

**Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**  
**Zentrum für Kinderheilkunde**  
**Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie**  
**Direktor: Prof. Dr. med. U. Göbel**

**Einflüsse von Hyperthermie in Kombination mit Chemotherapie und dem  
Bioflavonoid Quercetin auf die Zellüberlebensraten und die  
Hitzeschockprotein-Expression der humanen Ewingsarkom-Zelllinien  
SK-ES-1 und RD-ES**

**Zellkinetikkmessungen mit dem XTT-Essay und Nachweis der Proteinexpression mittels  
Western-Blot-Analyse**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**vorgelegt von**

**Matthias Oerding**

**2005**

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

Gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab, Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. R. Wessalowski

Korreferent: Prof. Dr. N. Gattermann

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	5
<b>2. Grundlagen</b>	
2.1. Hitzeschockproteine	
2.1.1. Vorkommen und Funktion	7
2.1.2. Einteilung der Hitzeschockproteine	8
2.1.3. Hitzeschockprotein 70	10
2.1.4. Die „Small Stress Proteine“	10
2.1.5. Hitzeschockproteine und die Thermotoleranz	11
2.2. Das Flavonoid Quercetin	13
2.2.1. Struktur der Flavonoide	14
2.2.2. Funktionen der Flavonoide	15
2.2.3. Wirkmechanismen der Flavonoide	16
2.2.4. Pharmakokinetik des Quercetins	17
2.2.5. Dosierung des Quercetin	19
2.3. Zytostatika	
2.3.1. Cisplatin	19
2.3.2. Etoposid	21
2.4. Das Ewing-Sarkom	
2.4.1. Ätiologie des Ewing-Sarkoms	22
2.4.2. Molekulargenetik des Ewing-Sarkoms	23
2.4.3. Pathologie des Ewing-Sarkom	23
2.4.4. Therapie des Ewing-Sarkoms	24
2.5. Hyperthermie in der Tumorthherapie	25
<b>3. Material und Methoden</b>	
3.1. Geräte	27
3.2. Labormaterial	27
3.3. Reagenzien	28
3.4. Ewingsarkomzelllinien	
3.4.1. Die Ewingsarkomzelllinie SK-ES-1	29

3.4.2.	Die Ewingsarkomzelllinie RD-ES.....	30
3.5.	Kultivierung der Ewingsarkomzelllinien	
3.5.1.	Nährlösung.....	30
3.5.2.	Kollagenbeschichtung.....	30
3.5.3.	Subkultivierung der Zellen.....	31
3.5.4.	Kryokonservierung der Ewingsarkomzelllinien SK-ES-1 und RD-ES.....	31
3.5.5.	Auftauen der Ewingsarkomzelllinien SK-ES-1 und RD-ES.....	32
3.6.	XTT-Test.....	32
3.6.1.	Quercetinbehandlung ± Hyperthermie von den Ewingsarkom-Zelllinien SK-ES-1 und RD-ES.....	33
3.6.2.	Thermochemotherapie Einflüsse von Etoposid und Cisplatin ± Hyperthermie auf die Ewingsarkom- zelllinien SK-ES-1 und RD-ES.....	35
3.6.3.	XTT-Auswertung.....	36
3.7.	Probenaufarbeitung und Proteinbestimmung	
3.7.1.	Probenherstellung zur kinetische Untersuchung der intrazellulären Expression von Hitzeschockproteinen durch den Einfluss von Hyperthermie an der Ewingsarkomzelllinie SK-ES-1.....	37
3.7.2.	Probenaufarbeitung zur Untersuchung der Hitzeschockprotein- Expression durch den Einfluss von Hyperthermie in Kombination mit Zytostatika und Quercetin an der Ewingsarkomzelllinie SK-ES-1.....	37
3.7.3.	Proteinbestimmung nach Bradford.....	38
3.8.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970)	
3.8.1.	Prinzip der SDS-PAGE.....	38
3.8.2.	Durchführung der SDS-PAGE.....	39
3.9.	Western-Blot	
3.9.1.	Vorbereitung des Western-Blots.....	41
3.9.2.	Durchführung des Western-Blots.....	42
3.9.3.	Standardisierung des Western-Blots zur Bestimmung von intrazellulären HSP-70 und HSP-27-Konzentrationen.....	43

## 4. Ergebnisse

4.1.	Zellkinetische Untersuchung an den Tumorzelllinien SK-ES-1 und RD-ES zur intrazellulären Expression der Hitzeschockproteine HSP-70 und HSP-27.....	45
------	---	----

4.2.	Einfluss verschiedener Hyperthermiebedingungen auf die Ewingsarkomzelllinien SK-ES-1 und RD-ES.....	47
4.3.	Einfluss der Zytostatika Etoposid (Vepesid®) und Cisplatin (Platinex®) auf das Wachstum der Zelllinie SK-ES-1 und RD-ES in Kombination mit Hyperthermie.....	50
4.4.	Western-Blot-Analyse zur intrazellulären Expression der Hitzeschockproteine HSP-27 und HSP-70 nach Einwirkung von Etoposid (Vepesid®) und Cisplatin (Platinex®) bei verschiedenen Hyperthermiebedingungen	
4.4.1.	HSP-27 und HSP-70-Expression für die Zelllinie SK-ES-1.....	52
4.4.2.	HSP-70-Expression für die Zelllinie RD-ES.....	54
4.5.	Einfluss des Flavonoids Quercetin auf das Wachstum der Tumorzelllinien SK- ES-1 und RD-ES unter verschiedenen Hyperthermiebedingungen	
4.5.1.	Messung der Zellüberlebensraten im XTT-Assay.....	55
4.5.2.	Einfluss von Etoposid (Vepesid®) und Cisplatin (Platinex®) in Kombination mit Quercetin auf das Wachstum der Tumorzelllinie SK- ES-1 unter verschiedenen Hyperthermiebedingungen.....	59
4.5.3.	Western-Blot-Analyse der intrazellulären Hitzeschockproteinexpression von HSP-27 und HSP-70 nach Einwirkung von Quercetin, Etoposid und Cisplatin unter verschiedenen Hyperthermiebedingungen.....	64
<b>5. Diskussion.....</b>		<b>69</b>
<b>6. Zusammenfassung.....</b>		<b>81</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>		<b>82</b>
<b>Lebenslauf.....</b>		<b>93</b>

## 1. Einleitung

In den letzten Jahren versucht die Forschung im Bereich der pädiatrischen Onkologie ihre Therapiekonzepte zunehmend durch multimodale Strategien zu verbessern. Laut deutschem Kinderkrebsregister, Jahresbericht 2004, ist der Behandlungserfolg der gemeldeten Tumorerkrankungen von 67 % auf 76 % gestiegen. Dies ist nicht zuletzt Folge einer intensiven Forschung im Bereich der adjuvanten Therapieoptionen. Neben der Chemotherapie, der Strahlentherapie und der operativen Interventionsmöglichkeit bietet sich die Hyperthermie als vielversprechende Kombination an. Neu ist dieser Weg in der Tumorbekämpfung keineswegs, wurden doch schon im Altertum glühende Eisen durch z. B. Hippokrates, Celsus und Galenus eingesetzt, um oberflächliche Geschwüre zu behandeln. Jedoch kann erst durch die moderne Medizin die Wirkungsweise an malignen Tumoren erforscht werden.

Ein nicht zu unterschätzender Ansatzpunkt ist die Entstehung einer Thermotoleranz in hyperthermiebehandelten Zellen. Es hat sich gezeigt, dass eine redundante Applikation von moderater Wärme ( 42 °C bis 44 °C) die betroffenen Zellen gegenüber Hitzestress resistenter machen kann. Als Grundlage hierfür wurden sogenannte Hitzeschockproteine beschrieben. Deren Entstehung liegt ein komplexer Mechanismus zugrunde, sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Zellen, der in der Expression der Hitzeschockproteine gipfelt.

Seitdem die Hyperthermiebehandlung als Ergänzung zur Chemo- und Radiotherapie in der Behandlung maligner Tumoren wiederentdeckt wurde (1, 2, 3, 4, 5, 6), wird in der Forschung verstärkt nach Verbesserungen dieser adjuvanten Therapiemethode gesucht. Einerseits gilt das genaue Verständnis der Entstehung und der Funktion von Hitzeschockproteinen als maßgeblich für die Wirksamkeit von Hyperthermie in Kombination mit der Chemotherapie, andererseits wird vor allem nach Stoffen geforscht, welche dieser natürlichen Antwort der Tumorzelle bei Hyperthermie, der Bildung von Stressproteinen, entgegenwirken (7, 8, 9) und dadurch die Induktion von Apoptose fördern. Solche Stoffe werden auch „Sensitizer“ genannt (10). Eine der am ausführlichsten untersuchten Stoffklassen stellen dabei die Flavonoide mit den Untergruppen der Flavonole (Quercetin, Kämpferol, etc.), der Flavone (Rutin) und der Isoflavonoide (Genistein) dar. Hosokawa *et al.* (1990) und Kantengwa et Polla (1991) konnten für das Quercetin eine Downregulation der HSP-70-Expression nachweisen (7, 8). Interessant ist die Frage, wie der menschliche Organismus diese „Sensitizer“ inkorporieren kann und welche Mengen notwendig sind, um einen Effekt in der Hyperthermiebehandlung zu erzielen.

Um nun herauszufinden, ob die stressbedingte Expression der Hitzeschockproteine, in diesem Fall HSP-27 und HSP-72, die Wirksamkeit von Chemotherapie unterstützt oder vermindert, ist an zwei unterschiedlichen humanen Ewingsarkom-Zelllinien in einem *in vitro* Modell für pädiatrische Tumoren eine Chemotherapie mit Cisplatin und Etoposid nach thermischen Stress untersucht worden. Weiterhin hat sich die Frage gestellt, ob sich bei diesen typischerweise im Kindes- und Jugendalter vorkommendem Knochentumor eine hyperthermiebedingte Resistenzentwicklung, die im Zusammenhang mit der HSP-Konzentration der Tumorzellen steht, durch klinisch verträgliche Konzentrationen des Bioflavonoids Quercetin unterdrücken lässt. Da die in der Literatur gemachten Angaben über die geprüften Konzentrationsbereiche des Quercetins sehr unterschiedlich sind und zudem die enterale Resorption nach oraler Applikation sehr ungünstig ist, kommt dieser Fragestellung aus der Sicht der behandelnden Mediziner besondere Bedeutung zu.

## **2. Grundlagen**

### **2.1. Hitzeschockproteine**

#### **2.1.1. Vorkommen und Funktion**

Die Charakterisierung der Hitzeschockproteine (HSPs) und ihre genauen Funktionen sind heutzutage Schwerpunkte in der molekularbiologischen Forschung. Sie stellen eine der am meisten konservierten Proteingruppen in der Evolution dar. Bis heute sind in allen untersuchten Organismen derartige Proteine gefunden worden, sowohl in Prokaryonten, Hefen und Pflanzen, als auch in Eukaryonten. Ihren Namen haben die Hitzeschockproteine durch ihre Entdeckung als Reaktion der Zelle auf Hitzeeinwirkung (26). Aber nicht nur der Hitzeschock, sondern auch andere Umwelteinflüsse oder Stresssituationen führen zu einer erhöhten Produktion dieser Proteine. Die Bandbreite reicht von Salzen und Schwermetallen über Säuren und Laugen bis hin zu Sauerstoffmangel (27). Der hohe Grad der Konservierung dieser Proteine durch die Evolution verschiedener Spezies, gekoppelt mit ihrer wichtigen Rolle im Zellüberleben auf unterschiedliche Art und Weise, deutet darauf hin, dass HSPs nicht nur das Überleben der Zelle in Stresssituationen sichert, sondern dass sie darüber hinaus auch unter Normalbedingungen wichtige Funktionen in der Zelle ausüben, abhängig vom Zellzyklus (28, 29). In diesem Zusammenhang ist der Begriff „Chaperones“ geprägt worden. Ins Deutsche übersetzt bedeutet dies „Aufsichts-/Begleitperson“. Chaperone übernehmen sowohl im Zytoplasma, als auch in anderen Zellorganellen wie Mitochondrien eine gewisse Führung von ungefalteten Polypeptiden. Sie sorgen für eine korrekte Entfaltung und Neufaltung z. B. beim Transport in Mitochondrien. Dabei gehen die Chaperone keine kovalente Bindung ein und verlassen das Protein nach dessen Fertigstellung.

Lindquist et Craig haben 1988 beschrieben, dass HSPs nachweislich an der Proteinbindung, an der Faltung, der Translokation und der Verhinderung unpassender Proteinaggregationen beteiligt sind, egal ob unter normalen Bedingungen oder in Reaktion auf Stress (26). Einige dieser Funktionen legen den Verdacht nahe, dass die HSPs eine bedeutende Rolle in der Entstehung von tumorösen Prozessen spielen. Srivasta et Heike haben 1991 vermutet, dass die HSPs entweder als sogenannte „Tumorantigene“ wirken können, oder zumindest als Carrier für die Antigenpräsentation (27). Es zeigt sich in weiteren Arbeiten, dass das HSP-Level in vielen Tumoren deutlich erhöht ist. Die Präsenz der HSPs auf der Zelloberfläche von Tumoren eröffnet neue Möglichkeiten zur Diagnostik und Therapie.



Außerdem hat sich gezeigt, dass Effekte wie die Thermotoleranz der Zellen oder die Multi-Drug-Resistenz wohl auf den Einfluss der HSPs zurückzuführen sind. Diese Erkenntnisse machen die Hitzeschockproteine bis heute zu einem vieluntersuchten Objekt in der onkologischen Forschung, insbesondere in der Hyperthermiebehandlung.

K.J. Fuller *et al.* stellen die Zusammenhänge der HSPs mit Zellwachstum, Zellschutz und Zelltod in einem vereinfachten Schema in Abbildung 2.1. dar. Die Beteiligung einiger HSPs an der Entstehung oder dem Schutz von Krebszellen ist ebenfalls aufgegriffen worden. Die Veranschaulichung der Komplexität zeigt deutlich den herausragenden Stellenwert dieser Proteine.

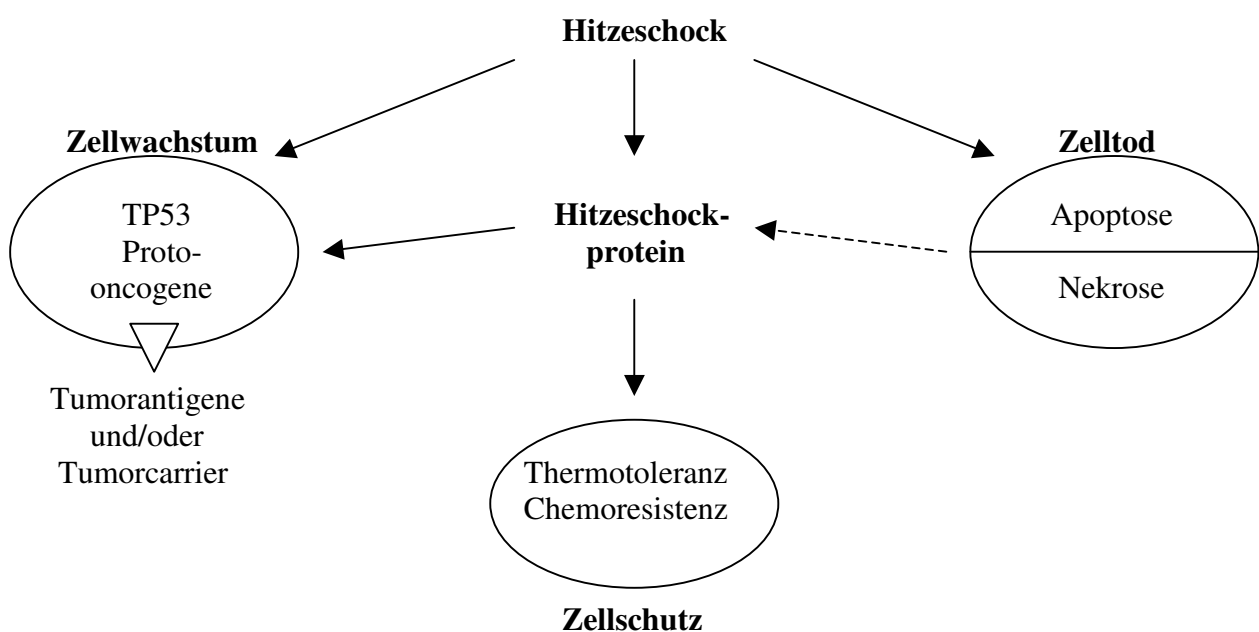


Abb. 2.1.: Hitzeschock, HSPs und der Einfluss auf Karzinome und deren Therapie (27)

### 2.1.2. Einteilung der Hitzeschockproteine

Die HSPs sind ausführlich hinsichtlich ihrer Zelllokalisierung, -regulation und -funktion untersucht worden. Ihr Vorkommen in Prokaryonten und in Eukaryonten sowie ihre konservierte Struktur und Funktion deutet auf den Einfluss in wichtigen zellulären Vorgängen hin.

Ritossa entdeckte 1962 HSPs in Larven von *Drosophila melanogaster*, die einer erhöhten Temperatur ausgesetzt waren (30). Weiterführende Studien beschreiben mehrere

Untergruppen dieses Proteins mit einem Molekulargewicht von 70 kDa. Die Klassifizierung der HSPs in unterschiedliche Familien erfolgte aufgrund ihres Molekulargewichtes nach Auftrennung in der SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE). Sie bewegen sich im Bereich von 15 bis 115 kDa. Innerhalb der letzten 30 Jahre sind viele weitere Gruppen entdeckt worden, die den Hitzeschockproteinen zugeordnet werden konnten (31). Jede HSP-Familie umfasst mehrere Untergruppen, die zwar das entsprechende Molekulargewicht haben, aber verschiedene Muster der Induktion und Expression. Zu den meistuntersuchten und am besten verstandenen HSPs in Säugetierzellen gehören diejenigen mit dem Molekulargewicht von 27, 60, 70, 90 und 110 kDa. Sie sind in verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert und üben dort unterschiedliche Funktionen aus. Die bisherigen Erkenntnisse über ihr hauptsächliches Vorkommen in der Zelle und die vorrangigen Funktionen sind in Tabelle 2.1. zusammengestellt. Die wichtigsten HSPs finden sich im Cytosol, in den Mitochondrien, dem Endoplasmatischen Retikulum und im Nucleus.

Tab. 2.1.: Zellorte und vorrangige Funktionen der Hitzeschockproteine

<b>HSP-Familie</b>	<b>Zellokalisierung</b>	<b>Vorrangige Funktion</b>
<b>HSP 27 (sHSP)</b>	Cytosol, Nucleus	Stabilisierung der Mikrofilamente, antiapoptotisch
<b>HSP 60</b>	Mitochondrien	Neufaltung von Proteinen, Verhinderung der Aggregation denaturierter Proteine, proapoptotisch
<b>HSP 70-Familie:</b>		Antiapoptotisch
<b>HSP 72 (Hsp70)</b>	Cytosol, Nucleus	Proteinfaltung, Zytoprotektion
<b>HSP 73 (Hsc70)</b>	Cytosol, Nucleus	Molekulare Chaperones
<b>HSP 75 (mHSP70)</b>	Mitochondrien	Molekulare Chaperones
<b>HSP 78 (GRP78)</b>	ER	Zytoprotektion, Molekulare Chaperones
<b>HSP 90</b>	Cytosol, ER, Nucleus	Regulation des Steroidhormonrezeptors, Proteintranslokation
<b>HSP 110/104</b>	Cytosol	Proteinfaltung

Die Regulation der Hitzeschockprotein-Expression findet über die Hitzeschock-Gene statt. Diese HS-Gene wurden überall im Chromosomen-Pool gefunden, als erstes von Hunt *et al.* und Gallagher *et al.* 1993 am Beispiel der HSP-70-Gene in Mäusen und Rindern. Die Expression aller HS-Gene wird demzufolge über spezifische Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren (HSF-1 und HSF-2) vermittelt, die sich bis zur Induktion als inaktive Monomere im Zytoplasma befinden. Bei Aktivierung durch Hitze oder einen anderen Stressfaktor verlagert sich der HSF-1 wieder zum Nukleus, wo er an eine spezifische Bindungsstelle andockt, dem Hitzeschock-Element (HS-Element). Diese Bindungsstelle mit der Sequenz GAA-TTC wurde in allen HS-Genen und verwandten Genen gefunden (Sarge *et al.*, 1993). Der HSF-2, welcher nicht durch Hitze aktiviert wird, jedoch durch mehrere andere Stressoren, verfolgt denselben Mechanismus wie HSF-1, allerdings haben die beiden Transkriptionsfaktoren eine unterschiedliche Bindungsaffinität (27).

