSP90 inhibitor via inactivation of the Akt/mTOR pathway in undifferentiated pleomorphic sarcoma." BMC Cancer. **15**: 804.
- Bergerat, A., B. de Massy, et al. (1997). "An atypical topoisomerase II from Archea with implications for meiotic recombination." Nature **386**: 414-417.
- Broemer M, K. D., Schneiderei C (2004). "Requirement of HSP 90 activity for ikappaB Kinase (IKK) biosynthesis and for constitutive and inducible Ikk NF-kappa-B activation." Oncogene **23**: 5378-5386.
- Caldas-Lopes E., Cerchietti L., et al. (2009). "Hsp90 inhibitor PU-H71, a multimodal inhibitor of malignancy, induces complete responses in triple-negative breast cancer models." Proc Natl Acad Sci U S A **106(20)**: 8368–8373.
- Cerny, T., R. D. Issels, et al., Eds. (2006). Weichteilsarkom. Berlin, Heidelberg, Springer.
- Cargnello, M. and P. P. Roux (2011). " Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. ." Microbiology and molecular biology reviews **75(1)**: 50–83.
- Chou, S. D., et al. (2012). "mTOR is essential for the proteotoxic stress response, HSF1 activation and heat shock protein synthesis." PLoS One **7(6)**.

Chaklader, M., P. Das, et al. (2012). "17-AAG mediated targeting of HSP 90 limits tert activity in peritoneal sarcoma related malignant ascites by downregulation cycling D1 during cell cycle entry." Experimental Oncology **34(2)**: 90-96.

Chiosis, G. (2006). "Targeting chaperones in transformed systems-a focus on HSP 90 and cancer." Expert Opinion on Therapeutic Targets **10(1)**: 37-50.

Chiosis, G., M. Timaul, et al. (2001). "A small molecule designed to bind to the adenine nucleotide pocket of Hsp 90 causes Her2 degradation and the growth arrest and differentiation of breast cancer cells." Chemistry and Biology **8(3)**: 289-299.

Curran, M. P. and K. McKeage (2009). "Bortezomib: a review of its use in patients with multiple myeloma." Drugs **69(7)**: 859-888.

D'Angelo, S. P., et al. (2018). "Nivolumab with or without ipilimumab treatment for metastatic sarcoma (Alliance A091401): two open-label, non-comparative, randomised, phase 2 trials." Lancet Oncol. [Epub ahead of print].

Dancey, J. E. (2006). "MTOR and Related Pathways. ." Cancer Biology & Therapy **5**: 1065–1073.

Demetri G.D. et al. (2017). „Activity of Eribulin in Patients With Advanced Liposarcoma Demonstrated in a Subgroup Analysis From a Randomized Phase III Study of Eribulin Versus Dacarbazine.“ J. Clinical Oncology **35**: 3433-3439.

Dewey W.C., Thrall D.E., et al. (1977). "Hyperthermia and radiation – a selective thermal effect on chronically hypoxic tumor cells in vivo." Int J Radiat Oncol Biol Phys **2**:99–103.

Dings, R. P., M. L. Loren, et al. (2011). "Tumour thermotolerance, a physiological phenomenon involving vessel normalisation." International Journal of Hyperthermia **27(1)**: 42-52.

Enzinger, F., S. W. Weiss, et al., Eds. (2001). General considerations. In, translator and editor Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors. Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors. St Louis: Mosby.

Casali, P.G., Abecassis, N. et al. on behalf of the ESMO Guidelines Committee and EURACAN (2018). "Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO–EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up" Annals of Oncology **29** (Supplement 4): iv51–iv67

Fisher, D.L., D. Mandard, et al. (2000). „Hsp90 is required for c-Mos activation and biphasic MAP kinase activation in *Xenopus* oocytes." The EMBO Journal **19**, 1516-1524.

Fujita, N., S. Sato, et al. (2002). "Involvement of HSp in signaling an stability of 3-phosphoinositide-dependent- kinase." Journal of Biol Chem **277**: 10346-10353.