### **2.1.3. Hitzeschockprotein 70**

HSP-70 ist in jeder Zelle vorhanden, reagiert sehr sensibel auf Temperaturerhöhung oder andere Stressformen und lässt sich in relativ großen Mengen konservieren. Es ist ein ATP-bindendes Protein und zeigt eine 60 - 80%ige Homologie zwischen prokaryontischen und eukaryontischen Zellen. Die HSP-70-Proteinfamilie umfasst wenigstens vier HSPs, die von Autoren unter verschiedenen Akronymen verwendet werden. Am gebräuchlichsten ist die Einteilung in Hsp-70, Hsc-70, mHSP-70 und GRP-70. Diese sind zwar größtenteils aus analogen Proteinsequenzen aufgebaut, werden aber auf unterschiedliche Stimuli synthetisiert. So wird zum Beispiel Hsc-70 konstitutiv produziert, deshalb auch „c“ für „constitutive“. Dagegen ist das 72-kDa-Protein, Hsp-70, durch Stress induzierbar und seine Synthese nimmt als Antwort auf mehrere Stressfaktoren zu. Bisher wurden für die HSP-70-Familie eine Vielzahl von auslösenden Faktoren beschrieben: Neben der Hyperthermie waren dies Hypothermie, Hypoxie/Hyperoxie, Kernenergie, saures Milieu, Infrarotstrahlung, Virusinfektionen, Sauerstoff- und Stickstoffradikale (31, 37, 38).

### **2.1.4. Die „Small Stress Proteine“**

Die HSPs mit niedrigem Molekulargewicht werden auch als sHSPs bezeichnet, *engl.* für small stress proteins, und zeigen eine Gewebe-abhängige Expression. Diese sHSP wurden unter

anderem von Jakob *et al.* 1993 charakterisiert (33). Sie zeigten *in vitro* eine ATP-unabhängige Chaperone-Aktivität. Die Familie der sHSP umfasst eine große Zahl von ähnlichen Protein-Spezies. Dazu gehören auch Phosphoproteine wie  $\alpha$ A-Krystallin und  $\alpha$ B-Krystallin (32). HSP-32, HSP-27, HSP-20 sind die bekanntesten sHSP. Sie steigern die Überlebensrate von Zellen, welche oxidativem Stress ausgesetzt sind, ein Phänomen, das mit der Fähigkeit zusammenhängt, freie intrazelluläre Sauerstoffradikale auf dem Glutathion-Weg abzubauen. Des Weiteren aktivieren auch die sHSP den Widerstand der Zelle gegen den programmierten Zelltod, die Apoptose (27). Aber nicht nur der Zellschutz gegenüber Stressfaktoren gehört zu den Aufgaben der sHSP, sondern auch essentielle physiologische Prozesse in der unbelasteten Zelle. So wurde zum Beispiel ihre Expression während der Zellteilung und Zelldifferenzierung beschrieben (Arrigo *et al.* 1991, de Jong *et al.* 1993) und darüber hinaus eine Korrelation zum onkogenen Status der Zelle erwähnt (Têtu *et al.* 1992).

Eine biochemische Eigenschaft, welche die sHSP mit  $\alpha$ -Krystallin teilen, ist die Fähigkeit dieser Proteine, große Oligomere zu bilden, 200 bis 800 kDa. Dies ist ein dynamischer Prozess, der zum einen von der Physiologie der Zelle abhängt, die einem Stress ausgesetzt ist, und zum anderen vermutlich vom Phosphorylierungsgrad dieser Proteine (32).

### **2.1.5. Hitzeschockproteine und die Thermotoleranz**

Eine der ersten physiologischen Funktionen von HSP-70 die beschrieben wurden, war die Akkumulation vom induzierbaren Hsp-70 als Reaktion auf Hitzestress. Henle/Leeper (1976) und Gerner/Schneider (1975) zeigten zuerst, dass Säugetierzellen, die einem nicht-tödlichen Hitzeschock ausgesetzt wurden, die Fähigkeit besaßen, eine vorübergehende Resistenz gegenüber einer späteren Hitzeeinwirkung aufzubauen. Diese Form des Zellschutzes wurde Thermotoleranz genannt. *In vitro* kann Thermotoleranz durch kurze Hitzeschocks  $> 43\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Zellen, die bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert sind, induziert werden. Bereits 1973 hatten Palzer und Heidelberger demonstriert, wie eine kontinuierliche Temperaturerhöhung  $< 43\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Zellen eine Thermotoleranz auslösen kann. 1982 brachten unabhängig voneinander Landry *et al.*, Li *et al.* und Subjeck *et al.* den Beweis, dass die Hitzeschockproteine diesen Vorgang entscheidend beeinflussen (40).

Das Phänomen der erworbenen Thermotoleranz ist in der Natur reversibel und hängt in erster Linie von der Schwere der initialen Hitzedosis ab. Üblicherweise gilt, je größer die initiale Hitzedosis, um so größer das Ausmaß und die Dauer der resistenten Phase. Die Entwicklung

von Thermotoleranz als Folge von Hitzeschock wird innerhalb mehrerer Stunden entstehen und dauert in der Regel drei bis fünf Tage an.

Zusätzliche stützende Hinweise liefern Beobachtungen, welche die Kinetik der Thermotoleranz-Induktion und ihrer Auflösung in Zusammenhang mit parallelen Entwicklungen während der HSP-70-Expression und ihrer Abnahme bringen (40).

Die ähnlichen Kinetiken der Thermotoleranz von Zellen, Geweben und ganzen Organismen legen nahe, dass die Morbidität und die Mortalität durch Ganzkörperhitze eher von der Dysfunktion bestimmter Gewebe im Körper abhängig sind (41, 42, 43, 44). Die Entwicklung der Thermotoleranz ist also das Ergebnis der verbesserten Toleranz des schwächsten Organs oder Gewebes. Dieses Gewebe ist sowohl hitzesensibel als auch lebensnotwendig für den ganzen Organismus. Als Beispiel sei der Dünndarm genannt. Sein Gewebe ist in der Lage Thermotoleranz zu erzeugen, gleichzeitig gilt es als äußerst sensibel für Hitzeeinwirkungen. Auf Temperaturen zwischen 41 und 42 °C *in vivo* reagieren Dünndarmzellen, aber auch der gesamte Körper, bereits sehr sensibel, wohingegen gastrointestinale Störungen erst bei anhaltender Hitze (z.B. 42 °C für mindestens 120 Minuten) vermehrt beobachtet werden. Flanagan *et al.* zeigten, dass der Dünndarm und die Leber die ersten Organe sind, die auf eine Ganzkörperhitze mit akkumulierenden HSP-70-Titern reagieren (45).

Die Fortschritte in der Molekularbiologie gaben den Forschern die Möglichkeit, weiter nach einem direktem, kausalen Zusammenhang zwischen HSP-Induktion und Thermotoleranz zu suchen. Zelluläre Manipulation, entweder durch die Blockierung der HSP-Akkumulation oder deren Amplifizierung, standen im Mittelpunkt dieser Arbeiten (46).

Ein wichtiger Punkt in den Forschungen über die Thermotoleranz der Hitzeschockproteine scheint deren Zusammenhang mit den Schutzfunktionen der Zelle zu sein. Wenn man voraussetzt, dass andere Stressformen wie Licht-induzierte Zerstörungen auf der Retina oder durch Ischämie bedingte Schädigungen des Herzen, der Leber oder der Niere eine gleichartige Expression von HSPs hervorrufen, folgt daraus die Hypothese, dass der Grad der HSP-Expression ein zellulärer Biomarker für das Maß einer Schädigung sein kann. Geht man noch einen Schritt weiter, so bleibt die Frage, ob über eine Steuerung der HSP-Expression, Einfluss auf stressinduzierte Gewebeschäden genommen werden kann (31).

## 2.2. Das Flavonoid Quercetin

Das im Pflanzenreich weit verbreitete Quercetin ist der in quantitativer Hinsicht bedeutendste Vertreter der Flavonoide. Quercetin ist in vielen häufig verzehrten Nahrungsmitteln enthalten, wie z.B. in Äpfeln, Küchenzwiebeln, Tee, Beeren und Kohlgemüse (Tab 2.2), sowie in einer Vielzahl von Pflanzensamen, Nüssen, Blüten, Rinden und Blättern. Die Flavonoide befinden sich überwiegend in den Randschichten der Pflanzen sowie den äußeren Blättern. Äpfel sollten daher nicht geschält werden, Tomaten nicht enthäutet werden. Quercetin ist auch in zahlreichen Arzneipflanzen wie z.B. Ginko biloba, Hypericum perforatum (Johanniskraut), Sambucus canadensis (Holunder) u.v.a. zu finden und hat häufig erheblichen Anteil an der Heilwirkung dieser Pflanzen (47, 48, 49). Bekannt ist auch der hohe Anteil Quercetins in Rotwein. Da die Flavonoidsynthese lichtabhängig ist, wirkt sich auch die Jahreszeit der Ernte auf den Flavonoidgehalt aus. Im August geerntet, enthalten Kopfsalat oder Endivien 3 bis 5-mal mehr Flavonoide als im April. In der Tabelle 2.2 wird das Vorkommen von Quercetin in einigen Lebensmitteln quantifiziert (51).

Tab. 2.2: Gehalt an Flavonolen und Flavonen in ausgewählten Lebensmitteln (mg/kg Frischgewicht)

Lebensmittel	Quercetin	Kämpferol	Myricetin	Luteolin	Apigenin
Äpfel	20-36	-	-	-	-
Grüne Bohnen	39	< 12	-	-	-
Brokkoli	30-37	60-72	-	-	-
Grünkohl	110-120	211-470	-	-	-
Kirschen	10-15	-	-	-	-
Sellerie, Blatt	-	-	-	200	750
Tomaten	2-14	-	-	-	-
Trauben, blau	15-37	-	4,5	-	-
Zwiebeln	340-347	-	-	-	-

„-“ = unterhalb der Nachweisgrenze

### 2.2.1. Struktur der Flavonoide

Phenolischen Pflanzeninhaltsstoffe werden in die Flavonoide und die Phenolcarbonsäuren unterteilt. Den Flavonoiden kommt dabei die größere Bedeutung zu (50).

Tab 2.3: Verbindungsklassen der Flavonoide, Vorkommen und Eigenschaften

Verbindung	Beispiele	Vorkommen	Eigenschaften
Flavonole	Quercetin Kämpferol	Zwiebeln Endivie	hellgelbe Pigmente
Flavanole	Catechin Epicatechingallate	Rotwein, Äpfel Grüner Tee	Adstringierende Wirkung
Flavanone	Naringenin	Grapefruit Orange	Bitterstoffe
Flavone	Apigenin	Sellerie Paprika	hellgelbe Pigmente
Anthocyane	Malvidin Cyanidin	Blaue Trauben Kirschen	Rote und blaue Farbpigmente
Isoflavonoide	Genistein Daidzein	Sojabohnen Sojabohnen	Phytoöstrogene

Die Flavonoide leiten sich vom Flavan (2-Phenyl-benzodihydropyran) ab, die chemische Grundstruktur besteht aus drei Ringen mit angebondenen Hydroxyl(OH)-Gruppen. Sie bestehen grundsätzlich aus 2 aromatischen und einem O-heterozyklischen Ring. Anhand struktureller Unterschiede am C-Ring können die Flavonoide in 6 Gruppen eingeteilt werden (Tab 2.3).

Die große strukturelle Vielfalt – derzeit sind etwa 6500 verschiedene Strukturen bekannt – kommt durch Modifizierung und weitere Substitutionen an den Grundgerüsten zu Stande. In Nahrungsmitteln kommen Flavonoide häufig in Form von Glykosiden vor, d.h. sie besitzen am mittleren Ring C ein Zuckermolekül (Rhamnose, Glukose, Galaktose etc.). Quercetin ist das Aglykon (d.h. die Substanz ohne das jeweilige Zuckermolekül) einer Anzahl weiterer Flavonoide, wie Rutin, Quercitrin, Isoquercitrin und Hyperosid. Diese Substanzen sind strukturell weitgehend identisch mit Quercetin, enthalten aber im Unterschied zu diesem an Stelle einer der Hydroxylgruppen am Ring C ein spezifisches Zuckermolekül, das ihre biochemische Aktivität entscheidend verändert. In Vergleichsstudien zur Wirksamkeit der Flavonoide wurde festgestellt, dass andere Vertreter dieser Substanzgruppe häufig ähnliche Wirkungen aufweisen wie Quercetin, dass Quercetin aber in der Regel am stärksten wirksam ist.

In Abbildung 2.2. ist die chemische Struktur der wichtigsten Flavonole und Flavone dargestellt. Der chemische Name des Quercetins ist 3-3'-4'-5-7-Pentahydroxyflavon.

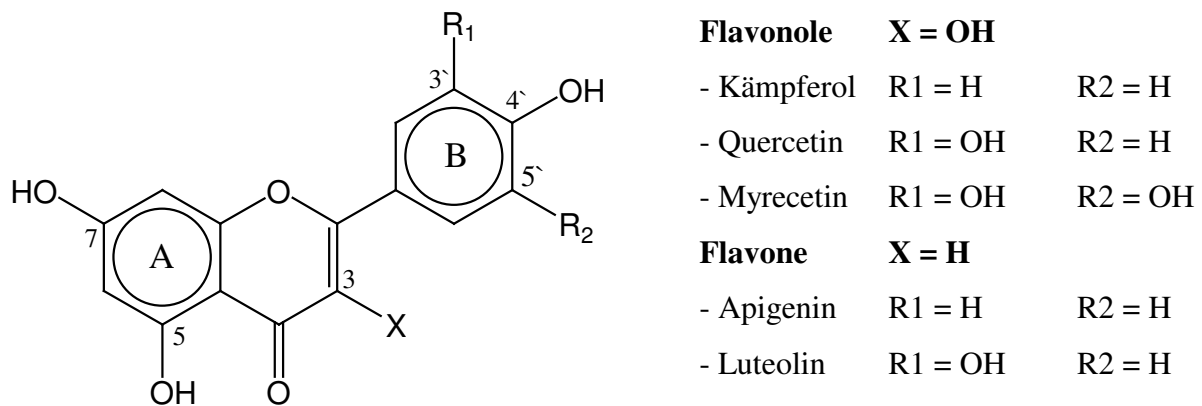


Abb. 2.2.: Grundstruktur der Flavonoide und die wichtigsten Flavonole und Flavone

### 2.2.2. Funktionen der Flavonoide

In experimentellen Studien wurde nachgewiesen, dass Quercetin in vielfältiger Weise auf den menschlichen Organismus wirkt und dort zahlreiche positive Wirkungen auf den Stoffwechsel haben. Es schützt das Herz-Kreislauf-System, wirkt der Bildung von Ulzerationen entgegen, verhindert allergische Reaktionen, beugt der Kataraktentwicklung vor, zeigt antivirale und antiinflammatorische Effekte und wirkt der Entstehung von Karzinomen entgegen (52). Meist sind es jedoch In-vitro-Versuche und Tierexperimente, aus denen physiologische Wirkungen von Flavonoiden abgeleitet werden können. Die Relevanz der In-vitro-Daten ist allerdings unklar, da meist pharmakologische Dosen eingesetzt wurden. Epidemiologische Daten (Zutphen Elderly Study 1985, Seven Country Study) zeigen keinen Einfluss der Flavonoidzufuhr auf das Krebsrisiko. Lediglich beim Bronchialkarzinom konnte eine inverse Korrelation festgestellt werden, vor allem bei der Flavonoidzufuhr über Äpfel. In Tierexperimenten schützten Flavonoide vor Colon- und Mammatumoren, sowie dem Melanom. Allerdings bestanden große Speziesunterschiede. Offenbar hängt die antikanzerogene Wirkung von der chemischen Struktur ab und tritt sowohl in der Initiations- als auch in der Promotionsphase der Kanzerogenese auf.

Die antiallergischen Eigenschaften beruhen möglicherweise auf der stabilisierenden Wirkung von Flavonoiden auf Mastzellen und den antiphlogistischen und antihistaminischen Wirkungen im Darm.

Als wichtigste kardiovaskuläre Effekte von Quercetin sind seine antioxidative und antiinflammatorische Wirkung sowie seine Fähigkeit zur Hemmung der Thrombozyten-



aggregation *ex vivo* zu nennen. In der „Zutphen Elderly Study“ wurden die Flavonoidzufuhr mit der Nahrung und das Risiko einer Erkrankung an koronarer Herzkrankheit (KHK) untersucht. Es zeigte sich eine signifikante inverse Korrelation zwischen KHK-bedingter Mortalität und aufgenommener Flavonoidmenge. Bei denjenigen Probanden, die in dieser fünfjährigen Follow-up-Studie an Männern von 65 bis 84 Jahren das Viertel mit der höchsten Flavonoidzufuhr bildeten, betrug das relative Risiko 0,42 im Vergleich zu dem Viertel mit der geringsten Flavonoidzufuhr. Besondere Beachtung verdient dabei die Tatsache, dass die in dieser Studie am häufigsten verzehrten flavonoidhaltigen Nahrungsmittel (Tee, Zwiebeln, Äpfel) besonders reich an Quercetin sind (53).

Des Weiteren hemmt Quercetin die Bildung entzündungsfördernder Prostaglandine und Leukotriene. Dadurch wird es verstärkt auf seine Effekte bei Entzündungen oder asthmatischen Beschwerden untersucht. Über eine Hemmwirkung auf die Xanthinoxidase kann z. B. die Harnsäurebildung reduziert werden und damit erfolgreich zur Gichttherapie eingesetzt werden (54, 57).

### **2.2.3. Wirkmechanismen der Flavonoide**

Über den Wirkmechanismus der Flavonoide gibt es mehrere Theorien, die teilweise in Studien belegt, aber auch widerlegt wurden. Die Schwierigkeit liegt einerseits im Nachweis der Substanz, da es bisher keine standardisierten Verfahren gibt. Andererseits macht die strukturelle Vielfalt der Flavonoide und die Variation ihrer Vorkommen in den Nahrungsmitteln eine einheitliche Betrachtung schwierig (55). Bisher werden eine Reihe von verschiedenen Mechanismen diskutiert:

- Hemmung von Phase-I-Enzymen,
- Induktion von Phase-II-Enzymen,
- direkte Wechselwirkung mit der DNA,
- Induktion der Apoptose,
- Hemmung der Zellproliferation,
- antioxidative Wirkungen,
- Modulation des Immunsystems.

Am genauesten untersucht ist das antioxidative Potential der Flavonoide. Die Wirkungen von Quercetin scheinen zum Teil auf seinen antioxidativen Eigenschaften zu beruhen. Es wirkt als Radikalfänger und hemmt *in vitro* die Xanthinoxidase und die Lipidperoxidation. Ein weiterer

Beweis für diese antioxidative Wirkung ist die Tatsache, dass Quercetin *in vitro* die Oxidation von LDL-Cholesterin hemmt. Dies geschieht wahrscheinlich durch die direkte Hemmung der LDL-Oxidation, möglicherweise aber auch, indem es das in die LDL-Partikel eingelagerte Vitamin E vor Oxidation schützt oder bereits oxidiertes Vitamin E regeneriert. Allein oder in Verbindung mit Ascorbinsäure senkte Quercetin die Inzidenz oxidativer Schäden an neurovaskulären Strukturen in der Haut und verhinderte die Schädigung von Neuronen durch eine experimentell herbeigeführte Entleerung der Glutathionspeicher.

Die antiinflammatorische Wirkung von Quercetin scheint auf seinen antioxidativen Eigenschaften und auf der Hemmung entzündungsfördernder Enzyme (Zyklooxygenase, Lipoxygenase) sowie auf der anschließenden Inhibition der Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie z.B. Leukotrienen und Prostaglandinen zu beruhen. Auch die Hemmung der Histaminfreisetzung aus Mastzellen und Blutbasophilen trägt zur entzündungshemmenden Wirkung von Quercetin bei.

Das Enzym Aldosereduktase, das die Umwandlung von Glukose zu Sorbitol katalysiert, spielt eine besonders wichtige Rolle im Auge, wo es an der Entstehung diabetischer Katarakte beteiligt ist. Quercetin ist ein starker Inhibitor der Aldosereduktase in der menschlichen Linse. Im Anschluss an erste Studien zu Quercetin wurde berichtet, dass die Verabreichung dieser Substanz bei Ratten zu einer erhöhten Inzidenz von Harnblasentumoren geführt habe. Spätere Studien an Ratten, Mäusen und Hamstern konnten jedoch die angebliche Karzinogenität von Quercetin nicht bestätigen. Vielmehr belegt die Mehrzahl der Untersuchungen, dass Quercetin antikarzinogen auf viele Arten von Krebszellen wirkt (53, 54).

#### **2.2.4. Pharmakokinetik des Quercetins**

Zur Resorption von Quercetin liegen nur wenige klinische Untersuchungen vor. Offenbar wird nach einmaliger oraler Verabreichung nur ein geringer Anteil der Dosis resorbiert. Eine Studie ergab sogar eine Resorptionsrate von lediglich zwei Prozent. Zwei Theorien der Aufnahme der Flavonole wurden beschrieben: Zum einen sollen sie im Dickdarm bakteriell abgebaut und in Phenolsäuren umgewandelt werden, zum anderen belegen neuere Studien an Ileostomie-Patienten, dass bestimmte Flavonoidglykoside sowohl über eine passive Diffusion, als auch über einen aktiven Transport im Dünndarm absorbiert werden (Abb. 2.3). Nach der Resorption wird Quercetin an Albumin gebunden und in die Leber transportiert, wo es teilweise glukuronidiert, methyliert, hydroxyliert oder konjugiert werden kann (56).

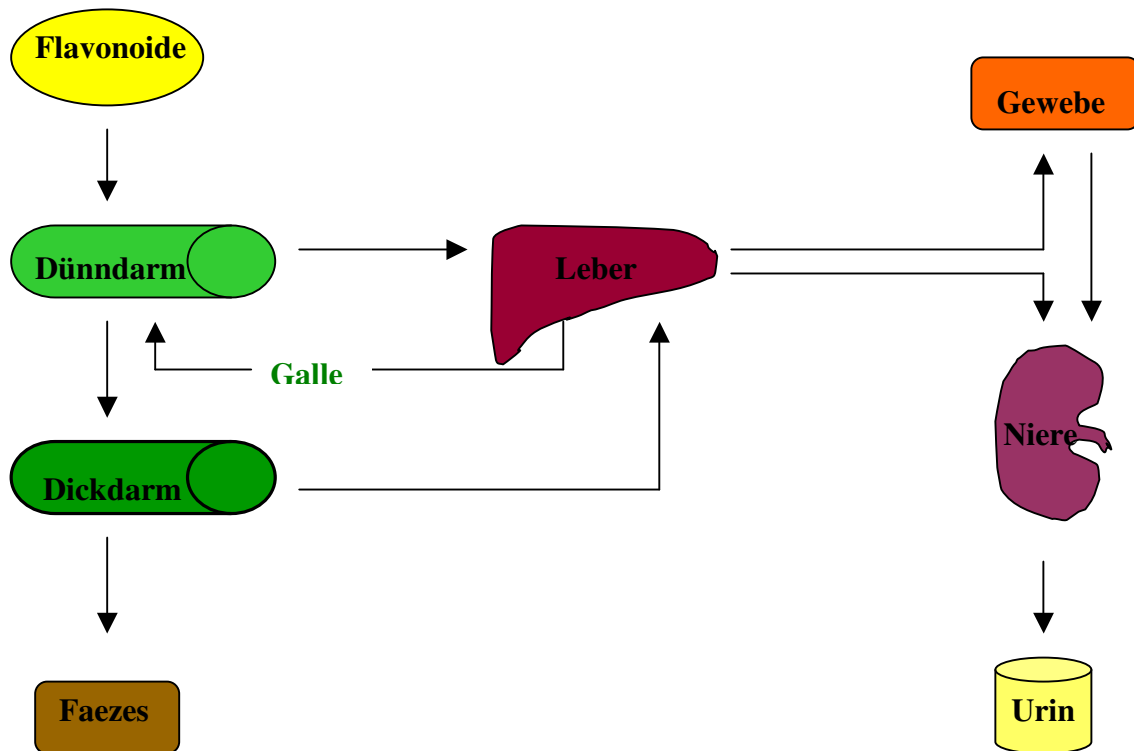


Abb. 2.3: Vereinfachtes Schema über Aufnahme, Metabolisierung und Elimination der Flavonoide (55).

Die höchsten Flavonolkonzentrationen im Plasma werden 0,5 bis 9 Stunden nach oraler Flavonolaufnahme gemessen. Die Halbwertszeiten für die Ausscheidung von Flavonolen aus Zwiebeln (Quercetin-Glukose-Konjugate) und Äpfeln (verschiedene Quercetin-Glukose-Konjugate) im Urin liegen bei 28 bzw. 23 Stunden. Im Plasma konnte kein freies Quercetin nachgewiesen werden. Festgestellt werden konnten ausschließlich Quercetinmetaboliten, die an Glukuronsäure und Sulfate gekoppelt waren. Im Plasma liegt Quercetin zu 99 % an Albumin gebunden vor. Diese hohe Affinität erklärt möglicherweise die sehr langsame Elimination von Quercetin.

Die maximale Flavonoidkonzentration im Plasma nach dem Verzehr von Lebensmitteln liegt bei 0,5 – 2  $\mu\text{M}$ . So fand Aziz *et al.* 1998 heraus, dass bei Aufnahme einer Zwiebel, die 139 mg Quercetin enthielt, eine maximale Plasmakonzentration von 1,34  $\mu\text{M}$  gemessen werden konnte. Hollmann *et al.* (1999) verabreichten Probanden an Glykosid gebundenes Quercetin (Quercetin-4-O-glycoside), welches zu Spitzenkonzentrationen von 3,2  $\mu\text{M}$  im Plasma führte. Zurzeit ist unklar, ob und wo Flavonoide in Körpergeweben gespeichert werden können.

Wegen ihrer Fettlöslichkeit können Flavonoidglykoside vorwiegend in der Zellmembran lokalisiert sein (57).

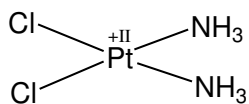
Zur intrazellulären Verteilung gibt es wenig Informationen. In einer Phase-I-Studie konnten Ferry et al. 1996 durch intravenöse Gabe von Quercetin Serumkonzentrationen zwischen 200-400  $\mu\text{M}$  erzielen (56). In der gleichen Studie wurden auch die Nebenwirkungen an einem Patientengut von 51 Personen überprüft. Hier stehen im Vordergrund unspezifische Symptome wie Erbrechen aber auch die renale Toxizität bei hohen Dosen und in zwei Fällen eine kardiovaskuläre Beteiligung.

### 2.2.5. Dosierung des Quercetin

Zur Zeit findet Quercetin vorwiegend in der *alternativen* Medizin Verwendung. Dort werden meist orale Dosen von 400-500 mg Flavonoid dreimal täglich verabreicht. Empfohlen wird von den Herstellern eine tägliche Dosis zwischen 0,4 und 2 g/d.

## 2.3. Zytostatika

### 2.3.1. Cisplatin



Der anorganische Schwermetallkomplex Cisplatin oder Cis-Diammindichloroplatin(II) wird seit 1979 klinisch eingesetzt und ist zur Zeit eines der 3 am häufigsten eingesetzten Chemotherapeutika.

Abb. 2.4: Cisplatin Die Erfolgsaussichten auf Cisplatin basierender Krebstherapien werden durch die Anwendung von Kombinationstherapien gesteigert.

In Abbildung 2.4 ist die planare cis-Diamin-Komplexverbindung mit zentralem zweiwertigem Platinatom, an das zwei cis-ständige Chlorliganden und koordinativ zwei  $\text{NH}_3$ -Gruppen gebunden sind, dargestellt.

Obwohl Cisplatin auch direkt mit Makromolekülen reagieren kann, wird angenommen, dass es in wässriger Lösung, abhängig vom pH-Wert, zunächst einem Ligandenaustausch unterliegt und erst dann rasch reagiert. Der hohe Chloridgehalt im Serum hält Cisplatin zunächst in der Dichloro-Form, so dass der Ligandenaustausch zum größten Teil erst nach Diffusion durch die Zellmembran im Zytoplasma erfolgt.

Cisplatin entfaltet seine zytotoxischen Effekte durch Bindung an alle DNS-Basen, wobei allerdings die N-7-Position des Guanins und des Adenins bevorzugt wird. Die Bindung pro

Makromolekül an RNS ist dabei stärker als an DNS und diejenige an DNS stärker als an Proteine. Den Hauptanteil an DNS-Addukten bilden dabei Monostrangaddukte, die Adenin und Guanin oder Guanin mit Guanin vernetzen und zusammen ca. 90 % ausmachen. Von besonderer Bedeutung für die zytostatische Wirkung des Cisplatins ist aber die Ausbildung von Quervernetzungen, meist Interstrangvernetzungen („interstrand cross linking“), obwohl diese quantitativ nur ca. 5 % aller DNS-Addukte ausmachen.

Eine Resistenz gegenüber Cisplatin kann durch stufenweise Vorbehandlung *in vitro* induziert werden. Als relevante Resistenzmechanismen werden eine durch Zellmembranfaktoren bedingte geringere Pharmakonaufnahme, eine Anhebung des Sulfhydrylgehaltes (z. B. Glutathion, Metallothionein) im Zytosol und/oder vermehrte DNS-Reparatur angesehen.

Cisplatin wirkt u. a. mit folgenden Substanzen synergistisch: Adriamycin, Bleomycin, Cyclophosphamid, Etoposid, Ifosпамid, Methotrexat, Vinblastin und Vincristin. Es wird zur Zeit bei folgenden malignen Neoplasien eingesetzt: Blasenkarzinomen, klein- und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Endometriumkarzinomen, Hodentumoren, Karzinomen des Hals- und Kopfbereiches, Melanomen, Ovarialkarzinomen, Prostatakarzinomen, Sarkomen, Zervixkarzinomen, sowie verschiedenen Tumoren der pädiatrischen Onkologie wie Osteosarkomen, Neuroblastomen, malignen Keimzelltumoren oder Nephroblastomen.

Ein grundsätzliches Problem stellen die Nebenwirkungen der Cisplatin-Chemotherapie dar. Nachdem in den anfänglichen klinischen Studien mit Cisplatin schwere Übelkeiten mit Erbrechen und Nierenversagen auftraten, wurden in der frühen Anwendungsphase die klinischen Testungen beinahe eingestellt (59).

Weitere Forschungen zeigten jedoch, dass durch intensive Diurese die schweren Nierenschäden verhindert werden können (60), und dies ermöglichte eine Fortsetzung der Untersuchungen. Weiterhin wurden Gehörschäden in Form von Gehörlosigkeit im hohen Frequenzbereich beobachtet (61). Seltener tritt auch Neurotoxizität auf, hauptsächlich in Form von vorübergehendem Verlust der Sensitivität in den Gliedmaßen. Diese Schädigung der Nervenzellen beruht auf Demyelinisierung der Axonen, mit der Folge, dass wahrscheinlich die Impulsweiterleitung verlangsamt wird. Außerdem kann Cisplatin zu Mutationen und damit zu individuellen Langzeitschäden und Zweittumoren führen (61).

In der Mono-Chemotherapie werden klinisch Dosierungen von 50-120 mg/m<sup>2</sup> KOF Cisplatin in 3-4wöchigen Abständen oder 50 mg/m<sup>2</sup> KOF Cisplatin, Tage 1 und 8 in 3-4wöchigen Abständen oder 15-20 mg/m<sup>2</sup> KOF Cisplatin, Tage 1-5 in 3-4wöchigen Abständen eingesetzt (Hexal AG). Im allgemeinen wird Cisplatin aber in Chemotherapiekombinationen angewendet, in denen die Dosis zum Teil entsprechend reduziert wird.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Cisplatin ein sehr wirkungsvolles Chemotherapeutikum ist, dessen Einsatzspektrum allerdings nicht universell ist und durch Resistenzen und Nebenwirkungen weiter eingeschränkt wird.

### 2.3.2. Etoposid

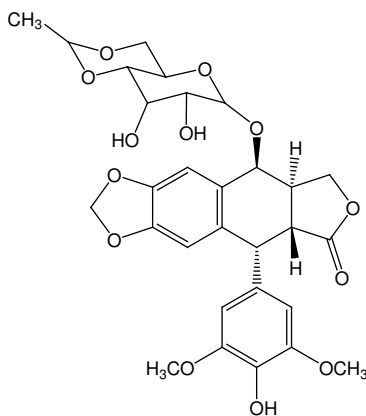


Abb. 2.5: Etoposid

Etoposid, syn. VP16, ist ein selektiver Hemmstoff der DNA-Topoisomerase II. Es wird aus der Pflanze „Podophyllum peltatum“ isoliert und ist ein halbsynthetisches Podophyllotoxin. In Abbildung 2.5 ist die komplexe Struktur dieser Substanz dargestellt. Anwendung findet Etoposid vor allem in Kombination mit anderen Chemotherapeutika in der Behandlung einiger maligner Tumoren. Dazu gehören das kleinzellige und das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom, Non-Hodgkin Lymphome, Morbus Hodgkin, nicht seminomatöse und seminomatöse Keimzelltumoren, Neuroblastome, akute Leukämien und Sarkome.

Durch die genannte Hemmung der DNA-Topoisomerase II induziert Etoposid Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA und führt damit zur DNA-Protein-Quervernetzung. Im Gegensatz zur Topoisomerase I, die DNA-Einzelstrangbrüche bewirkt, spaltet die Topoisomerase II beide Stränge der DNA-Doppelhelix. Anschließend kann ein benachbartes doppelsträngiges DNA-Segment durch die entstandene Lücke hindurchtreten. Dieser Vorgang wird auch als „DNA-strand-passing“ bezeichnet. Die entstandene Lücke wird wieder durch die Topoisomerase II geschlossen. Dafür ist die kurzfristige Bildung eines kovalenten DNA-Enzym-Komplexes notwendig, der auch „cleavable complex“ genannt wird.

Etoposid hat zwei Effekte auf die Topoisomerase II: Zum einen hemmt es deren katalytische Aktivität und zum anderen stabilisiert es den DNA-Enzymkomplex in seiner Bindung mit den DNA-Strängen und festigt damit den „cleavable complex“. Durch die Stabilisierung des DNA-Enzymkomplexes wird die Wiedervereinigung der DNA-Stränge gehemmt und damit persistieren für die Transkription schadhafte DNA-Strangbrüche. Die Zytotoxizität von Etoposid korreliert mehr mit dem Vorliegen stabilisierter Intermediate als mit der Hemmung der katalytischen Aktivität (62).

Die Konzentration und die Aktivität von Topoisomerase II ist in proliferierenden Zellen höher als in nicht proliferierenden Zellen. Da die Wirkung von Etoposid im wesentlichen durch eine

Hemmung der Topoisomerase II hervorgerufen wird und proliferierende Zellen eine höhere Aktivität dieses Enzyms besitzen, hat Etoposid eine gewisse selektive Wirkung auf Tumorzellen (62).

Eine weitere, zusätzliche Wirkung von Etoposid soll die Bildung von reaktiven Metaboliten sein und wird noch weiter untersucht. Es wird vermutet, dass diese Metaboliten direkt an die DNA binden und sie damit inaktivieren (63).

## **2.4. Das Ewing-Sarkom**

Tumoren der Ewing-Sarkom-Familie (Ewing-Sarkom und primitiver neuroektodermaler Tumor [PNET]) sind nach dem Osteosarkom die zweithäufigsten Knochentumoren bei Kindern und Jugendlichen. Sie können auch als Weichteiltumoren, ähnlich wie das Rhabdomyosarkom, imponieren. Die Tumoren entstehen aus einer primitiven neuroektodermalen Zelle und zeigen eine variable Differenzierung. Während das klassische Ewing-Sarkom, 1921 zuerst von James Ewing beschrieben (64), ein wenig differenzierter Tumor ist, zeigt der primitive neuroektodermale Tumor eine deutliche neuronale Differenzierung (65). Alle Tumoren der Ewing-Sarkom-Familie weisen charakteristische Translokationen auf, zumeist eine Translokation t(11;22).

Die Behandlung der Tumoren der Ewing-Sarkom-Familie besteht, ähnlich wie beim Osteosarkom oder bei Weichteiltumoren, aus einer Kombination von systemischer Chemo- und Lokaltherapie mit Operation oder Strahlentherapie oder einer Kombination beider Maßnahmen. Während das Osteosarkom jedoch eine Strahlenresistenz aufweist, beschrieb bereits Ewing 1921, dass der von ihm ausführlich beschriebene Tumor strahlensensibel ist (64).

Um den Effekt der Chemotherapie auf den Primärtumor auszunutzen, geht der Lokaltherapie immer eine mehrwöchige chemotherapeutische Behandlung voraus. Abhängig von den beiden wichtigsten Prognosefaktoren, Vorhandensein von Metastasen und Tumorgröße, können mit dem kombinierten, einheitlichen Therapiekonzept derzeit 67 % (5 JÜR) aller Patienten geheilt werden (66).

### **2.4.1. Ätiologie des Ewing-Sarkoms**

Die Ursachen, die zur Entstehung eines Ewing-Sarkoms führen, sind unbekannt. Weder eine vorausgegangene Strahlentherapie noch vererbte genetische Faktoren scheinen eine

wesentliche Rolle zu spielen. Während jedoch die Inzidenz von Ewing-Sarkomen in der mitteleuropäischen Bevölkerung bei ca. 2 Fällen pro Million Kinder liegt (Kaatsch *et al.*, 1995), ist die Erkrankung bei farbigen und asiatischen Kindern extrem selten (67).

#### **2.4.2. Molekulargenetik des Ewing-Sarkoms**

Nahezu alle Tumoren der Ewing-Sarkom-Familie zeigen intrazellulär eine klonale Translokation, in über 90 % der Fälle zwischen dem Ewing-Sarkom(EWS)-Gen auf Chromosom 22 und dem FLI-1-Gen auf Chromosom 11. FLI-1 ist ein Mitglied der ETS-Familie von Transkriptionsfaktoren, die direkt an DNA binden. Das EWS-Gen ist bisher weniger gut charakterisiert, hat aber wohl eine RNA-bindende Domäne. Das Fusionsgen enthält die 5'-Sequenzen des EWS-Gens und die 3'-Sequenzen des FLI-1-Gens. Es hat die DNA-bindende Fähigkeit von FLI-1, wird aber von dem Promotor des EWS-Gens reguliert und hat onkogene Wirkung. Seltener Translokationen sind t(21;22) und t(7;22), die das EWS-Gen mit dem ERG-Gen auf Chromosom 21 bzw. dem ETV-1-Gen auf Chromosom 7 verbinden. Die Untersuchung von Weichteil- und Knochentumoren auf das Vorliegen solcher charakteristischen Fusionstranskripte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) oder der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist heute ein wesentlicher Bestandteil der notwendigen Diagnostik.

#### **2.4.3. Pathologie des Ewing-Sarkom**

Makroskopisch erscheinen die Tumoren der Ewing-Sarkom-Familie grau-weiß mit Gebieten von Einblutung und Nekrose. Eine Kalzifizierung findet sich in den glykogenhaltigen Tumoren selten. Das histologische Bild wird geprägt durch „kleine runde blaue Zellen“. Zellen dieser Art findet man auch beim Neuroblastom, dem Medulloblastom, der akuten lymphoblastischen Leukämie, den malignen Non-Hodgkin-Lymphomen, dem Rhabdomyosarkom und dem Retinoblastom. Da die histologische Unterscheidung dieser verschiedenen Entitäten gelegentlich schwierig ist, sind immunhistochemische und molekulargenetische Untersuchungen wesentlich. Eine besondere Bedeutung kommt dabei dem Oberflächenantigen MIC2 zu, da es charakteristischerweise bei Ewing-Sarkomen/PNET stark exprimiert wird. Eine neuronale Differenzierung mit Nachweis der neuronenspezifischen Enolase, des S-100-Proteins, der Anwesenheit von Rosetten oder neuronalen Elementen in der Elektronenmikroskopie findet sich bei der PNET-Variante der



Tumoren der Ewing-Familien. Die prognostische Bedeutung dieser neuronalen Differenzierung ist unklar (68).

#### **2.4.4. Therapie des Ewing-Sarkoms**

Die erfolgreiche Behandlung der Ewing-Sarkome/PNET fordert sowohl eine Therapie des Primärtumors (Lokaltherapie) wie auch der Metastasen bzw. Mikrometastasen. Nahezu alle Patienten mit Ewing-Sarkom/PNET haben mit konventionellen Methoden nicht erkennbare Mikrometastasen, so dass die Überlebenschancen ohne systemische zytostatische Therapie mit ausschließlich lokaler Strahlentherapie oder Operation allein nur bei ca. 10 % liegen.