Gartner, E. M., et al. (2012). "A phase II study of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in metastatic or locally advanced, unresectable breast cancer." Breast Cancer Res Treat. **131 (3)**: 933-937.

Gellermann, J., B. Hildebrandt, et al. (2006). "Noninvasive magnetic resonance thermography of soft tissue sarcomas during regional hyperthermia: correlation with response and direct thermometry." Cancer. **107(6)**: 1373-1382.

Georgescu, M. (2010). „PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control.“ *Genes Cancer*. 1(12): 1170–1177.

Goloubinoff P., Mogk A., et al. (1999). "Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a chaperone network." *Proc Natl Acad Sci USA* **96 (24)**: 13732-13737.

Grammatikakis, N., A. Vultur, et al. (2002). "The role of Hsp 90N, a new member of the Hsp 90 family, in signal transduction and neoplastic transformation." *J. Biol. Chem* **277 (10)**: 8312–8320.

Giulino-Roth, L., van Besien, H., Cesarman, E., et al. (2017). „Inhibition of Hsp90 suppresses PI3K/AKT/mTOR signaling and has antitumor activity in Burkitt lymphoma.“ *Mol Cancer Ther.* **16(9)**: 1779–1790.

Guillou L., Coindre J.M., et al. (1997). "Comparative study of the National Cancer Institute and French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group grading systems in a population of 410 adult patients with soft tissue sarcoma." *J Clin Oncol* 15(1):350-62.

Halilovic, E. a. S., D. B. (2008). "Strategies for inhibiting oncogenic BRAF signaling." *Curr.Opin.Pharmacol.* **8**: 419-426.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011). „Hallmarks of cancer: the next generation.“ *Cell* **144(5)**:646-74

Harnicek D., Kampmann E., et al. (2016). "Hyperthermia adds to trabectedin effectiveness and thermal enhancement is associated with BRCA2 degradation and impairment of DNA homologous recombination repair." *Int J Cancer.* **139(2)**:467-79.

Hartmann, J. T., M. Haap, et al. (2009 [Epub ahead of print]). "Tyrosine Kinase Inhibitors - A Review on Pharmacology, Metabolism and Side Effects." *Curr. Drug. Metab.* .

Haslbeck M., Franzmann T., et al. (2005). "Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins." *Nature structural and molecular Biology* **12(10)**: 842-846.

He, H., D. Zatorska, et al. (2006). "Identification of potent water soluble purine-scaffold inhibitors of the heat shock protein 90." *J Med Chem* **49(1)**: 381-390.

Heijkoop, S. T., Franckena, M., et al. (2012) „Neoadjuvant chemotherapy followed by radiotherapy and concurrent hyperthermia in patients with advanced-stage cervical cancer: a retrospective study.“ *Int J Hyperthermia*, **28(6)**: pp. 554-61.

Hiddeman, W. and C. Bartram, Eds. (2010). *Die Onkologie*.

Hildebrandt, B., S. Hegewisch-Becker, et al. (2005). "Current status of radiant whole-body hyperthermia at temperatures >41.5 degrees C and practical guidelines for the treatment of adults. The German 'Interdisciplinary Working Group on Hyperthermia'." *International Journal of Hyperthermia* **21(2)**: 169-183.

Hoffmann, R. M. (1991). "In vitro sensitivity assays in cancer: a review, analysis and prognosis. ." *J Clin Lab Anal* **5(2)**: 133-143.