Eine Lokaltherapie besteht in der Regel aus operativer Behandlung oder Strahlentherapie des Primärtumors oder einer Kombination beider Verfahren. Um die tumorverkleinernde Wirkung der Chemotherapie für die operative Maßnahme zu nutzen, geht der Lokaltherapie immer eine mehrwöchige chemotherapeutische Behandlung voraus. Eine lokale Tumorkontrolle mit Strahlentherapie allein bedarf Strahlendosen von 55 – 60 Gray. Im allgemeinen wird dabei der gesamte befallene Knochen bestrahlt, wobei die Haupttumormasse einen zusätzlichen Strahlenboost erhält. Es ist heute allgemein anerkannt, dass die Höhe der Strahlendosis im wesentlichen von der Tumorgröße bestimmt wird. Für große Tumoren mit nur limitierter operativer Möglichkeit werden in Verbindung mit zytostatischer Therapie meist Dosen über 50 Gray empfohlen, während mikroskopische Tumorreste nach Operation mit Strahlendosen von 45 Gray zum Tumorkompartiment behandelt werden (Dunst *et al.*, 1995). Üblicherweise wird die Strahlendosis in Einzeldosen von 1,6 – 2,0 Gy an 5 Tagen der Woche appliziert.

Die schlechten Heilungsraten mit Strahlentherapie oder Operation allein veranlassten in den 1960er Jahren die ersten Therapiestudien mit adjuvanter Chemotherapie. Der Einsatz einer Kombination von Vincristin, Actinomycin D und Cyclophosphamid (VAC) reduzierte die Rezidivrate deutlich. Eine Therapieintensivierung mit Zugabe des Anthrazyklins Doxorubicin (Adriamycin®) zu VAC verbesserte das Überleben weiter (Nesbit *et al.*, 1990), so dass die Wahrscheinlichkeit des rezidivfreien Überlebens für Patienten ohne Metastasierung 15 Jahre nach Diagnosestellung bei 50 – 60 % liegt. In jüngeren Therapiestudien konnte dieses Ergebnis durch die Gabe von Ifosfamid statt Cyclophosphamid (Jürgens *et al.*, 1989) und den zusätzlichen Einsatz von Etoposid (Grier *et al.*, 1996) noch einmal leicht verbessert werden. In Deutschland werden nahezu alle Kinder und Jugendliche mit Tumoren der Ewing-Familie entsprechend den EICESS-Studien der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) behandelt sowie nach dem aktuellen EURO-EWING-Protokoll.

Patienten mit Metastasen bei Diagnosestellung haben trotz intensiver chemotherapeutischer Behandlung eine ungünstige Prognose mit einem rezidivfreien Überleben bei 5 Jahren von ca. 25 % (Jürgens *et al.* und Wessalowski *et al.*, 1988) (69).

## **2.5. Hyperthermie in der Tumorthherapie**

Die Hyperthermie kann ergänzend zu den herkömmlichen Therapiekonzepten in der Krebsbehandlung, also Chirurgie, Chemo- und Immuntherapie sowie Strahlentherapie eingesetzt werden. Sie wirkt in genau ausgewählter Applikationsform und Dosierung bei ausgesuchten Patienten verstärkend auf den Therapieeffekt (2, 3). Üblicherweise werden Temperaturen um 42 °C über einen Zeitraum von ungefähr 1 Stunde in den betroffenen Körperarealen angewandt. Dabei sollte die Hyperthermie immer im zeitlichen Zusammenhang mit der Strahlentherapie und/oder der Chemotherapie durchgeführt werden. Die Wirkung der Hyperthermie hängt vornehmlich von der erreichten Temperatur ab: Zu hohe Temperaturen wirken direkt zytotoxisch. Aber schon ab 40 °C tritt in den Zellen ein strahlensensibilisierender Effekt ein, der die zelleigenen Reparaturmechanismen gegenüber den erzeugten Strahlenschäden der Radiatio außer Kraft setzen kann. Ebenso tritt bei moderater Hyperthermie (< 42 °C) für bestimmte Zytostatika ein sensibilisierender Effekt auf, insbesondere bei alkylierenden Substanzen und Zytostatika, die direkt mit der DNA der Tumorzelle reagieren ( z. B. Cisplatin, Carboplatin etc.) (3). Auch weitere physiologische Effekte der Hyperthermie sind bekannt, wie die Steigerung der Durchblutung und damit das verstärkte Substratangebot im überwärmten Areal bei gut durchbluteten Tumoren.

Zur Zeit wird die Hyperthermie vor allem bei lokal fortgeschrittenen Tumoren angewandt, die nicht oder nur mit radikalen chirurgischen Methoden operabel sind und die durch Chemotherapie oder Radiatio nicht ausreichend kurativ behandelt werden können, wie z. B. lokal fortgeschrittene Mammakarzinome, Kopf-Halstumoren und deren zum Teil sehr große Lymphknotenmetastasen, Zervixkarzinome, Blasenkarzinome, Rektumkarzinome sowie Prostatakarzinome oder lokale maligne Melanome und Sarkome.

Es gibt mehrere Möglichkeiten, Hyperthermie auf den Körper wirken zu lassen. In Tabelle 2.4. sind diese kurz zusammengefasst:

Tab. 2.4: Hyperthermiemethoden, Technik und Anwendungsgebiet

<b>Methode</b>	<b>Technik</b>	<b>Anwendung</b>
Ganzkörper-Hyperthermie	Infrarotwellen oder extra-korporale Wärmeaustauscher	Möglichkeit auch Metastasen zu erfassen.
Lokale Hyperthermie	Kapazitive Erwärmung durch elektrisches Wechselfeld, elektromagn. Erwärmung durch Strahler, Magnetwechselfeldmethode mit ferromagnetischem Material im Tumor	Oberflächliche Tumoren und LK-Metastasen
Regionale Tiefenhyperthermie		Wenn invasive Technik nicht möglich oder Tumor regional gestreut hat
Interstitielle Hyperthermie	Applikatoren, Mikrowellenantennen, ferromagnetisches Material	In präformierten Höhlen oder im Schädel
Hypertherme Perfusion	Wärmekonvektion, über die separate Blutversorgung eines Organs oder einer Extremität	Tumoren in Extremitäten, auch bei Ganzkörperhyperthermie
Magnetfeldhyperthermie	Ferromagnetische Materialien werden durch ein wechselndes Magnetfeld erwärmt	Noch in der klinischen Testung

Die Hyperthermie ist in der Regel eine gut verträgliche Therapieform. Schwerwiegende Nebenwirkungen sind bisher nicht bekannt. In erster Linie können zum einen örtliche Überhitzungen mit kleineren Verbrennungen auftreten, zum anderen besteht durch das Einbringen von Temperaturmesskathetern die Gefahr der Verletzung von Organen und Geweben sowie Infektionen.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Geräte**

Begasungsbrutschrank (BB 6220, Heraeus Instruments, Hanau, kontinuierliche CO<sub>2</sub>-Begasung),  
Lamina air flow (antair BSK, Klasse Ia Werkbank, vertikale Luftströmung),  
Inverses Mikroskop (DM IL mit Auflicht-Fluoreszenzeinrichtung, Wilovert, Leica-Vertrieb Gmbh, Köln),  
Kompaktthermostat (M 20B, Lauda-Königshofen, Temperaturkonstanz +/-0,01 °C),  
Vortex (Cenco instruments b.v. Breda, Niederlande),  
Pipetboy-plus (Integra biosciences, Wallisellen, Schweiz),  
Hämozytometer (Brand, Wertheim),  
Electrophoresis Power Supply EPS 3500 (Pharmacia Biotech AB, Schweden),  
Gel-Elektrophoreseeinheit SE 260 (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco),  
Gel-Caster (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco),  
Multiphor II Elektrophorese System (Pharmacia Biotech AB, Schweden),  
Novablot (Pharmacia Biotech AB, Schweden),  
Certomat H/HK (B. Braun Diessel Biotech, Melsungen),  
Absauggerät SUC-O-MAT (WISA GmbH & Co KG, Wuppertal),  
Schüttelgerät REAX 2000 (Heidolph Elektro GmbH & Co KG, Kelheim),  
Elektronische Präzisionswaage 824 (Kern & Sohn GmbH, Albstadt),  
Zentrifuge MEGAFUGE 3.OR (Heraeus Instruments, Hanau)

#### **3.2. Labormaterial**

Pipetten (1 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml, Greiner, Solingen)  
Kulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, Greiner, Solingen),  
Falconröhrchen (10 ml, 50 ml, Greiner, Solingen),  
Roti®-PVDF, Transfermembran für Western-Blot (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe),  
Elektrodenpapier Novablot (Pharmacia Biotech AB, Schweden),  
Dispenser-Tips, 2,5; 5; 12,5 ml (nerbe-plus GmbH, Winsen/Luhe),  
Sterilfilter, 0,45; 0,2 µm (Sartorius AG, Göttingen),  
Perfusor®-Spritze OPS 50 ml (B. Braun Melsungen AG, Melsungen),

Reaktionsgefäße Safe-Lock 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf GmbH, Hamburg),  
Pipettenspitzen 0,5-10 µl, 1-200 µl, 200-1000 µl (WELABO Laborbedarf GmbH, Düsseldorf)

### 3.3. Reagenzien

fetales Kälberserum (RPMI-1640, Gibco BRL, life technologies GmbH, Eggenstein),  
Bovines Serum Albumin, BSA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim),  
Glutamin 200 mmol (ICN),  
Kollagen S (Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim),  
Refobacin 80 mg (Merck, Darmstadt),  
Platiblastin, Wirkstoff Cisplatin (Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen),  
Vepesid J, Wirkstoff Etoposid (Bristol Arzneimittel GmbH, München),  
XTT (2,3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)  
(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim),  
PMS (Phenazinmethylsulfat), (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim),  
PBS-Puffer pH 7,3 (Serag/Wiessner GmbH & Co KG, Naila, Bayern),  
RPMI 1640 Medium mit 25 mm HEPES Puffer und mit L-Glutamin (Gibco BRL,  
life technologies GmbH, Eggenstein),  
Trypsin-EDTA Lösung 10x (Gibco BRL, life technologies GmbH, Eggenstein),  
Quercetin (3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavone) Dihydrat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
Steinheim),  
Trypanblau Lösung 0,4 % (Sigma Chemical Co., Irvine, Scotland),  
Salzsäure (Merck KGaA, Darmstadt),  
Methanol (Merck KGaA, Darmstadt),  
Ethanol absolut (Merck KGaA, Darmstadt),  
n-Butanol (Merck KGaA, Darmstadt),  
Essigsäure 100 %, Eisessig (Merck KGaA, Darmstadt),  
SDS (Sodium dodecyl sulfate), (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe),  
Rotiphorese® Gel 30, 30 % Acrylamidstammlösung (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe),  
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe),  
Ammoniumpersulfat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim),  
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine), (Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
Steinheim),  
Glycin Rotipuran® (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe),

Standardprotein (BioRad, München),  
Ponceau-S-Lösung (BioRad, München)  
Rabbit AntiHuman-HSP70 Peptide Polyclonal Antibody (StressGen Biotechnologies Corp.,  
Victoria),  
Rabbit AntiHuman-HSC70 Polyclonal Antibody (StressGen Biotechnologies Corp.,  
Victoria),  
Monoclonal (Mouse) AntiHuman-HSP27 Antibody (Dianova GmbH, Hamburg),  
Monoclonal (Mouse) AntiHuman-HSP90 Antibody (Dianova GmbH, Hamburg),  
Alkaline Phosphatase-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (Sigma Chemical Co., St.Louis),  
Alkaline Phosphatase-conjugated Affini Pure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Mouse IgG  
(Immunotech, Marseille),  
High Molecular Weight Standard Mixture for SDS Gel Electrophoresis, Molekulargewicht  
30.000-200.000 (Sigma Chemical Co., St.Louis),  
Sigma FAST BCIP/NBT Buffered Substrate Tablet (Sigma Chemical Co., St.Louis),  
Anodenpuffer Roti®-Blot A, 10fach-Konzentrat (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe),  
Kathodenpuffer Roti®-Blot K, 10fach-Konzentrat (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe),

### **3.4. Ewingsarkomzelllinien**

#### **3.4.1. Die Ewingsarkomzelllinie SK-ES-1**

Die humane Ewingsarkomzelllinie SK-ES-1 wurde von Bloom ET. *et al.* (1972) und Fogh J. *et al.* (1975) charakterisiert (ATCC: American Type Culture Collection Nr. HTB-86).

Die Zellen stammen aus einem anaplastischen Ewing-Sarkom eines Knochens von einem 18jährigen Mann kaukasischer Ethnologie (64).

Unter In-vitro-Bedingungen wachsen SK-ES-1-Zellen in kollagen-beschichteten Kulturflaschen adhärent und zeigen ein spindelförmiges Aussehen, während sie in unbeschichteten Flaschen eine runde Form annehmen. SK-ES-1-Zellen haben einen Durchmesser von ca. 10 µm, sind lichtmikroskopisch klar voneinander abgrenzbar und besitzen ein helles Zytoplasma. Zudem ergaben molekulargenetische Untersuchungen an dieser Tumorzelllinie die für das Ewingsarkom typische reziproke Translokation t (11; 22)

(q24; q12), die zur Synthese des EWS/Fli-1-Proteins führt (Dockhorn-Dworniczak B. *et al.*, 1994).

### **3.4.2. Die Ewingsarkomzelllinie RD-ES**

Die humane Ewingsarkomzelllinie RD-ES stammt aus dem Primärtumor eines Ewingsarkoms im Bereich des Humerus eines 19jährigen Mannes kaukasischer Ethnologie (ATCC-Nummer: HTB-166) (64).

## **3.5.. Kultivierung der Ewingsarkomzelllinien**

### **3.5.1. Nährlösung**

Als Nährmedium wird ein Gemisch aus 500 ml RPMI-1640, 60 ml fetales Kälberserum (FCS 10%, inaktiviert bei 57°C), 5 ml Glutamin (200 mmol) und 1 ml Refobacin 40 (40 mg) verwendet. FCS und Glutamin sind bei -20°C aufzubewahren und werden bei Bedarf aufgetaut. Die einzelnen Substanzen müssen unter sterilen Bedingungen gemischt werden und können dann bei 4°C mehrere Monate gelagert werden.

### **3.5.2. Kollagenbeschichtung**

Die adhärent wachsenden Ewingsarkomzelllinien benötigen neben Nährstoffen für die Kultivierung kollagenbeschichtete Kulturflaschen bzw. Mikrotiterplatten. Zur Kollagenbeschichtung werden 3 ml Kollagen S mit 42 ml 0,1 M Essigsäure steril verdünnt. 1,5 ml dieser Lösung werden auf jede Kulturflasche pipettiert, die in waagerechter Position bei niedriger Umdrehungszahl auf den Certomaten gelagert werden, damit sich eine gleichmäßige Kollagenbeschichtung ausbilden kann. Nach 48 Stunden wird die verbleibende Lösung abgesaugt und die Flaschen einen Tag zum Trocknen offen unter die sterile Werkbank gestellt. Nachdem jegliche Flüssigkeit vertrocknet ist, können die Kulturflaschen verschlossen und bei Raumtemperatur gelagert werden. Für die 96-Well-Mikrotiterplatten wird ein Pipettiervolumen von 50 µl pro Well gewählt. Anschließend werden die Platten unter der sterilen Werkbank 24 Stunden offen zum Trocknen ausgelegt und können dann ebenfalls für einen längeren Zeitraum gelagert werden.

### **3.5.3. Subkultivierung der Zellen**

Nachdem der Boden einer Kulturflasche konfluent mit Zellen bewachsen ist, müssen die Zellen subkultiviert werden. Dieser Vorgang muss unter sterilen Bedingungen stattfinden, da sonst die Gefahr einer Kontamination mit Bakterien oder Pilzen besteht. Das mittlerweile gelb-orange verfärbte Medium wird verworfen und 5 ml einer 0,05% Trypsin/0,02% EDTA-Lösung werden für ca. 5 Minuten hinzugegeben. Durch leichtes Schütteln lösen sich die Zellen ab. Nach Zugabe von 5 ml Medium wird der Ablösevorgang gestoppt, damit die Zellen nicht geschädigt werden. Das Gemisch wird bei 1200 rpm (ca. 290 g) und 4°C für 5 Minuten in einem Falcon-Röhrchen (50 ml) zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, das Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert und erneut bei 1200 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wird die Zellzahl in der Neubauer Zählkammer bestimmt. Dazu werden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau-Lösung 0,4% versetzt. Eine Menge von 8 µl dieses Gemisches wird auf den Objektträger der Zählkammer pipettiert und die Zellen können in den 4 vorgegebenen Quadranten gezählt werden. Nach Korrigierung des Verdünnungsfaktors (Division durch 2) ist die durchschnittliche Zellzahl in einem Milliliter Zellsuspension bestimmt. Insgesamt 400 000 Zellen werden mit 8 ml Medium in eine neue kollagenbeschichtete Kulturflasche gegeben.

### **3.5.4. Kryokonservierung der Ewingsarkomzelllinien SK-ES-1 und RD-ES**

Zur dauerhaften Konservierung werden die Tumorzellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C eingefroren. Dazu werden konfluent gewachsene Zellen mit 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA abgelöst und zweimal mit Medium bei 1200 rpm und 4°C 5 min gewaschen. Dann werden sie in einer Konzentration von circa 1 Million Zellen pro Milliliter in normalen Medium und Einfriermedium im Verhältnis 1:1 resuspendiert. Das Einfriermedium besteht aus 50 % RPMI 1640, 30 % FCS und 20 % DMSO. Ein Milliliter dieser Zellsuspension wird anschließend in Aliquots bei -80°C tiefgefroren. Nach 2 Tagen erfolgt die Kryokonservierung im Stickstoffbehälter. Es sollten möglichst Zellen konserviert werden, die noch nicht häufig umgesetzt wurden.



### 3.5.5. Auftauen der Ewingsarkomzelllinien SK-ES-1 und RD-ES

Die Kryoröhrchen werden aus dem flüssigen Stickstoff herausgenommen und kurz im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Anschließend folgt der Transfer der Zellen in 10 ml kaltes Medium und zweimalige Waschung. Danach können sie auf zwei Kulturflaschen mit je 8 ml Medium verteilt werden. Erfahrungsgemäß wächst nur ein Teil der eingefrorenen Tumorzellen wieder an, so dass mindestens eine Millionen Zellen pro Flasche ausgesät werden.

### 3.6. XTT-Test

Der XTT-Test ist eine Modifizierung des MTT-Tests, der 1983 von Mosmann zur Prüfung der Chemosensibilität von Tumoren entwickelt wurde. Beide Tests dienen der Erfassung von kleinen Zellzahlen, wie sie bei der Arbeit mit 96-Well-Platten vorkommen (70).

Scudiero *et al.* haben 1988 anstelle des Tetrazoniumsalzes MTT, dessen größter Nachteil die Unlöslichkeit ist, das lösliche Derivat XTT verwendet. Denn jeder Einsatz von MTT zog einen Lösungsschritt mit DMSO oder Propan-2-ol nach sich, der die Testergebnisse beeinflusste (71).

XTT: 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazoliumhydroxid wird in vitalen Zellen, wahrscheinlich von den Mikrosomen, zu einem wasserlöslichen Formazanprodukt metabolisiert. Dieses diffundiert sofort in den Überstand des Testansatzes und ist bei einer Wellenlänge von 450 nm messbar.

Bei Anwendung des XTT-Testes ist eine Zugabe von PMS (Phenazin-Methosulfat) zu beachten, da erst hierdurch eine dem MTT vergleichbare Metabolisierung in den lebenden Zellen erreicht werden kann. Die 20mM Stammlösung wird 1:1000 verdünnt, so dass eine Endkonzentration von 20 µM pro Vertiefung der 96-Well-Platte entsteht.

Durch die leichte technische Handhabung bei fehlender Toxizität und ein gut nutzbares Absorptionsmaximum im orange-roten Bereich findet der XTT-Test zur Messung der Zellmenge zunehmend Bedeutung. Mit der Erfassung der Überlebensraten von Zellen kann durch dieses Testverfahren der zytotoxische Einfluss von Chemotherapeutika, Quercetin und Hyperthermie quantitativ erfasst werden.

Im Versuchsaufbau ermöglicht die Verwendung von Mikrotiterplatten die Testung von mehreren Zytostatika in verschiedenen Konzentrationen unter gleichen Versuchsbedingungen.

Außerdem kann für jede Temperatur eine Platte angelegt werden. Da die Zellmenge über das durch die Mikrosomen der Tumorzellen metabolisierte XTT zum Formazan bestimmt wird, handelt es sich hierbei um eine relative Bestimmung. Es wird also kontrolliert, wie viele Zellen den ausgeübten Stress (Zytostatika, Hitze) überlebt haben und noch funktionstüchtig sind. Nicht zu vernachlässigen sind Stressfaktoren wie zu hohe Zelldichten oder unzureichendes Nährangebot, die durch die Versuchsplanung ausgeschlossen werden müssen. Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in der genauen Quantifizierung von zytotoxischen Einflüssen der Zytostatika  $\pm$  Hyperthermie am Modell des Ewingsarkoms (s. Versuchsprotokoll, Tab. 3.4).

### **3.6.1. Quercetinbehandlung $\pm$ Hyperthermie von den Ewingsarkomzelllinien SK-ES-1 und RD-ES**

Sechs Mikrotiterplatten werden für einen XTT-Testansatz entsprechend des Versuchsplans benötigt. In jede Vertiefung der Mikrotiterplatten werden 7000 Zellen in 200  $\mu$ l Medium ausgesät. Die Spalte 1 der Testplatten bleibt zellfrei und wird nur mit Medium gefüllt. Die Zellen in den Testplatten werden dann für 24 Stunden bei 37 ° C im Brutschrank inkubiert.

Bei Testansätzen mit zusätzlichem Quercetin erfolgt die Behandlung 24 Stunden vor der geplanten Chemotherapie. Für mehrere XTT-Tests wird eine 5 mM Quercetin-Stammlösung aus 16,9 mg Quercetin in 10 ml Ethanol 100% hergestellt, die bei Zimmertemperatur gelagert werden kann. Für zwei unterschiedliche Versuchsanordnungen (Tab. 3.1 und 3.2) wird diese Stammlösung in verschiedenen Mengen auf je 15 ml Medium verteilt, so dass für die eine Testreihe Konzentrationen von 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 40  $\mu$ M und 50  $\mu$ M entstehen und für die andere Konzentrationen von 0,4  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M und 250  $\mu$ M Quercetin. Sämtlichen Vertiefungen der Mikrotiterplatten bis auf Reihe H (Nullkontrolle) werden 100  $\mu$ l abgesaugt. Damit keine mechanischen Verletzungen des Zellrasens und damit Verfälschungen der Zellzahlen entstehen, sind Berührungen des kollagenbeschichteten Bodens mit den angewachsenen Zellen zu vermeiden.

Anschließend werden nach folgendem Schema 100  $\mu$ l Medium mit oder ohne Quercetin hinzupipettiert (Tab. 3.1 und 3.2):

Tab. 3.1: Zugabe des Quercetins im XTT-Test (Testreihe I)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C		10	10	10	10	10	10	10	10	10		
D		20	20	20	20	20	20	20	20	20		
E		30	30	30	30	30	30	30	30	30		
F		40	40	40	40	40	40	40	40	40		
G		50	50	50	50	50	50	50	50	50		
H		0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Quercetin (µM)

96-Well-Platte

Tab. 3.2: Zugabe des Quercetins im XTT-Test (Testreihe II)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C		0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4		
D		2	2	2	2	2	2	2	2	2		
E		10	10	10	10	10	10	10	10	10		
F		50	50	50	50	50	50	50	50	50		
G		250	250	250	250	250	250	250	250	250		
H		0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Quercetin (µM)

96-Well-Platte

Reihe H wird während des gesamten Versuches nicht behandelt und dient in der Auswertung als Nullkontrolle.

Die Platten 1,2 und 3 werden bei 37 °C in den Brutschrank gestellt, die Platten 4,5 und 6 für 1 Stunde (+ 30 min. Aufwärmphase) bei einer Temperatur von 42 °C ins Wasserbad getaucht. Damit kein Wasser in die Vertiefungen der 96-Well-Platte eindringen kann, werden die Testplatten in Plastikbeuteln wasserdicht verschlossen. Nach der 42°C-Wärmebehandlung werden alle 6 Testplatten für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

### 3.6.2. Thermochemotherapie:

#### Einflüsse von Etoposid und Cisplatin ± Hyperthermie auf die Ewingsarkomzelllinien SK-ES-1 und RD-ES

Wiederum werden von allen Wells der Testplatten bis auf Reihe H 100 µl Medium abgesaugt. Es werden jeweils 10 ml Medium mit 20 µl Etoposid (Vepesid®), bzw. Cisplatin (Platiblastin®) versetzt. In die vorgesehenen Vertiefungen der Mikrotiterplatten werden 100 µl der vorbereiteten Zytostatikalösungen pipettiert, so dass eine Endkonzentration von 20 µg/ml Etoposid bzw. 0,5 µg/ml Cisplatin vorliegt.

Nach folgendem Schema wird Medium mit Etoposid, Cisplatin oder ohne Zytostatikum hinzugefügt (Tab. 3.2.):

Tab. 3.2.: Zugabe der Zytostatika im XTT-Test

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C					20	20	20	0,5	0,5	0,5	20	0,5
D					20	20	20	0,5	0,5	0,5	20	0,5
E					20	20	20	0,5	0,5	0,5	20	0,5
F					20	20	20	0,5	0,5	0,5	0,5	20
G					20	20	20	0,5	0,5	0,5	0,5	20
H												

Konzentration  
VP16/Cisplatin [µg/ml]

96-Well-Platte

Im Anschluss werden die Platten 1 und 4 bei 37 °C in den Brutschrank gestellt, die Platten 2 und 5 bei 43 °C, die Platten 3 und 6 bei 45 °C ins Wasserbad getaucht. Ebenso wie bei der Quercetinbehandlung müssen die Platten wasserdicht verpackt sein und sollten kaum Luft enthalten. Die Inkubationszeit beträgt 1 Stunde (ohne die Aufwärmphase von ca. 30 min).

Da sich in Vorversuchen gezeigt hat, dass sich durch den Einfluss der Hyperthermie die Tumorzellen vom Boden der kollagenbeschichteten Mikrotiterplatten ablösen, werden die Platten zuerst 5 Minuten bei 4 °C mit 1200 rpm zentrifugiert, um beim folgenden Absaugvorgang höhere Zellverluste zu vermeiden.

Danach werden die Zellen zweimal gewaschen, indem 150 µl Medium abgesaugt und die gleiche Menge neues Medium hinzupipettiert wird. Dieser Waschvorgang verdünnt zum einen das Zytostatikum auf einen zu vernachlässigenden Faktor, zum anderen werden die Zellen noch einmal mit frischem Medium versorgt.

Alle behandelten Mikrotiterplatten werden anschließend bis zur Auswertung für einen Zeitraum von 72 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

In der Abbildung 3.1 wird der zeitliche Ablauf der Versuchsanordnung schematisch dargestellt:

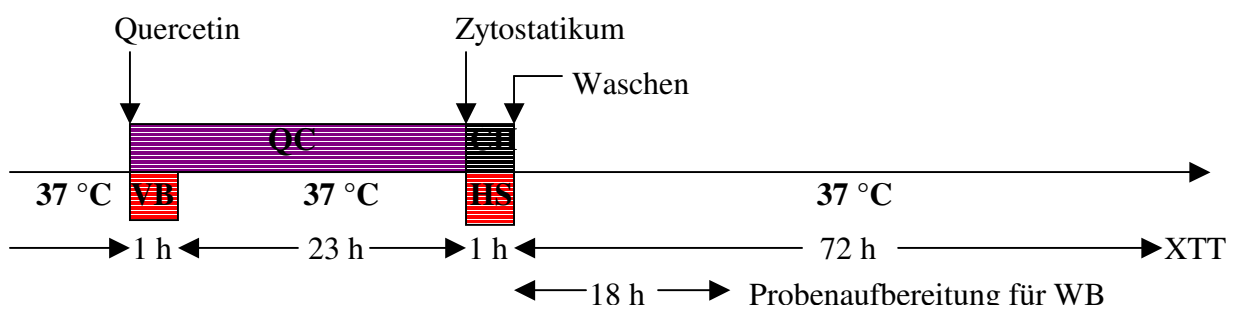


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Versuche. QC = Quercetin-einwirkung mit variierenden Konzentrationen, CH = Chemotherapie mit Etoposid oder Cisplatin, VB = mögliche Vorbehandlung mit 42 °C, HS = möglicher Hitzeschock mit 43 °C oder 45 °C, WB = Western-Blot

### 3.6.3. XTT-Auswertung

Zur Bestimmung der Überlebensraten der Tumorzellen nach 72 Stunden unter den oben genannten Testbedingungen wird XTT hinzugegeben. In mehreren Versuchen hat sich eine XTT-Konzentration von 0,5 mg/ml pro Well als sinnvoll ergeben. Für 6 Mikrotiterplatten werden 15 mg XTT in 30 ml RPMI ohne Phenolrot gelöst; außerdem sind 30 µl PMS (Phenazinmethylsulfat; Stocklösung: 20 mM) hinzuzufügen. Eine Menge von 50 µl dieses Gemisches wird in jede Vertiefung der Mikrotiterplatten pipettiert und die XTT-markierten Zelllinien bis zur Auswertung der Behandlungseffekte 3 bis 5 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Die Absorption des entstandenen orange-roten Farbtönen des Formazanproduktes wird mit dem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die höchsten ermittelten Werte

dürfen eine Extinktion von 3,0 nicht überschreiten, da der ELISA-Reader in diesem Bereich nicht mehr exakt misst.

Da Spalte 1 der Mikrotiterplatten nicht mit Zellen besetzt worden ist, gibt der hier gemessene Wert die Eigenextinktion des Mediums und des XTTs wieder.

Auswertung: Absorbtion (A) der unbehandelten Kontrolle = 100 % Überlebensrate

$$\text{Überlebensrate (\%)} = \text{mittl. A behandelte Zellen} / \text{mittl. A unbeh. Zellen} \times 100 \%$$

### **3.7. Probenaufarbeitung und Proteinbestimmung**

#### **3.7.1. Probenherstellung zur kinetische Untersuchung der intrazellulären Expression von Hitzeschockproteinen durch den Einfluss von Hyperthermie an der Ewingsarkomzelllinie SK-ES-1**

Zwölf Kulturflaschen mit jeweils 1 Millionen SKES-Zellen werden für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Dann werden 6 Flaschen für 1 Stunde bei 43 °C ins Wasserbad getaucht. Die restlichen Flaschen werden als Nullkontrolle im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. An die Hyperthermiebehandlung anschließend werden jeweils zu den Zeitpunkten 0, 3, 6, 12, 24 und 48 Stunden die Zellen einer hyperthermiebehandelten und einer unbehandelten Flasche mit 0,02 % EDTA/0,05 % Trypsin abgelöst, mit PBS gewaschen und in 100 µl PBS plus 14 µl Proteasen-Inhibitor-Cocktail (complete™,Mini) eingefroren.

#### **3.7.2. Probenaufarbeitung zur Untersuchung der Hitzeschockproteinexpression durch den Einfluss von Hyperthermie in Kombination mit Zytostatika und Quercetin an der Ewingsarkomzelllinie SK-ES-1**

Es werden 18 kollagenbeschichtete Kulturflaschen (100 ml) mit jeweils 1 Millionen SKES-Zellen ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden beginnt die Vorbehandlung: Der einen Hälfte der Flaschen wird Quercetin in unterschiedlichen Dosen zugesetzt, die andere bleibt unberührt. Nach Vorbehandlung der Tumorzelllinie für 1 Stunde bei 37°C bzw. 42°C im Wasserbad (mit Aufwärmphase) erfolgt 24 Stunden später die Zytostatikabehandlung mit

Endkonzentrationen von 20 µg VP16/ml und 0,5 µg Cisplatin/ml. Die Einwirkzeit beträgt wiederum 1 Stunde bei den Temperaturen 37 °C, 43° C und 45 °C. Anschließend wird das Medium vollständig abgesaugt und 8 ml frisches Nährmedium hinzugegeben. Nach Auswertung der Kinetikversuche über den zeitlichen Verlauf der Hitzeschockexpression wird eine Inkubationszeit von 18 Stunden festgelegt. Danach können die Zellen mit 0,02 % EDTA/0,05 % Trypsin abgelöst, mit PBS gewaschen und in 100 µl PBS plus 14 µl Proteasen-Inhibitor-Cocktail eingefroren werden. Es empfiehlt sich, die Zellsuspensionen in vier Reaktionsgefäße á 25 µl zu portionieren, da die Proben später mehrfach untersucht werden.

### **3.7.3. Proteinbestimmung nach Bradford**

Um eine signifikante Aussage über die Relation der Hitzeschockproteinexpression zur Nullkontrolle zu erhalten, müssen die Proteinsuspensionen in gleicher Konzentration aufgetragen werden. Dazu wird die Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (72): Die vorbereiteten Proben werden auf Eis aufgetaut und mit gleichem Volumen Laemmli-Puffer (2fach konzentriert, hier 25 µl) zur Lyse der Zellen und Denaturierung der Proteine versetzt, bei 95 °C 10 Minuten im Wasserbad erhitzt, anschließend auf dem Vortex durchgemischt.

Für die Bio-Rad-Proteinbestimmung ist eine Mikrotiterplatte vorzubereiten, deren Vertiefungen mit 200 µl PBS gefüllt werden. In die Vertiefungen kommt dann nach festgelegter Anordnung 5 µl der zu bestimmenden Probe, wobei eine Mehrfachauftragung konstantere Mittelwerte ergibt.

Einmalig muss auch eine Standardproteinkonzentration (Biorad) in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen werden, aus der sich eine Eichgerade erstellen lässt. Anhand der im ELISA-Reader gemessenen Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm und der durch die Eichgerade festgelegten Werte kann für jede Probe die Proteinkonzentration bestimmt werden.

## **3.8. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970)**

### **3.8.1. Prinzip der SDS-PAGE (73)**

Mit der Polyacrylamidgelelektrophorese können Nukleinsäuren oder Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dabei wandern die zu untersuchenden Moleküle in

einem elektrischen Feld durch eine Gelmatrix (Trenngel), gebildet von einem Gemisch aus Acrylamid und Bisacrylamid. Acrylamid bildet in Anwesenheit freier Radikale in einer Kettenreaktion lange Polymere, Bisacrylamid dient dazu, diese Polymere zu vernetzen. Als Katalysator wird TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin), als Radikalbildner APS (Ammoniumperoxodisulfat) eingesetzt. Das anionische Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) bindet an die durch Hitzebehandlung denaturierten und in ihre Untereinheiten zerfallenen Proteine. Die Zahl der angelagerten SDS-Moleküle ist proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide, so dass im elektrischen Feld eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht möglich ist. Die Ladung der Aminosäurereste des Polypeptides braucht aufgrund der starken negativen Ladung der SDS-Moleküle nicht berücksichtigt werden. Um eine schärfere Bandentrennung zu erreichen, wird über das Trenngel ein Sammelgel gegossen. Die Matrix im Sammelgel besitzt größere Poren und einen anderen pH-Wert als das Trenngel. Darin wandern die Proteine schnell und ohne eine Auftrennung als scharfe Bande in einem Gebiet hoher Feldstärke. Mit Erreichen der Grenzfläche zum Trenngel wird ihre Geschwindigkeit drastisch und nun abhängig von der Größe verringert.

Die Molekulargewichtsbestimmung der Polypeptide erfolgt durch Vergleich der Laufstrecke mit der bekannter Proteine (Marker). Als Standardproteincocktail wird „High Molecular Weight Standard Mixture for SDS Electrophoresis“ (Sigma) mit folgenden Proteinen eingesetzt:

Myosin, Rabbit Muscle	205.000 kDa
β-Galactosidase, E. coli	116.000 kDa
Phosphorylase b, Rabbit Muscle	97.400 kDa
Albumin, Bovine	66.000 kDa
Albumin, Egg	45.000 kDa
Carbonic Anhydrase, Bovine Erythrocytes	29.000 kDa

### 3.8.2. Durchführung der SDS-PAGE

Um vier 10%ige SDS-Polyacrylamidgele mit einer Dicke von 1 mm für die Elektrophorese zu gießen, werden 60 ml Trenngel und 10 ml Sammelgel benötigt (Tab.: 3.3.). Nach folgender Reihenfolge und Konzentrationen werden die Lösungen gemischt:



Tabelle 3.3.: Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels zur Trennung von Nukleinsäuren oder Proteinen

	Trenngel (10%)	Sammelgel (2,5%)
Acrylamidstammlösung 30 % (2 - 8°C)	20 ml	1,34 ml
1,5 M TrisCl pH 8,8	15 ml	
0,5 M TrisCl pH 6,8		2,5 ml
10 % SDS-Lösung	600 µl	100µl
<b>Bidest. H<sub>2</sub>O</b>	24,2 ml	6 ml
10 % APS-Lösung (2 - 8°C)	300 µl	50 µl
TEMED	20 µl	5 µl
Gesamt	60 ml	10 ml

APS-Lösung und TEMED starten die Polymerisation, d. h. beide Lösungen dürfen erst kurz bevor das Gel gegossen wird, zugegeben werden

Mit einer 1000 µl-Pipette wird das Trenngel bis 2 cm Unterkante im Gel-Caster eingefüllt. Über einen kleinen gemeinsamen Kanal füllen sich alle Gelkammern auf das gleiche Niveau. Auf das Trenngel wird in jede Kammer ca. 100 µl Butanol pipettiert, welches für eine gerade Abschlußkante sorgt und Luftblasen auflöst. Nach etwa einer halben Stunde ist das erste Gel polymerisiert und das Butanol kann abgegossen werden.

Nun muss das Sammelgel bis zur Oberkante eingefüllt werden. Wichtig ist bei beiden Einfüllvorgängen, dass die Pipettenspitze immer gegen die Glasplatte zeigt, da sonst die Lösungen in die Zwischenräume laufen. Wenn die Gelkammern randvoll sind, wird jeweils ein 10er-Kamm in das Sammelgel gedrückt. Dieser formt sogenannte Taschen ins Gel, in die die Proteinsuspensionen pipettiert werden.

Nachdem auch diese Lösung polymerisiert ist, können die Gele sofort verwendet werden oder bei 2 - 8°C luftdicht bis zu einer Woche aufbewahrt werden.

Für die Elektrophorese werden die 2 Gelplatten in die Elektrophoresebox gesteckt, befestigt und die Kämme herausgezogen. Sowohl vor, als auch hinter die Gele wird die Pufferlösung gegossen. Die einzelnen Geltaschen müssen dabei mit Pufferlösung gefüllt sein.

In die linke Geltasche werden 10 µl der Standardproteinbandenlösung pipettiert, die sechs Proteine mit definiertem Molekulargewicht zwischen 29.000 und 205.000 kDa enthält.

In die übrigen Geltaschen wird genau soviel Probe eingefüllt, dass eine festgelegte Proteinmenge in jeder Tasche enthalten ist (z.B. 10 µg). Maximale Füllmenge sind 20 µl.

Bei einem Gel werden 20 mA eingestellt, bei zwei Gelen 40 mA. Wenn sich die sichtbare Bromphenolblaulinie der Unterkante des Gels nähert, ist die Elektrophorese beendet. Dieser Vorgang dauert erfahrungsgemäß 1 Stunde und 20 Minuten, kann durch eine Variation der Amperezahl jedoch beliebig verlängert oder verkürzt werden. Grundsätzlich gilt, je länger die Laufzeit der Proteine, desto präziser die Bandenaufftrennung.

Nach Entnahme der Gelplatten aus der Elektrophoresebox sollte der Western-Blot sofort im Anschluss durchgeführt werden.

### **3.9. Western-Blot**

Mit einem Western-Blot, auch Immunoblot genannt, werden die im Acrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Blottingmembran (Nitrocellulose oder PVDF) übertragen (Towbin, H. et al., 1979) (74). Die gesuchten Proteinbanden können durch spezifische Antikörperbindungen sichtbar gemacht werden. Hierzu wird die Membran zuerst mit einem Antikörper gegen das Protein von Interesse inkubiert und in einem weiteren Schritt mit einem sekundären Antikörper (AK II) gegen das IgG des primären Antikörper (AK I). Der AK II ist mit einem Enzym gekoppelt. In unserem Fall handelt es sich um Alkalische Phosphatase (AP), die bei Zugabe des entsprechenden Substrates (BCIP/NBT) eine Farbreaktion katalysiert. Diese wird hier als blauvioletter Pigmentniederschlag auf der Membran sichtbar. Als Primärantikörper sind sowohl monoklonale, als auch polyklonale Antikörper geeignet. Der monoklonale Antikörper wird homogen und monospezifisch gebildet und bindet somit ausschließlich ein spezifisches Epitop des gesuchten Proteins. Dagegen richtet sich der polyklonale Antikörper gegen verschiedene antigene Determinanten des selektionierten Proteins, was einerseits die Sensitivität erhöht, andererseits aber eine verstärkte Hintergrundstreuung auf der Blotting-Membran hinterlässt (75).

#### **3.9.1. Vorbereitung des Western-Blots**

Es werden jeweils 12 Filterpapiere in der Größe eines Gels (ca. 8 x 9 cm) für jede zu blottende Membran zugeschnitten. Gleiches gilt für die PVDF-Membran, auf die die Proteine geblottet werden. Diese Membran darf nur mit semisterilen Handschuhen berührt werden, da

sie sonst der Hautoberfläche anhängende Proteine aufnimmt, die wiederum zu Ergebnisverfälschungen führen.

Des weiteren werden 3 Petrischalen mit a) Kathodenpuffer, b) Anodenpuffer und c) Methanol vorbereitet. Die Kathoden- und die Anodenplatte müssen mit H<sub>2</sub>O bidest. befeuchtet sein.