Husain N., Verma N., (2011): „Current Concepts in Pathology of Soft Tissue Sarcoma.“ *Indian J Surg Oncol* 2(4):302–308

- Hussein, A.T., Burgess, M. et al. (2017). "Pembrolizumab in advanced soft-tissue sarcoma and bone sarcoma (SARC028): a multicentre, two-cohort, single-arm, open-label, phase 2 trial". The Lancet Oncol., **18(11)**:1493–1501.
- Huth J.F. and Eilber F.R. (1988). "Patterns of metastatic spread following resection of extremity soft-tissue sarcomas and strategies for treatment." Semin Surg Oncol. **4(1)**: 20-26.
- Iftinca, M., Flynn, R. et al. (2016). "The stress protein heat shock cognate 70 (Hsc70) inhibits the Transient Receptor Potential Vanilloid type 1 (TRPV1) channel." Mol Pain. **12**: 1744806916663945.
- Ismann, Bernhard (2016): "In vitro-Untersuchungen zur vertikalen AKT-mTOR-Inhibition in Kombination mit Hyperthermie in humanen Sarkomzelllinien." Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät
- Issels, R. D. (2008). "Hyperthermia adds to Chemotherapy." European Journal of Cancer **44(17)**: 2546-2554.
- Issels, R. D., L. H. Lindner, et al., Eds. (2004). Weichteilsarkome. MANUAL Knochentumore und Weichteilsarkome. München: Tumorzentrum München, Zuckerschwerdt Verlag.
- Issels, R. D., L. H. Lindner, et al. (2010). "Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study." Lancet Oncology **11(6)**: 561-570.
- Issels R.D., Kampmann E., et al. (2016). „Hallmarks of hyperthermia in driving the future of clinical hyperthermia as targeted therapy: translation into clinical application." Int J Hyperthermia. **32(1)**:89-95.
- Issels, R. D., et al. (2018). "Effect of Neoadjuvant Chemotherapy Plus Regional Hyperthermia on Long-term Outcomes Among Patients With Localized High-Risk Soft Tissue Sarcoma: The EORTC 62961-ESHO 95 Randomized Clinical Trial." JAMA Oncol [Epub ahead of print].
- Jhaveri, K., et al. (2012). "Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp 90) inhibitors in cancers." Biochim Biophys Acta. **1823(3)**(742–755).
- Johnson, V.A., Singh, E.K. et al. (2010) „Macrocyclic Inhibitors of Hsp90“, Curr Top Med Chem. **10(14)**: 1380–1402.
- Takechi, M., K. Ueda, et al. (1990). "Multi-institutional clinical studies on hyperthermia combined with radiotherapy or chemotherapy in advanced cancer of deep-seated organs." International Journal of Hyperthermia **6(4)**: 719-740.
- Kamal A., T. L., Sensitaffar J., et al. (2003). "A high-affinity conformation of Hsp 90 confers tumour selectivity on Hsp 90 inhibitors." Nature **425(6956)**: 407-410.
- Kampinga, H. H., J. Hageman, et al. (2009). "Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins." Cell Stress Chaperones **14(1)**: 105–111.
- Katenkamp K et al. (2009): Weichgewebstumoren. Dtsch Ärztebl Int **106(39)**: 632–636
- Kelleher, F. C. and D. M. Thomas (2012). "Molecular pathogenesis and targeted therapeutics in Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumours." Clin Sarcoma Res **2(1)**: 6.

Kravats, A. N., et al. (2018 [Epub ahead of print]). "Functional and physical interaction between yeast Hsp 90 and Hsp 70." Proc Natl Acad Sci [Epub ahead of print].

Krawczyk, P. M., et al. (2011). "Mild hyperthermia inhibits homologous recombination, induces BRCA2 degradation, and sensitizes cancer cells to poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibition. ." Proc Natl Acad Sci U S A **108(24)**: 9851-9856.

Kudryavtsev, VA, Khokhlova, AV, et al. (2017). "Induction of HSP 70 in tumor cells treated with inhibitors of the HSP 90 activity: A predictive marker and promising target for radiosensitization." PLoS ONE **12(3)**:e0173640.

Vadlakonda, L., Pasupuleti, M., Pallu, R. (2013). "Role of PI3K-AKT-mTOR and Wnt Signaling Pathways in Transition of G1-S Phase of Cell Cycle in Cancer Cells." Front Oncol 3:85. eCollection 2013

Laszlo, A. (1998). "The relationship of heat shock proteins, thermotolerance and protein synthesis. ." Exp Cell Res **178(2)**: 401-414.