### 3.9.2. Durchführung des Western-Blots

Auf die Anodenplatte werden 6 mit Anodenpuffer getränkte Filterpapiere gelegt. Die vorbereitete PVDF-Membran wird in den oberen Ecken mit Bleistift nummeriert. Anschließend wird die Membran in Methanol aktiviert, in Anodenpuffer gewaschen und mit der glatten Seite nach oben auf die sechs Filterpapiere aufgelegt. Nun wird das Gel freigelegt und das Sammelgel mit einem Skalpell abgetrennt. Das Gel ist mit befeuchteten Handschuhen anzufassen, da es sonst reißen kann. Vorsichtig wird es auf die PVDF-Membran gelegt. Dabei sollte sehr präzise gearbeitet werden, da ein ungenaues Auflegen oder Luftblasen zwischen den Oberflächen das Ergebnis stark beeinträchtigen.

Zudem dürfen keine Luftblasen zwischen den verschiedenen Materialien eingeschlossen sein, da dann eine korrekte Übertragung der Proteinbanden nicht mehr möglich ist. Zuletzt werden 6 Filterpapiere in Kathodenpuffer getränkt und aufgelegt.

Die angefeuchtete Kathodenplatte beendet die Schichtung der einzelnen Bestandteile. In der Abbildung 3.2 ist die Reihenfolge der einzelnen Schichten für den Western-Blot dargestellt. Anschließend werden die Anoden- und die Kathodenplatte an den Verstärker angeschlossen. Zur Wahl der optimalen Stromstärke für den Western-Blot wird folgende Formel angewendet:

$$\text{Quadratzentimeter einer Membran} \times \text{Anzahl der Membranen} \times 0,8 = \text{mA}$$

Im vorliegenden Testansatz beträgt der Zeitraum für den Blot 1 Stunde.

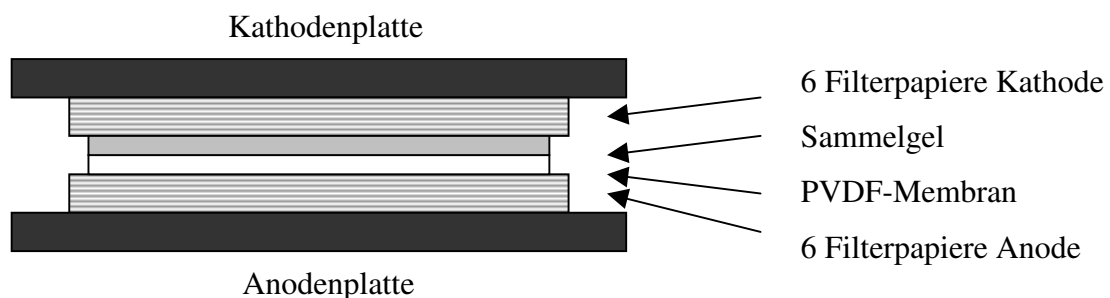


Abb.3.2: Schema des Aufbaus eines Blots

### **3.9.3. Standardisierung des Western-Blots zur Bestimmung von intrazellulären HSP-70- und HSP-27-Konzentrationen**

Nach dem Proteintransfer wird die Standardbande links abgeschnitten, in Ponceau-S-Lösung (Biorad) für mehrere Stunden angefärbt, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und getrocknet. Die Membran mit den aufgeblotteten Proteinbanden der Proben wird zur Absättigung für 1 Stunde in 20 ml 3% BSA/TBS gelegt, um unspezifische Antikörperreaktionen zu verhindern.

Danach erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper für mindestens 1 Stunde. Um Antigen-Antikörperbindung zu erzielen, hat es sich als günstig erwiesen, eine Inkubation über mehrere Stunden bei Raumtemperatur auf dem Rüttler durchzuführen. Es ist der monoclonale „(Mouse)AntiHSP 27 (IgG<sub>1</sub>)“ (Dianova) in der Konzentration 1:1000 und der polyclonale Antikörper „Rabbit AntiHSP 70 Peptide“ (StressGen) ebenfalls 1:1000 verwendet worden. Beide Antikörper werden in 20 ml TBS-Lösung (TrisBuffered Saline) pipettiert, in der 0,3% BSA (Bovine Albumine Serum) gelöst sind. Anschließend muss die Membran 3 mal 10 Minuten in TBS-Lösung gewaschen werden, damit sich kein freier AK I mehr an der Membran befindet. Als Sekundärantikörper ist gegen AntiHSP 27 ein „Anti-Mouse IgG“ und gegen AntiHSP 70 ein „Anti-Rabbit IgG“ benutzt worden. Ersterer wird in einer Konzentration 1:10.000 in 0,3% BSA/TBS gelöst, letzterer 1:30.000. Beide Sekundärantikörper sind mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt. Nach einstündiger Inkubationszeit wird die Membran erneut 3 mal 10 Minuten in TBS-Lösung gewaschen.

Zur Darstellung der Antikörperkomplexe katalysiert die angekoppelte AP Substratplatte mit BCIP/NBT (Sigma). Die Substratplatte wird in 10 ml H<sub>2</sub>O bidest. gelöst und auf die feuchte Membran gegossen. Innerhalb von Minuten entwickeln sich die markierten HSP-Banden. Die Membran sollte dann mit H<sub>2</sub>O bidest. gespült und zum Trocknen auf Papiertücher gelegt werden.

Die Stärke der dargestellten Banden korreliert mit der Menge der Hitzeschockproteine.

Tab.: 3.4. Versuchsprotokoll zur Untersuchung der zytotoxischen Einflüsse und Modulation der HSP-Expression an den humanen Ewingsarkomzelllinien SK-ES-1 und RD-ES durch die Applikation von Etoposid, Cisplatin, Quercetin ± Hyperthermie

Zelllinie	Testverfahren	Versuchsbedingungen	Wirkstoff
SK-ES-1 RD-ES	XTT-Test	Vorbehandlung 37°C und Vorbehandlung 42°C, 1 h; nach 24 h Chemo, 1 h: 37°C, 42°C, 45°C; nach 72 h XTT-Zugabe	Etoposid (20 µg/ml) Cisplatin (0,5 µg/ml)
SK-ES-1 RD-ES	XTT-Test	Quercetin 37°C und Quercetin 42°C, 1 h; nach 24 h Chemo, 1 h: 37°C, 42°C, 45°C; nach 72 h XTT-Zugabe	Etoposid (20 µg/ml) Cisplatin (0,5 µg/ml) Quercetin (0,4/2/10/50/250 µM)
SK-ES-1	Western-Blot HSP27 + HSP70	Vorbehandlung 43°C, 1 h; nach 0, 3, 6, 12, 24, 48 h: Einfrieren je einer Zellprobe mit Nullkontrolle Messung der HSP-Expression: HSP27, 70, 90	
SK-ES-1	Western-Blot HSP27 + HSP70	Zellbehandlung: 42°C Vorbehandlung, 1 h; nach 24 h Chemo, 1 h: 37°C, 42°C, 45°C; nach 18 h einfrieren	Etoposid (20 µg/ml) Cisplatin (0,5 µg/ml)
SK-ES-1 RD-ES	XTT-Test  Western-Blot HSP27 + HSP70	Zellbehandlung: 37°/42°C Quercetin, 1 h; nach 24 h Chemo, 1 h: 37°C, 42°C, 45°C; nach 18 h einfrieren	Etoposid (20 µg/ml) Cisplatin (0,5 µg/ml) Quercetin (10/30/50 µM)

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Zellkinetische Untersuchung an den Tumorzelllinien SK-ES-1 und RD-ES zur intrazellulären Expression der Hitzeschockproteine HSP 70 und HSP 27

In Western-Blot-Analysen von Gesamtzelllysaten der Zelllinie SK-ES-1 zeigte sich, dass 3, 6, 12 und 24 Stunden nach einer 1-stündigen Hyperthermie bei 43 °C erhöhte Mengen der induzierbare Form des HSP-70 exprimiert werden, wohingegen direkt im Anschluss an einen einstündigen Hitzeschock bei 43 °C noch keine erhöhte Expression zu beobachten ist (Abb. 2a). Nach einer Zeitdauer von 24 bis 48 Stunden nimmt die HSP-70-Expression wieder ab. Ähnlich Untersuchungsergebnisse der HSP-70-Expression wurden bei der Zelllinie RD-ES gefunden (Abb. 2b): Auffällig war die Beobachtung, dass erst 6 Stunden nach Hitzeschock eine stärkere Bande im Western-Blot zu sehen und nach 48 Stunden noch keine signifikante Abnahme feststellbar war. Allerdings zeigte die Zelllinie RD-ES im Gegensatz zur Zelllinie SK-ES-1 eine stärkere HSP-70-Expression in der 37°C-Probe, so dass ein höherer Grundgehalt von HSP-70 anzunehmen ist.

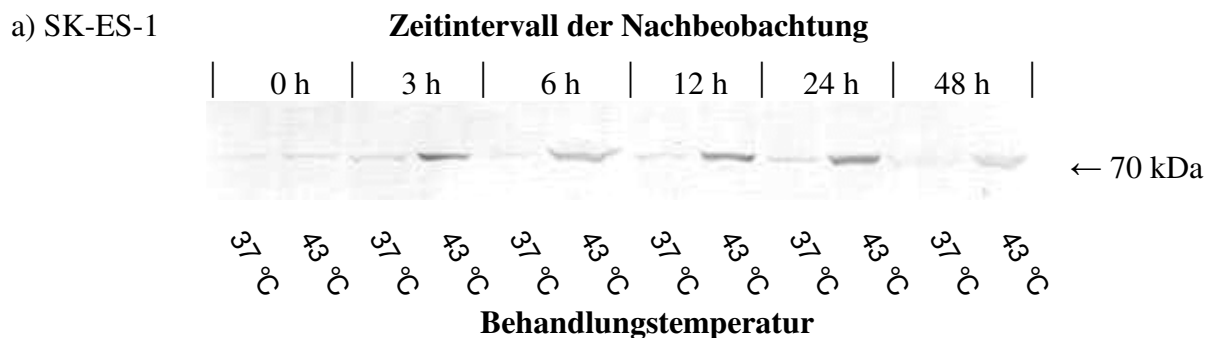


Abb. 2a: Kinetik der Induktion der HSP-70-Expression nach Behandlung der Ewingsarkom-Zelllinie SK-ES-1 für eine Stunde bei 43°C. Die Expression von HSP-70 wurde direkt nach der Hitzeschockbehandlung, nach 3 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h im Vergleich zur Kontrolle bei 37 °C untersucht.

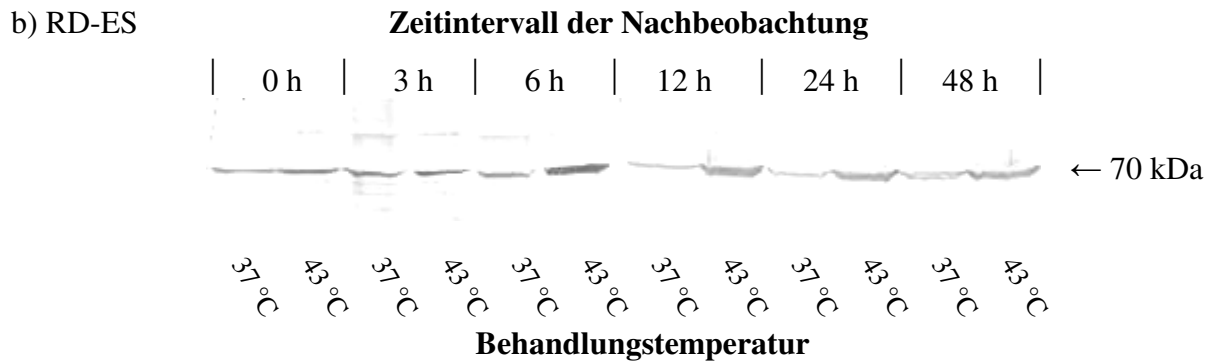


Abb. 2b: Kinetik der Induktion der HSP-70-Expression nach Behandlung der Ewingsarkom-Zelllinie RD-ES für eine Stunde bei 43°C. Die Expression von HSP-70 wurde direkt nach der Hitzeschockbehandlung, nach 3 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h im Vergleich zur Kontrolle bei 37 °C untersucht.

Während die induzierbare Form von HSP-70 in der Zelllinie SK-ES-1 nur nach Hitzeschock exprimiert wird, lässt sich für das Hitzeschockprotein 27 bereits bei 37 °C eine höhere Konzentration nachweisen. Es zeigt sich, dass während der weiteren Beobachtung keine nennenswerte Zu- oder Abnahme der HSP-27-Expression festzustellen ist (Abb. 3a). In der Zelllinie RD-ES zeigt die Darstellung des Hitzeschockprotein 27 mit der gewählten Methode in den durchgeführten Versuchen eine deutlich schwächere Expression (Abb. 3b).

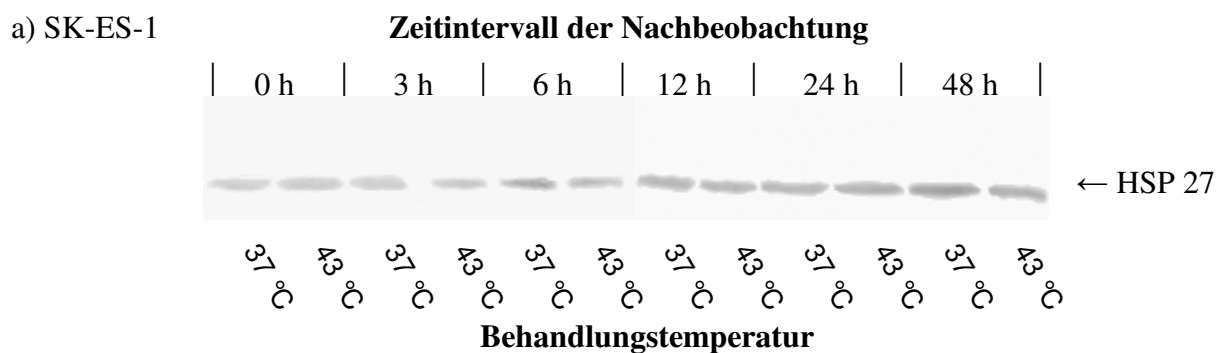


Abb. 3: Kinetik der Induktion der HSP-27-Expression nach Behandlung mit 43°C für 1 Stunde im Vergleich zur Kontrolle bei 37°C bei den Ewingsarkom-Zelllinien SK-ES (a) und RD-ES (b).

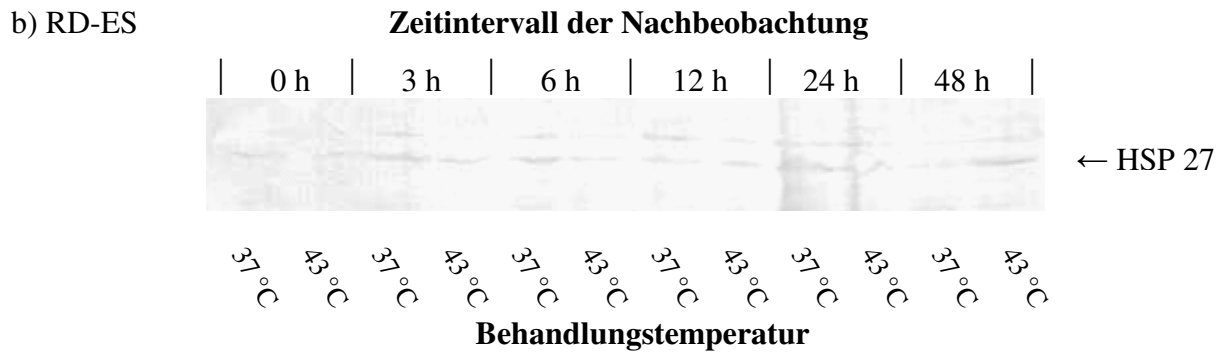


Abb. 3: Kinetik der Induktion der HSP-27-Expression nach Behandlung mit 43°C für 1 Stunde im Vergleich zur Kontrolle bei 37°C bei den Ewingsarkom-Zelllinien SK-ES (a) und RD-ES (b).

#### 4.2. Einfluss verschiedener Hyperthermiebedingungen auf die Ewingsarkomzelllinien SK-ES-1 und RD-ES

Mit dem XTT-Assay werden die Zellüberlebensraten der Tumorzelllinien SK-ES-1 und RD-ES unter verschiedenen Hyperthermiebedingungen gemessen. Dabei werden sowohl Hyperthermievorbildungen eingesetzt, als auch verschiedene Hitzeschocks bei 43 °C und 45 °C. Ohne Hyperthermievorbildung überleben 83 % (SK-ES-1) bzw. 91 % (RD-ES) einen einstündigen Hitzeschock von 43 °C (Abb. 3). Dagegen sinkt die Überlebensrate beider Zellpopulationen nach einem Hitzeschock von 45 °C auf 21 bzw. 23 %.

Werden die Zelllinien SK-ES-1 und RD-ES 24 Stunden vor einem Hitzeschock für 1 Stunde bei 42 °C behandelt, so stellt dieser Temperaturbereich für die Zellen keine letale Dosis dar. Die Ergebnisse zeigen bei einem nachfolgenden 43 °C-Hitzeschock sogar leicht erhöhte Überlebensraten. Der Vergleich der Säulen „42/37°C“ und „42/43°C“ in der Abbildung 4 belegt die Thermoresistenz nach Hyperthermievorbildung.

Betrachtet man das Wachstum beider Zelllinien nach 42 °C-Vorbildung und einem Hitzeschock von 45 °C, so ist eine deutlich höhere Überlebensrate sowohl bei SK-ES-1 als auch bei RD-ES festzustellen. Während nach alleiniger 45 °C-Behandlung nur Überlebensraten um die 20 % zu finden sind, liegen sie mit Hyperthermievorbildung mehr als doppelt so hoch: 54 % für SK-ES-1 und 48 % für RD-ES (Abbildung 4).



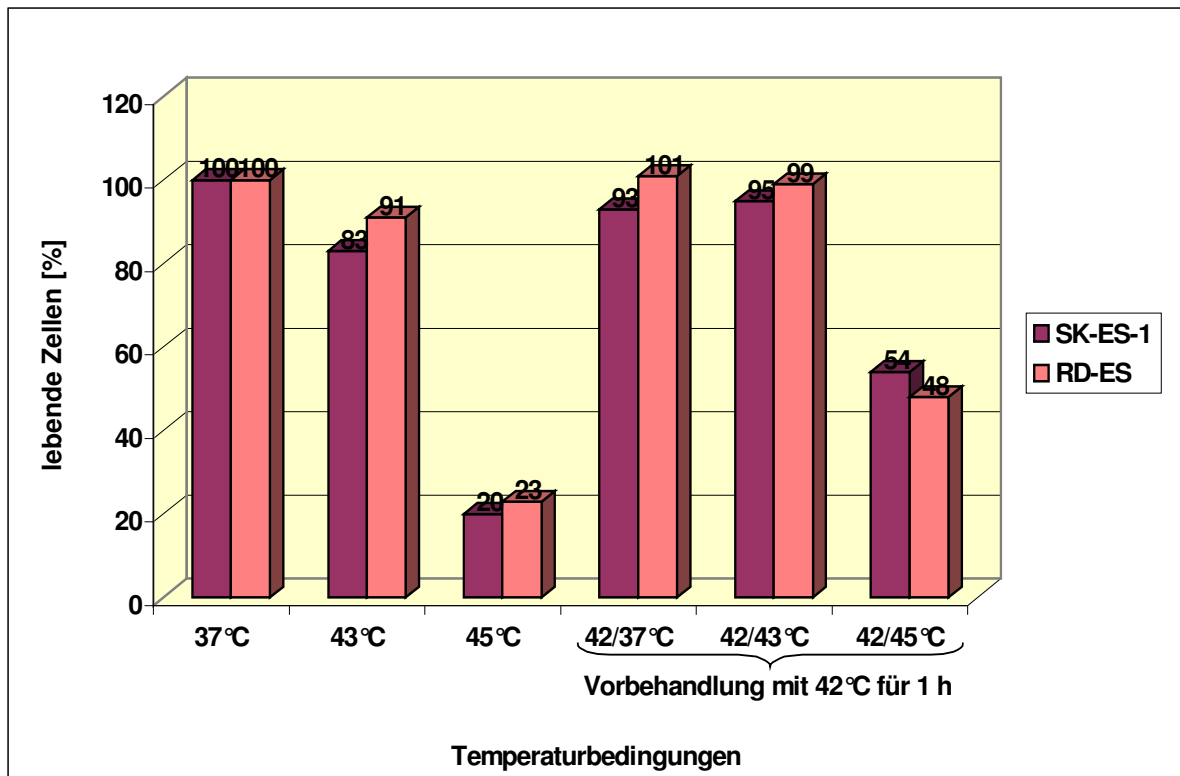


Abb. 4: Einfluss verschiedener Hyperthermiebedingungen auf das Wachstum der Tumorzelllinien SK-ES-1 und RD-ES. Die Zellen wurden mit einem Hitzeschock bei 43 °C oder 45 °C für 1 Stunde behandelt, mit und ohne Vorbehandlung von 42 °C für 1 Stunde. Die Zahl der überlebenden Zellen wurde mit Hilfe des XTT-Assays bestimmt, 72 Stunden nach der Behandlung. Die Ergebnisse sind auf die 37 °C-Kontrolle (=100%) bezogen.

Um zu überprüfen, ob die Induktion der Thermotoleranz bei den Tumorzelllinien mit Veränderungen der HSP-Expression einhergeht, werden HSP-27 und HSP-70 im Western-Blot-Verfahren (WB) untersucht (Abb. 5a und Abb. 5b). Dazu wird die Expression der Proteine 18 Stunden nach Hitzeschock gemessen. Es zeigt sich, dass die einstündige Behandlung mit 43 °C höchstens eine minimale Steigerung der bereits vorhandenen HSP-27-Expression in den SK-ES-1-Zellen auslöst. Dagegen wird HSP-27 nach einem Hitzeschock bei einer Temperatur von 45 °C fast vollständig unterdrückt. Die Zelllinie RD-ES kann in dieser Hinsicht nur eingeschränkt beurteilt werden, da das HSP-27 auch ohne Behandlung nur in sehr geringen Mengen nachweisbar ist.

Wie schon in Kapitel 4.1. geschildert, steigert ein Hitzeschock von 43 °C die HSP-70-Expression in SK-ES-1-Zellen. Ähnlich hoch liegt die HSP-70-Expression bei einem 45 °C-Hitzeschock (Abb. 5b). Für die Zelllinie RD-ES lässt sich vergleichend festhalten, dass eine

Temperatur von 43 °C eine erhöhte HSP-70-Expression induziert, im Gegensatz zu SK-ES-1 jedoch durch 45 °C anscheinend abgeschwächt wird.

Wird der Effekt der Thermotoleranz auf die HSP-27- und die HSP-70-Expression nach 1-stündiger Vorbehandlung bei 42 °C (24 Stunden zuvor) im Western-Blot untersucht, lässt sich für die Zelllinie SK-ES-1 erkennen, dass sowohl HSP-27, als auch HSP-70 nach einer Vorbehandlung und einem nachfolgenden Hitzeschock von 45 °C verstärkt exprimiert werden. Die gleiche Aussage ist für die Zelllinie RD-ES zumindest in Bezug auf HSP-70 zu treffen: Die 42 °C-Vorbehandlung steigert die HSP-Expression bei 45 °C-Hitzeschock im Vergleich zur Kontrollmessung ohne Vorbehandlung.

Bei Auswertung des Western-Blots zur HSP-27-Expression zeigen sich erst nach Vorbehandlung der RD-ES-Zellen Proteinbanden (Abb. 5a). Diese sind bei 37 °C und 43 °C analog ausgeprägt, abgeschwächt bei 45 °C. Bisher konnte das HSP-27 bei der gewählten Versuchsanordnung nicht oder nur sehr schwach nachgewiesen werden.

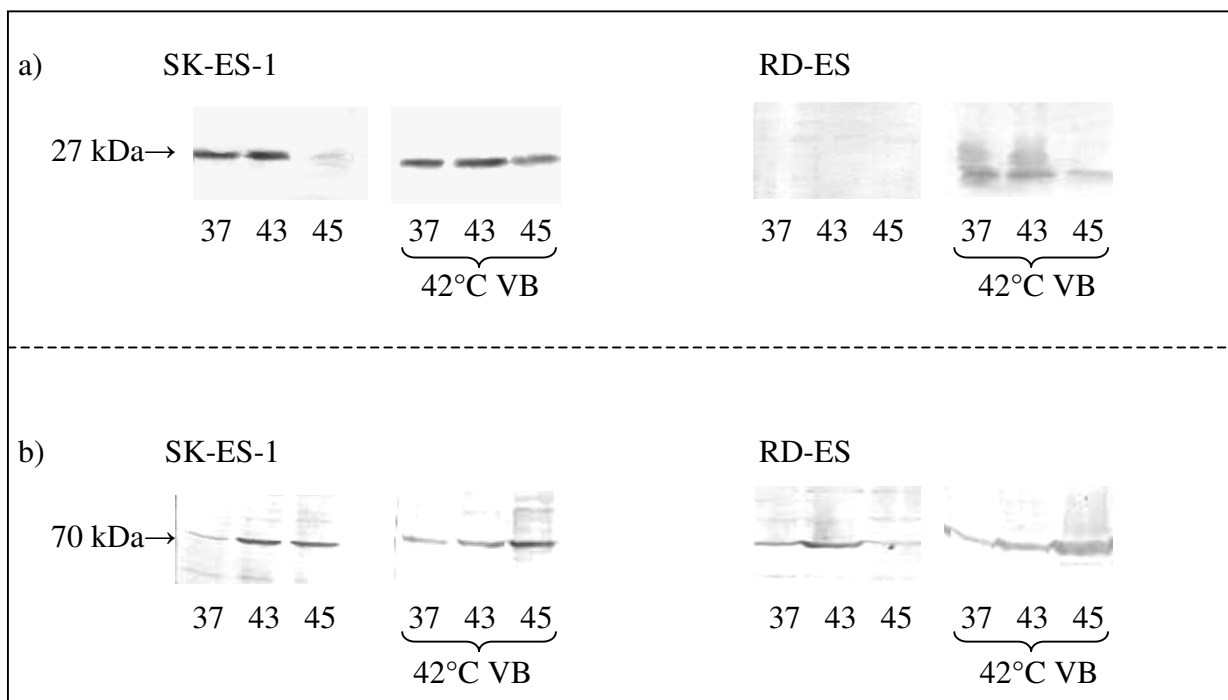


Abb. 5a und 5b: Western-Blot-Analyse der HSP-27- und HSP-70-Expression 18 Stunden nach 43°C- und 45°C-Hitzeschock und bei einstündiger Vorbehandlung (VB) mit 42 °C 24 Stunden vor dem Hitzeschock im Vergleich zur 37 °C-Kontrolle.

### **4.3. Einfluss der Zytostatika Etoposid (Vepesid®) und Cisplatin (Platinex®) auf das Wachstum der Zelllinie SK-ES-1 und RD-ES in Kombination mit Hyperthermie**

Um den Einfluss von Chemotherapie auf die HSP-Expression zu prüfen, wird Etoposid in der vorliegenden XTT-Testung in einer Konzentration von 20 µg/ml für 1 Stunde an den Zelllinien SK-ES-1 und RD-ES eingesetzt, Cisplatin in einer Konzentration von 0,5 µg/ml. Abbildung 6 zeigt, dass eine 1-stündige Behandlung mit Etoposid zu einer Reduktion der SK-ES-1-Zellzahl auf 31 % führt. Bei gleichzeitiger Gabe von Etoposid und 1-stündiger Hyperthermie (43 °C und 45 °C) ergibt die 43 °C-Behandlung vergleichbare Ergebnisse (28 %). Eine Reduktion der Zellzahl findet sich dann bei einer Behandlung mit 45 °C (16 %), wobei hier im Vergleich zur unbehandelten 45 °C-Kontrolle nicht zu erkennen ist, ob der hyperthermisch-zytotoxische oder der zytostatische Effekt den Ausschlag gibt.

Werden die Zellen mit einer Temperatur von 42 °C für 1 Stunde vorbehandelt und nach einem Zeitintervall von 24 Stunden der Kombination Zytostatikum/Hyperthermie ausgesetzt, erhöht sich die Zahl der überlebenden Zellen von 28 % auf 38 % bei 43 °C-Hitzeschock. Gleichzeitig ist jedoch der Einfluss der bereits oben beschriebenen Thermotoleranz (4.2.) in der Kontrollprobe (in der Abb. 6 jeweils die linke Säule) zu erkennen. Die Relation von Kontrolltestung und Etoposidtestung bleibt demnach in einem vergleichbaren Rahmen. Deutlich hingegen die Zunahme der überlebenden Zellen bei 45 °C-Hitzeschock. Sowohl die Kontrolle ohne Zytostatikum, als auch die zytostatisch-behandelten Zellen weisen eine höhere Resistenz gegen die Effekte auf (54 % bzw. 25 %).

Im Gegensatz zu Etoposid lässt sich die Wirkung von Cisplatin durch eine gleichzeitige Hyperthermie auf 43 °C deutlich verstärken. Während der einstündigen Chemotherapiebehandlung bei 37 °C sinkt die Fraktion der überlebenden SK-ES-1-Zellen auf 68 %. Nur 39 % der Tumorzellen überleben die gleichzeitige Applikation von Cisplatin und einem Hitzeschock von 43 °C. Wird die Tumorzelllinie SK-ES-1 24 Stunden vor der Thermochemotherapie für 1 Stunde bei einer Temperatur von 42 °C vorbehandelt, so zeigt sich nach dem Hitzeschock eine erhöhte Resistenz gegenüber Stressfaktoren (Abb. 6). Bei einer Temperatur von 43 °C ist die Überlebensrate nur leicht erhöht, bei 45 °C-Hitzeschock aber von 15 % auf 33 % überlebende Zellen mehr als verdoppelt.

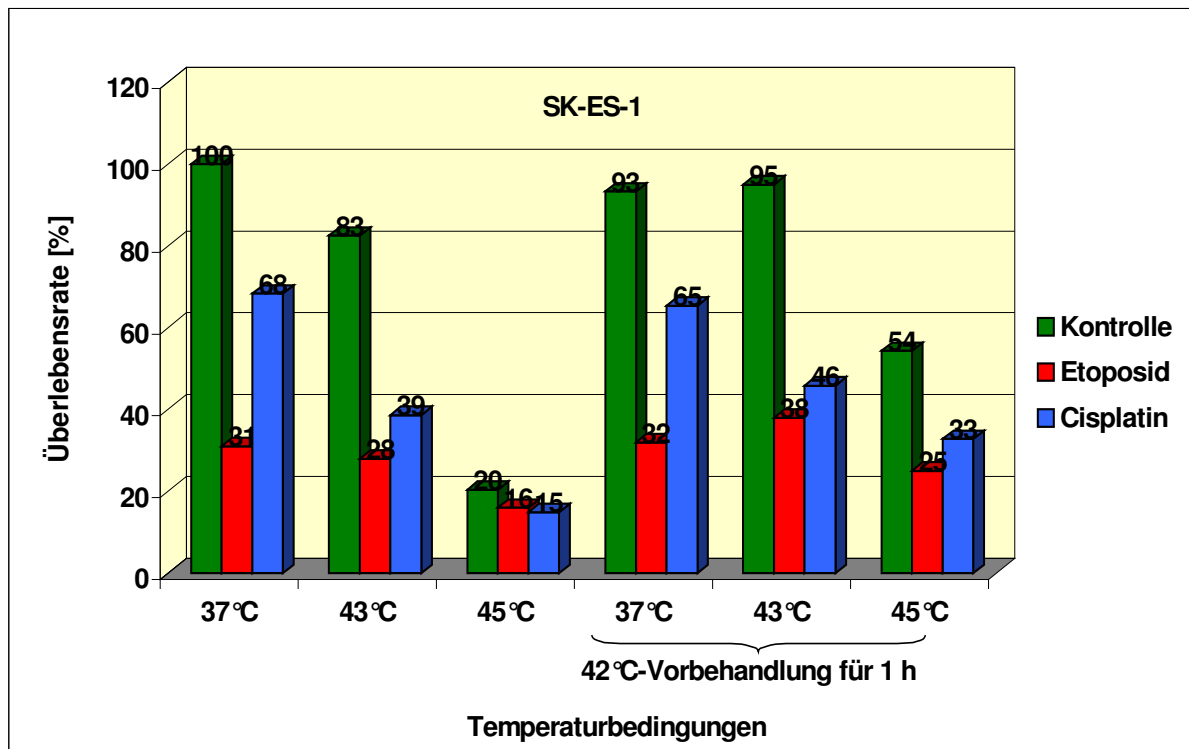


Abb. 6: Einfluss von Etoposid (20 µg/ml) und Cisplatin (0,5 µg/ml) auf das Wachstum der Ewingsarkom-Zelllinie SK-ES-1 unter verschiedenen Hyperthermiebedingungen. Die Zellen wurden mit einem Hitzeschock bei 43 °C oder 45 °C für 1 Stunde behandelt, mit und ohne Vorbehandlung von 42 °C für 1 Stunde. Die Zahl der überlebenden Zellen wurde mit Hilfe des XTT-Assays bestimmt, 72 Stunden nach der Behandlung. Die Ergebnisse sind auf die 37 °C-Kontrolle (= 100 %) bezogen.

Die Ergebnisse der Zelllinie RD-ES divergieren gegenüber denen der Zelllinie SK-ES-1 nur geringfügig. So wird in der nicht vorbehandelten 43°-Testung die zytostatische Wirkung des Etoposids durch den Hitzeschock verstärkt. Die Zellüberlebensraten liegen bei 48 % (37 °C) im Gegensatz 34 % (43 °C). Außerdem liegen die Überlebensraten der hyperthermievorbehandelten RD-ES-Zellen in der 37° C- und 43° C-Testung um durchschnittlich 10 % höher als bei SK-ES-1.

Die Wirkung von Cisplatin zeigt höhere Überlebensfraktionen für die Temperaturbedingungen 37 °C und 43 °C (Abb. 7) im Vergleich zu den Ergebnissen der Tumorzelllinie SK-ES-1 (Abb. 6). Vor allem bei den vorbehandelten Zellen ist die geringere Wirkung von Cisplatin nachweisbar. Dagegen lässt sich bei einem Hitzeschock von 45 °C kein Unterschied (ohne Vorbehandlung), oder sogar niedrigere Werte (mit Vorbehandlung) feststellen.

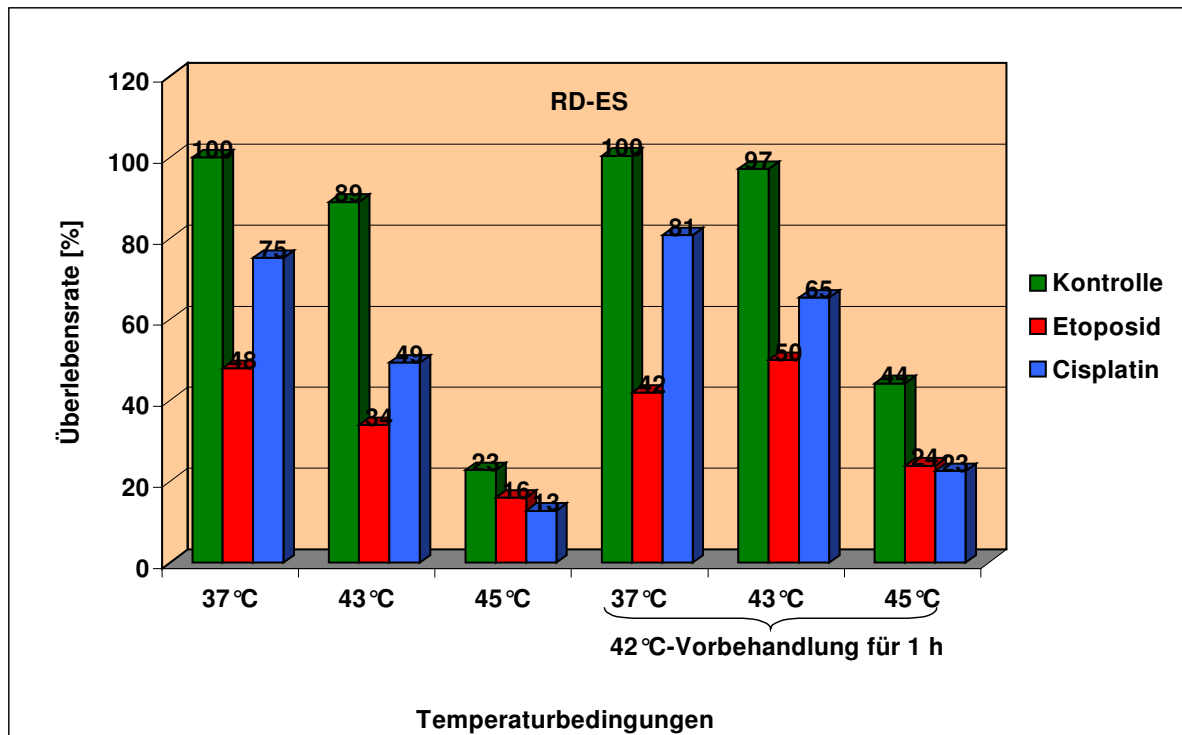


Abb. 7: Einfluss von Etoposid (20 µg/ml) und Cisplatin (0,5 µg/ml) auf das Wachstum der Ewingsarkom-Zelllinie RD-ES unter verschiedenen Hyperthermiebedingungen. Die Zellen wurden mit einem Hitzeschock bei 43 °C oder 45 °C für 1 Stunde behandelt, mit und ohne Vorbehandlung von 42 °C für 1 Stunde. Die Zahl der überlebenden Zellen wurde mit Hilfe des XTT-Assays bestimmt, 72 Stunden nach der Behandlung. Die Ergebnisse sind auf die 37 °C-Kontrolle (= 100 %) bezogen.

#### 4.4. Western-Blot-Analyse zur intrazellulären Expression der Hitzeschockproteine HSP 27 und HSP 70 nach Einwirkung von Etoposid (Vepesid®) und Cisplatin (Platinex®) bei verschiedenen Hyperthermiebedingungen

##### 4.4.1. HSP-27 und HSP-70-Expression für die Zelllinie SK-ES-1

Der Vergleich der HSP-Expression im Western-Blot lässt für die Zelllinie SK-ES-1 erkennen, dass durch Etoposid bei optimaler Zelltemperatur von 37 °C das HSP-27 leicht unterdrückt wird (Abb. 8a). Werden die Zellen jedoch einer 1-stündigen 42 °C-Hyperthermiebehandlung 24 Stunden zuvor ausgesetzt, ergibt sich keine wesentliche Änderung der Proteinbandendarstellung. Cisplatin scheint in Kombination mit einer Hyperthermie-Vorbehandlung auf das HSP-27 einen anderen Einfluss zu nehmen. Während ohne die 42 °C-

Vorbehandlung ähnliche Ergebnisse festzustellen sind, zeigt die intrazelluläre HSP-27-Expression der vorbehandelten SK-ES-1-Zellen bei einem 45 °C-Hitzeschock nicht die zu erwartende Thermotoleranz. Das Level der exprimierten HSP-27 ist geringer als in den vergleichbaren Zelllysaten, die ohne Zytostatika oder mit Etoposid behandelt wurde.

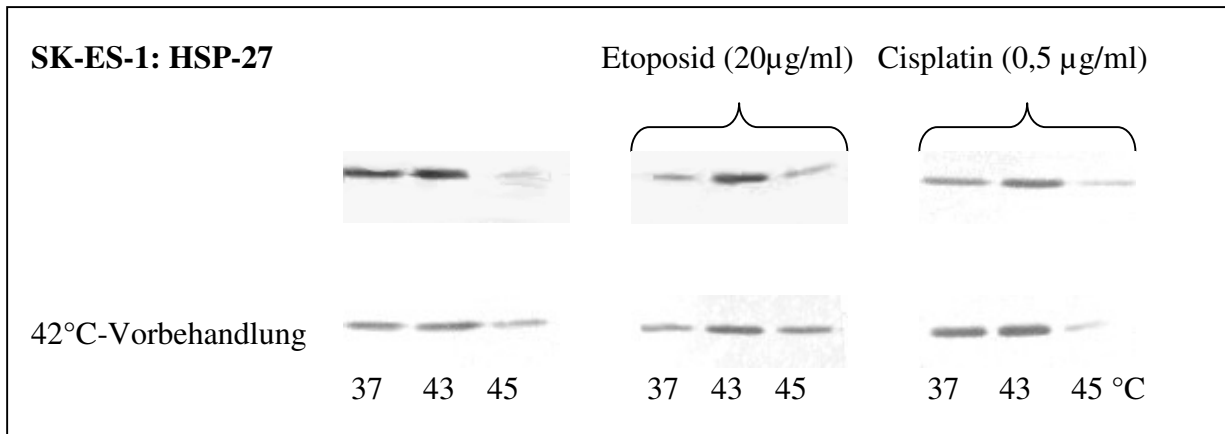


Abb. 8a: Western-Blot-Analyse der Wirkung von Etoposid (20 µg/ml) und Cisplatin (0,5 µg/ml) unter verschiedenen Hyperthermiebedingungen auf die HSP-27-Expression der Zelllinie SK-ES-1. Die Zellen wurden gleichzeitig mit dem jeweiligen Zytostatikum und einem Hitzeschock von 43 °C bzw. 45 °C behandelt, mit und ohne 42 °C-Vorbehandlung 24 Stunden zuvor.