Lebret, T., et al. (2006) "HSP90 Expression: A New Predictive Factor for BCG Response in Stage Ta-T1 Grade 3 Bladder Tumours." European Urology **51**: 161–167

Li J. et al. (2012) "The Hsp90 chaperone machinery: Conformational dynamics and regulation by co-chaperones" Molecular Cell Research **1823** (3): 624-635

Li, Y. P., et al. (2015). "Synthesis and biological evaluation of geldanamycin analogs against human cancer cells." Cancer Chemother Pharmacol. **75(4)**: 773-782.

Loewith, R. (2002). "Two TOR Complexes, Only One of which Is Rapamycin Sensitive, Have Distinct Roles in Cell Growth Control. ." Molecular Cell. **10(3)**: 457–468.

Liang P. and M. TH. (1997). "Molecular chaperones and the cytoskeleton." Journal of Cell Science **110 (pt 13)**: 1431-1440.

Liberek K., Marszalek J., et al. (1991). "Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK." Proc Natl Acad Sci USA **88(7)**: 2874-2878.

Mahalingam, D., R. Swords, et al. (2009). "Targeting HSP 90 for cancer therapy " british journal of cancer **1-7**: 007-0920.

Maniatis T., Sambrook J., et al. (1982). "Molecular Cloning. A Laboratory Manual." **Vol. 3**: A8.43.

Martinez-Ruiz, A., L. Villaneuva, et al. (2005). "S-nitrosylation of Hsp 90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities." Proc Natl Acad Sci **102**: 8525-8530.

Mayhew M., da Silva AC., et al. (1996). "Protein folding in the central cavity of the GroEL-GroES chaperonin complex." Nature **379(6564)**: 420-426.

Manning, B. D. and L. C. Cantley (2007). " AKT/PKB signaling: navigating downstream. ." Cell **129(7)**: 1261-1274.

- Martins, A. S., et al. (2008). "A pivotal role for heat shock protein 90 in Ewing sarcoma resistance to anti-insulin-like growth factor 1 receptor treatment: in vitro and in vivo study." Cancer Res. **68(15)**(6260-70).
- Milani V., et al. (2002). "Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation." International Journal of Hyperthermia **18(6)**: 563-575.
- Milani V., Noessner E., et al. (2002). "Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation." International Journal of Hyperthermia **18(6)**: 563-575.
- Mir, O. et al (2016). "Safety and efficacy of regorafenib in patients with advanced soft tissue sarcoma (REGOSARC): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial." Lancet Oncol., **17**: 1732-1742
- Modi, S. et al (2011). „ HSP90 Inhibition Is Effective in Breast Cancer: A Phase II Trial of Tanespimycin (17-AAG) Plus Trastuzumab in Patients with HER2-Positive Metastatic Breast Cancer Progressing on Trastuzumab.“ Clinical Cancer Research, 4919
- Multhoff G (2006). "Heat shock proteins in immunity." Hanb Exp Pharmacology (**172**): 279-304.
- Nam, S., et al. (2017). "Tumor Suppression Efficacy of Heat Shock Protein 90 Inhibitor 17A-AG in a Liposarcoma Mouse Model." Anticancer Res. **37(11)**: 6291-6302.
- Nayar, U., P. Lu, et al. (2013). "Targeting the Hsp 90-associated viral oncoproteome in gammaherpesvirus-associated malignancies." Blood [Epub ahead of print].
- Neckers, L. and K. Neckers (2002). "Heat-shock protein 90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents." Expert Opin Emerg Drugs **7(2)**: 277-288.
- Nishiwaki, H., et al. (2018). "Molecular hydrogen upregulates heat shock response and collagen biosynthesis, and downregulates cell cycles - Meta-analyses of gene expression profiles." Free Radic Res [Epub ahead of print].
- Pedersen, K. S., et al. (2015). "Phase II Trial of Gemcitabine and Tanespimycin (17-AAG) in Metastatic Pancreatic Cancer: A Mayo Clinic Phase II Consortium Study." Invest New Drugs **33(4)**: 963-968.
- Pick, E., Y. Kluger et al. (2007) "High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer." Cancer Res. **67(7)**:2932-7.
- Pollak, M. (2008). "Targeting insulin and insulin-like growth factor signalling in oncology." Curr.Opin.Pharmacol. **8**: 384-392.
- Powell, S. N. and L. A. Kachnic (2011). "Homologous recombination research is heating up and ready for therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **108(24)**: 9731-9732.
- Powers, M. V., et al. (2013). "Mode of cell death induced by the HSP 90 inhibitor 17-AAG (tanespimycin) is dependent on the expression of pro-apoptotic BAX." Oncotarget. **4(11)**(1963-75).
- Prodromou, C. and L. Pearl (2003). "Strukture and functional relationships of HSP 90." Curr Cancer Drug Targets **3(5)**: 301-323.

- Rabindran, S. K., G. Giorgi, et al. (1991). "Molecular cloning and expression of a human heat shock factor, HSF1." Proc Natl Acad Sci **88**: 6906-6910.
- Retzlaff, M. (2009). Regulation von HSP 90 und seinem Substrat p53. Chemie. München, Technische Universität: 186.
- Richter, K., S. Moser, et al. (2006). "Intrinsic inhibition of the HSP 90 ATPase activity." J Biol Chem **281**: 11301-11311.
- Richter, K., P. Mutschler, et al. (2001). "Coordinated ATP hydrolysis by the HSP 90 dimer." J. Biol. Chem **276**: 33689-33696.
- Rietbroek, R. C., M. S. Schilthuis, et al. (1997). "Phase II trial of weekly locoregional hyperthermia and cisplatin in patients with a previously irradiated recurrent carcinoma of the uterine cervix." Cancer. **79(5)**: 935-943.
- Rodina, A., M. Vilenchik, et al. (2007). "Selective compounds define Hsp 90 as a major inhibitor of apoptosis in small-cell lung cancer." Nature chemical biology **Aug;3(8)**: 98-5047.
- Roe, S. M., M. M. Ali, et al. (2004). "The Mechanism of Hsp 90 regulation by the protein kinase-specific cochaperone p50(cdc37)." Cell **116**: 87-98.
- Roe, S. M., C. Prodromou, et al. (1999). "Structural basis for inhibition of the Hsp 90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin." J. Med. Chem **42**: 260-266.
- Romanowski, R., C. Schött, et al. (1993). "Regional hyperthermia with systemic chemotherapy in children and adolescents: feasibility and clinical follow-up of 34 intensively pretreated patients with prognostically unfavorable tumor diseases." Klin Padiatr. **205(4)**: 249-256.
- Samuni, Y., et al. (2010). "Reactive oxygen species mediate hepatotoxicity induced by the Hsp 90 inhibiting anti-cancer geldanamycin and its analogs." Free Radic Biol Med **48(11)**(1559–1563).
- Santarpia, L., et al. (2012). "Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. ." Expert Opinion on Therapeutic Targets **16(1)**: 103–119.
- Saif, M. W., C. Erlichman, et al. (2013). "Open-label, dose-escalation, safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of intravenously administered CNF1010 (17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin [17-AAG]) in patients with solid tumors." Cancer Chemother Pharmacol **71(5)**: 1345-1355.
- Sato, S., N. Fujita, et al. (2000). "Modulation of AKT kinase activity by binding to HSP 90." Proc Natl Acad Sci **97**: 10832-10837.
- Sausville E.A., Tomaszewski J.E., et al. (2003). "Clinical Development of 17-Allylamino, 17-Demethoxygeldanamycin." Current Cancer Drug Targets **3 (5)**: 377-383(377).
- Scaltriti, M. and J. Baselga (2006). "The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy." clin cancer res **12**: 5268-5272.
- Scharf KD., Siddique M., et al. (2001). "The expanding family of Arabidopsis thaliana small heat stress proteins and a new family of proteins containing alpha-crystallin domains." Cell Stress Chaperones **6(3)**: 225-237.

- Schröterová, L., Králová, V. et al (2009). "Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: comparison of different cytotoxicity assays." Toxicol Vitro. **23(7)**: 1406–1411.
- Scroggins, B. T., K. Robzyk, et al. (2007). "An acetylation site in the middle domain of HSP 90 regulates chaperone function." Mol. Cell **25**: 151-159.
- Schmitz, S. (2009). "Der Experimentator: Zellkultur." **XIV**: 289.
- Sharp S. Y., Boxall K., et al. (2007). "In vitro Biological Characterization of a Novel, Synthetic Diaryl Pyrrole Resorcinol Class of Heat Shock Protein 90 Inhibitors." Cancer Res. **67**: 2206-2216.
- Sommer, E. (2010). "Auswirkungen ionisierender Strahlung auf mesenchymale Stammzellen".
- Speranza, G., et al. (2017). "First-in-human study of the epichaperome inhibitor PU-H71: clinical results and metabolic profile." Invest New Drugs.
- Slavotinek A., McMillan TJ., et al. (1994). "Measurement of radiation survival using the MTT assay." European Journal of Cancer **30A(9)**: 1376-1382.
- Solit, D. and G. Chiosis (2008). "Development and application of Hsp 90 inhibitors." Drug Discov Today **13(1-2)**: 38-43.
- Tang, D., et al. (2005). "Expression of heat shock proteins and heat shock protein messenger ribonucleic acid in human prostate carcinoma in vitro and in tumors in vivo." Cell Stress Chaperones. **10(1)**(46–58).
- Taldone, T., A. Gozman, et al. (2008). "Targeting Hsp 90: small-molecule inhibitors and their clinical development." Curr.Opin.Pharmacol. **8**: 370-374.
- Taldone, T., A. Rodina, et al. (2013). "Synthesis and evaluation of cell-permeable biotinylated PU-H71 derivatives as tumor Hsp 90 probes." Beilstein J Org Chem **9**: 544-556.
- Taldone, T., W. Sun, et al. (2009). "Discovery and development of heat shock protein 90 inhibitors." Bioorg Med Chem **17(6)**: 2225-2235.
- Tap, W.D. et al (2016). "Olaratumab and doxorubicin versus doxorubicin alone for treatment of soft-tissue sarcoma: an open-label phase 1b and randomised phase 2 trial." Lancet **388**: 488-497
- Toraya-Brown, S. and Fiering, S. (2014). "Local tumour hyperthermia as immunotherapy for metastatic cancer." International Journal of Hyperthermia, **30(8)**: 531-539.
- Trcka, F., M. Durech, et al. (2014). "The assembly and intermolecular properties of the Hsp 70-Tomm34-Hsp 90 molecular chaperone complex." J Biol Chem [Epub ahead of print].
- Trojani M, Contesso G, Coindre JM, et al. (1984). "Soft tissue sarcomas of adults: study of pathological prognostic variables and definition of histopathological grading system." Int J Cancer; **33**:37–42
- Ungermann C., Neupert W., et al. (1994). "The role of Hsp 70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria." Science **266 (5188)**: 1250-1253.

- Uozaki, H., Ishida, T., et al. (2000). „Expression of heat shock proteins in osteosarcoma and its relationship to prognosis.“ Pathol Res Pract.; **196(10)**: 665-73.
- an der Graaf, W.T., Blay, J.Y., Chawla S. et al. (2012) “Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebocontrolled phase 3 trial.” Lancet **379**: 1879–1886.
- van Kampen, M., M. J. Eble, et al. (2001). "Correlation of intraoperatively irradiated volume and fibrosis in patients with soft-tissue sarcoma of the extremities." Int J Radiat Oncol Biol Phys **51(1)**: 94-99.
- Verwaal, V. J., S. van Ruth, et al. (2003). "Randomized trial of cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer." J Clin Oncol. **21(20)**: 3737-3743.
- Walter S. and B. J. (2002). "Molecular chaperones--cellular machines for protein folding." Angewandte Chemie (Internationale Ed English) **41(7)**: 1098-1113.
- Wandinger, S., K. Richter, et al. (2008). "The HSP chaperone machinery." J Biol Chem **283**: 18473-18477.
- Wandinger, S., M. H. Suhre, et al. (2006). "The phosphate Pptl is a dedicated regulator of the molecular chaperone Hsp 90." EMBO J. **25**: 367-376.
- Wan, X. and L. J. Helman (2007). "The biology behind mTOR inhibition in sarcoma." Oncologist **12(8)**: 1007-1018
- Wang, J., Cui, S. et al. (2013). „High Expression of Heat Shock Protein 90 Is Associated with Tumor Aggressiveness and Poor Prognosis in Patients with Advanced Gastric Cancer.“ PLoS ONE **8(4)**: e62876.
- Wasserman M. (1993). "Mycoplasma contamination in cell culture." American biotechnology laboratory **11(1)**: 10-12.
- Wessalowski, R., Schneider, D.T. et al. (2013). “Regional deep hyperthermia for salvage treatment of children and adolescents with refractory or recurrent non-testicular malignant germ-cell tumours: an open-label, non-randomised, single-institution, phase 2 study.”, Lancet Oncol. **14(9)**: 843-52.
- Westra A, Dewey WC. (1971) “Variation in sensitivity to heat shock during the cell-cycle of Chinese hamster cells in vitro.” Int Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med **19**: 467–77.
- Whitesell, L. and S. L. Lindquist (2005). "HSP 90 and the chaperoning of cancer." Nat.Rev.Cancer **5**: 761-772.
- Wickner, S., M. Maurizi, et al. (1999). "Posttranslational quality control: folding, refolding and degrading Proteins." Science **286**: 1888-1893.
- Willot;, Q., et al. (2017). "Proteome stability, heat hardening and heat-shock protein expression profiles in Cataglyphis desert ants." J Exp Biol. **220(Pt 9)** (1721-1728).
- Workman, P., F. Burrows, et al. (2007). "Drugging the cancer chaperone HSP 90: Combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress." Ann. N. Y. Acad. Sci.

Wolf, P. (2008). „Neue Wege in der Krebstherapie.“ **S. 34f.**

Wust, P., Hegewisch-Becker, S., Issels, R. (2003). „Hyperthermie - aktueller Stand und therapeutische Ergebnisse“ Dtsch med Wochenschr **128(39)**: 2023-2029

Yap, T. A., M. D. Garrett, et al. (2008). "Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises." Curr.Opin.Pharmacol. **8**: 393-412.

Zaarur, N., V. L. Gabai, et al. (2006). "Targeting Heat Shock Response to sensitize Cancer Cells to Proteasome an HSP 90 Inhibitors." Cancer Res.: 05-3692.

Zahm, S. H. and F. J. F. Jr. (1997). "The epidemiology of soft tissue sarcoma." Semin Oncol. **24(5)**: 504-514.

Zhu H., Guo FJ., et al. (2012). "ATF4 and IRE1 $\alpha$  inhibit DNA repair protein DNA-dependent protein kinase 1 induced by heat shock." Molecular and Cellular Biochemistry.

Zimmermann, S. and K. Moelling (1999). "Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). ." Science **286(5445)**: 1741-1744.



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Promotionsbüro  
Medizinische Fakultät



## Eidesstattliche Versicherung

**Coto Rodas, Sigrid**

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel  
**Untersuchung der Kombination von HSP 90 Inhibition mit Hyperthermie an Sarkomzellen in vitro.**

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

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

**Ulm, den 01.11.2021**

Ort, Datum

**Sigrid Coto Rodas**

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Eidesstattliche Versicherung

März 2020