Im Vergleich dazu fällt bei der Beobachtung der Proteinbanden der HSP-70-Versuchsreihe im Western-Blot-Verfahren eine veränderte Wirkung des Cisplatins gegenüber den Versuchen mit Etoposid auf. Bei gleichzeitigem Einsatz von Hyperthermie (43 oder 45 °C) und Cisplatin liegt die HSP-70-Expression signifikant höher als in der Etoposid-Testreihe. Letztere zeigt eher eine minimale Zunahme gegenüber der Nullkontrolle bei 37 °C und eine Abnahme bei 45 °C-Hitzeschock. Es fällt zudem auf, dass die Proteinbandendarstellung in der Cisplatin-Testreihe äquivalent zur 37°C-Kontrolle ist.

Nach einstündiger 42 °C-Vorbehandlung, ergeben sich für alle drei Testreihen sehr ähnliche Ergebnisse. Anscheinend spielt dabei keine Rolle, ob Zytostatikum eingesetzt wird oder nicht. Bei 37 °C kommt eine vergleichsweise mittelgradige Proteinbandendarstellung zur Ausprägung. Sowohl bei 43 °C als auch bei 45 °C nimmt die Expression der HSP-70-Banden zu. Auffällig ist hier vor allem, dass der zuvor aufgetretene Effekt des Cisplatins nicht mehr zum Tragen kommt (Abb. 8b).

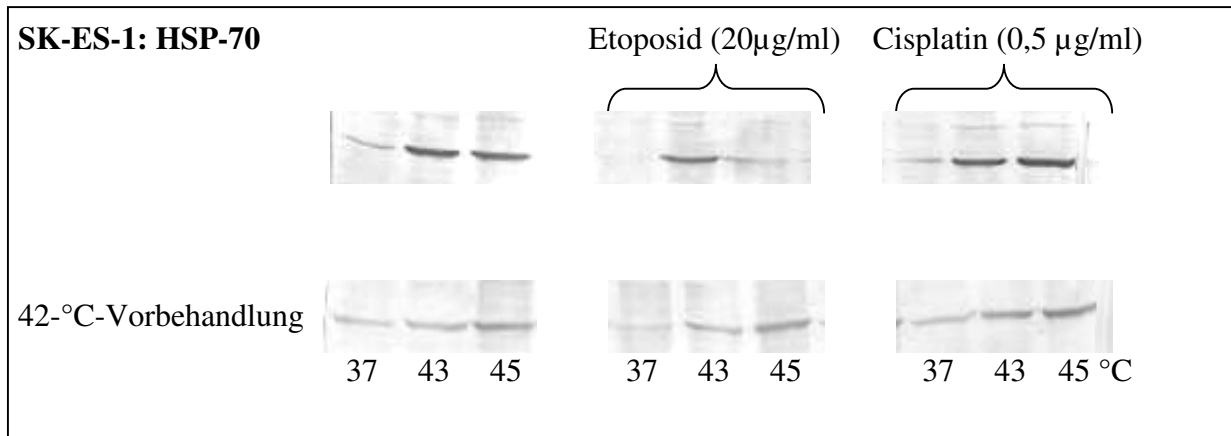


Abb. 8b: Western-Blot-Analyse der Wirkung von Etoposid (20 µg/ml) und Cisplatin (0,5 µg/ml) auf die HSP-70-Expression der Zelllinie SK-ES-1. Die Zellen sind während der 1-stündigen Zytostatikaapplikation mit einem Hitzeschock von 43 °C bzw. 45 °C behandelt worden, mit und ohne 42 °C-Vorbehandlung 24 Stunden zuvor.

#### 4.4.2. HSP-70-Expression für die Zelllinie RD-ES

Anhand der Western-Blot-Analyse sind für die Zelllinie RD-ES ebenfalls die Hitzeschockproteine HSP-27 und HSP-70 untersucht worden. Da die gewählte Methode das HSP-27 bei dieser Zelllinie nicht ausreichend darstellt (siehe 4.1. und 4.2.), wird im folgenden nur das Verhalten von HSP-70 dargestellt (Abb. 9). Im Kontrast zu SK-ES-1-Zellen kann bei der Cisplatinapplikation keine veränderte Expression aufgezeichnet werden. Auch Etoposid nimmt kaum Einfluss auf das Hitzeschockprotein, vielleicht eine minimale Zunahme der Proteinbande bei 45 °C-Hitzeschock. Identische Ergebnisse zeigen sich vor allem bei einem Hitzeschock von 43 °C in allen drei Testreihen. Die 42 °C-Vorbehandlung hat keinen Einfluss auf die Bandendarstellung zum Nachweis von HSP-70. Wie schon unter 4.2. beschrieben, steigert die Hyperthermievorbehandlung die HSP-Expression der RD-ES-Zellen bei einem Hitzeschock von 45 °C und die Zytostatika nehmen in diesem Fall in der gewählten Konzentration keinen Einfluss darauf.

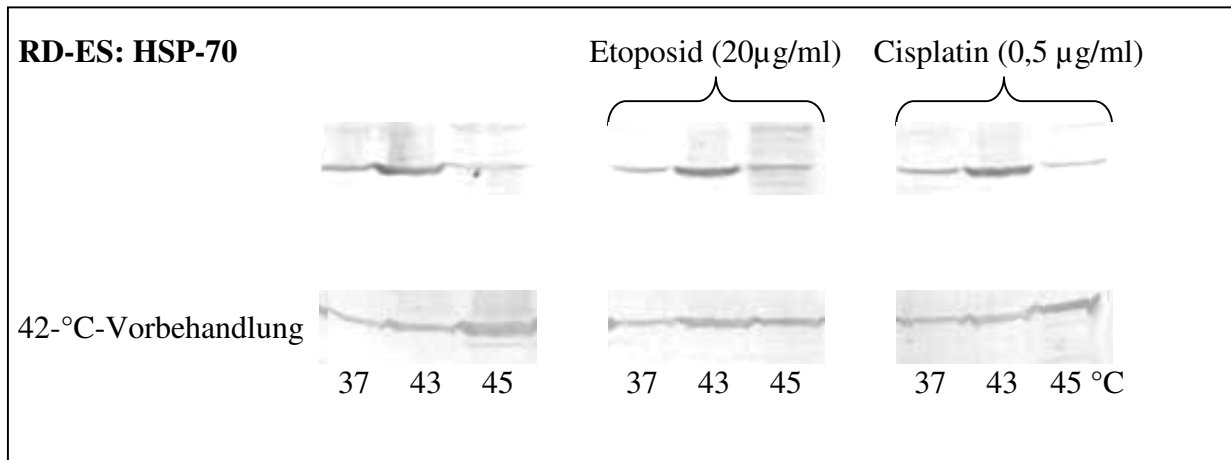


Abb. 9: Western-Blot-Analyse der Wirkung von Etoposid (20 µg/ml) und Cisplatin (0,5 µg/ml) auf die HSP-70-Expression der Zelllinie RD-ES. Die Zellen sind während der 1-stündigen Zytostatikaapplikation mit einem Hitzeschock von 43 °C bzw. 45 °C behandelt worden, mit und ohne 42 °C-Vorbehandlung 24 Stunden zuvor.

#### 4.5. Einfluss des Flavonoids Quercetin auf das Wachstum der Tumorzelllinien SK-ES-1 und RD-ES unter verschiedenen Hyperthermiebedingungen

##### 4.5.1. Messung der Zellüberlebensraten im XTT-Assay

Quercetin wird in verschiedenen Konzentrationen an den Zelllinien SK-ES-1 und RD-ES getestet (Abb. 10a). SK-ES-1 zeigt bis zu einer Konzentration von 10 µM Quercetin keine vermehrte Zytotoxizitätseinwirkungen im XTT-Test. Ohne Einfluss ist dabei der gewählte Temperaturbereich von 43 °C im Vergleich zur 37 °C-Kontrolle. Auch eine einstündige 42 °C-Vorbehandlung 24 Stunden zuvor hat bis zu einer Konzentration von 10 µM keinen Einfluss auf die Zytotoxizität von Quercetin. Interessant dagegen das Ergebnis bei einer Konzentration von 50 µM: Während die Zellüberlebensraten bei 37 °C und 43 °C Begleittemperatur bei 68 bzw. 69 % liegen, drückt die 42 °C-Vorbehandlung die Überlebensfraktion auf 41 bzw. 39 %. Eine Konzentration von 250 µM Quercetin hat in jedem Fall eine zytotoxische Wirkung auf die Tumorzellen. Die gemessenen Werte liegen für alle Testreihen bei einer Überlebensfraktion von circa 10 %.



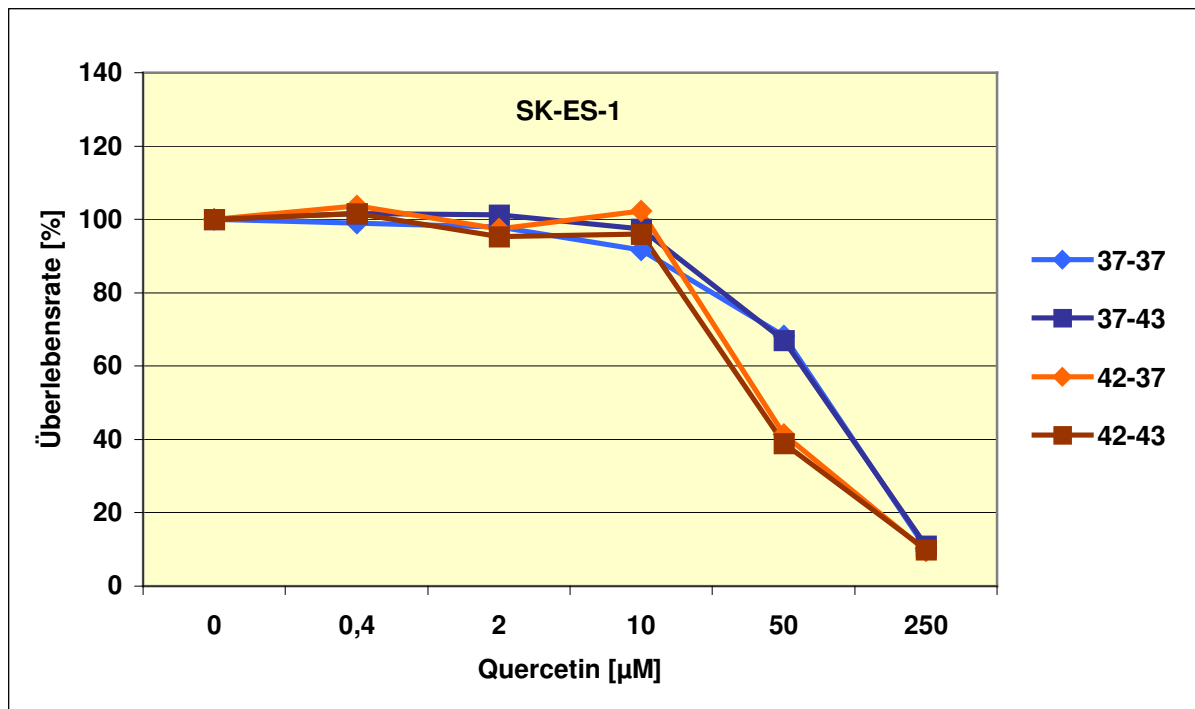


Abb. 10a: Graphische Darstellung der Wirkung von Quercetin-Konzentrationen (0,4 µM, 2 µM, 10 µM, 50 µM und 250 µM) auf die Zelllinie SK-ES-1 bei unterschiedlichen Hyperthermiebedingungen. Die Zellen wurden mit einem Hitzeschock bei 43 °C für 1 Stunde behandelt, mit und ohne Vorbehandlung 24 zuvor mit 42 °C für 1 Stunde. Die Zahl der überlebenden Zellen wurde mit Hilfe des XTT-Assays bestimmt, 72 Stunden nach der Behandlung. Die Ergebnisse sind auf die 37 °C-Kontrolle (=100%) bezogen.

Die Ergebnisse an der Tumorzelllinie RD-ES unterscheiden sich bei der Quercetin-Konzentration von 50 µM von denen der SK-ES-1-Zellen. In Abbildung 10b fällt die „37-43“-Linie bei 50 µM auf 45 % Überlebensrate. Im Gegensatz zum Verhalten der SK-ES-Zellen weisen alle Versuchsanordnungen in denen Hyperthermie eingesetzt wird, sei es in der Vorbehandlung oder bei der Chemobehandlung, einen deutlichen Einfluss auf die RD-ES-Zellen auf. Nur die Nullkontrolle (37-37) mit 87 % zeigt wenig Wirkung auf Quercetinzugaben bis 50 µM. Eine Konzentration von 250 µM bestätigt auch bei dieser Tumorzelllinie die Zytotoxizität. Alle Versuchsanordnungen führen in diesem Bereich zu einer Reduktion der Zellüberlebensraten auf 9 bzw. 10 %.

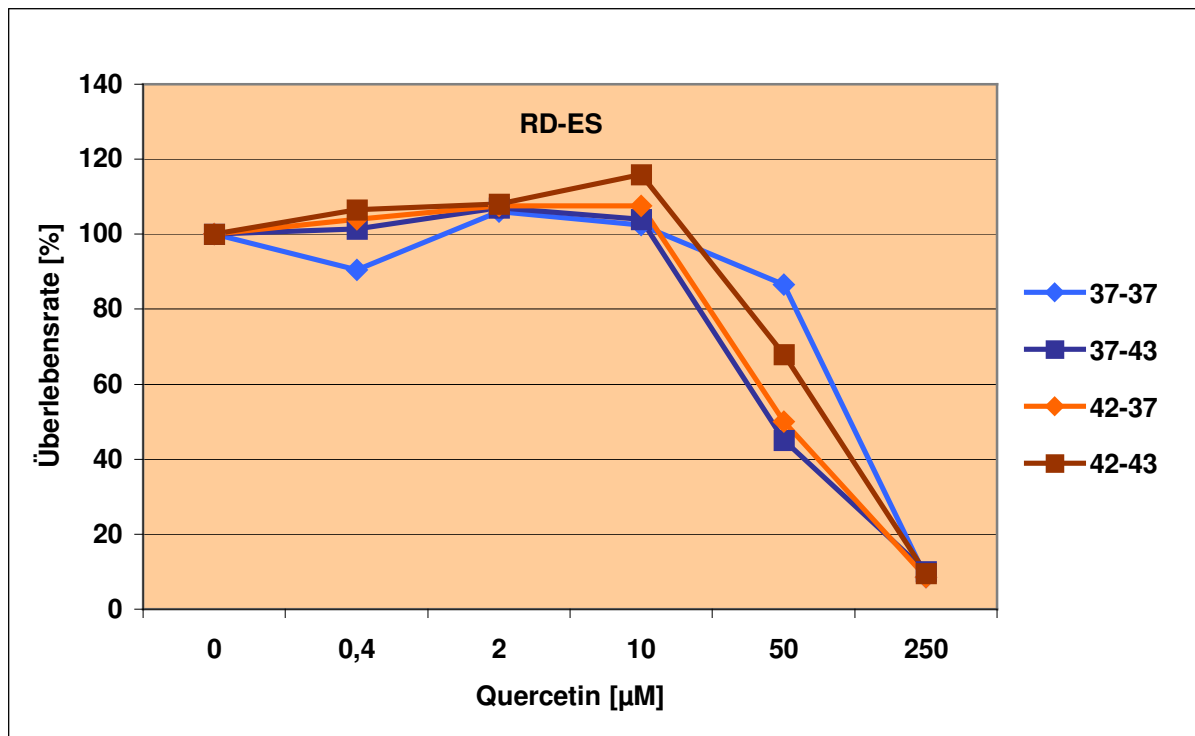


Abb. 10b: Graphische Darstellung der Wirkung von Quercetin-Konzentrationen (0,4 μM, 2 μM, 10 μM, 50 μM und 250 μM) auf die Zelllinie RD-ES bei unterschiedlichen Hyperthermiebedingungen. Die Zellen wurden mit einem Hitzeschock bei 43 °C für 1 Stunde behandelt, mit und ohne Vorbehandlung 24 zuvor mit 42 °C für 1 Stunde. Die Zahl der überlebenden Zellen wurde mit Hilfe des XTT-Assays bestimmt, 72 Stunden nach der Behandlung. Die Ergebnisse sind auf die 37 °C-Kontrolle (=100%) bezogen.

Um die Ergebnisse in dem Konzentrationsbereich von 10 μM bis 50 μM Quercetin zu präzisieren, wird die Zelllinie SK-ES-1 im XTT-Test genauer untersucht (Abb 10c). Es werden daraufhin die Konzentrationen 10 μM, 20 μM, 30 μM, 40 μM und 50 μM gewählt. Für alle 4 Testreihen bestätigt sich der Abfall der Zellüberlebensraten abhängig von der eingesetzten, zunehmenden Quercetin-Konzentration. Außerdem ist auch hier deutlich zu erkennen, dass eine Konzentration von 10 μM keinen Einfluss auf die Tumorzellen hat, mit Ausnahme der 42-43-Linie, die insgesamt einen fast linearen, abnehmenden Verlauf aufweist. Auffällig ist die Wirkung einer Konzentrationserhöhung auf 20 μM, die in der graphischen Darstellung für einen Knick in den Zellüberlebenskurven sorgt. Anschließend finden sich kaum Veränderungen bei 30 μM Quercetin, dann aber weitere Abnahme der überlebenden SK-ES-1-Zellen bei 40 bzw. 50 μM Quercetin. Letztgenannte Quercetin-Konzentration zeigt wiederum eine stärkere Wirkung auf die 42 °C-vorbehandelten Tumorzellen, es wird

allerdings deutlich, dass dies nicht für die gesamte Spanne zwischen 10 und 50  $\mu\text{M}$  Quercetin gilt.

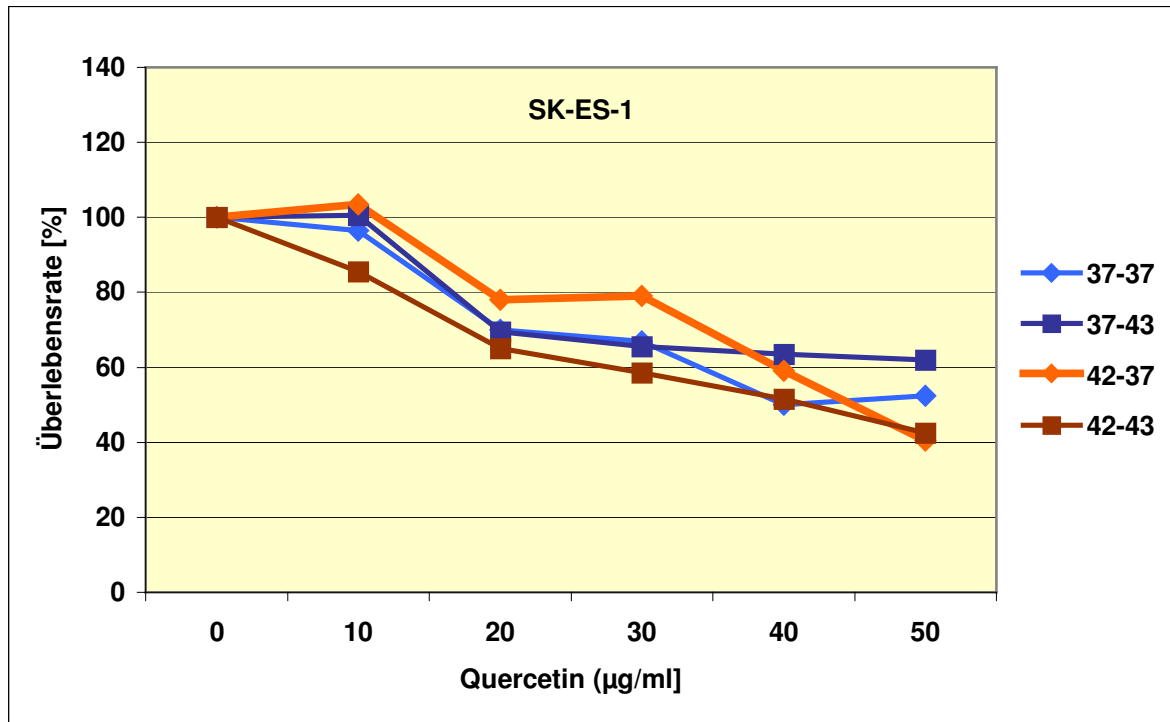


Abb. 10c: Wirkung von Quercetin-Konzentrationen (10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$ ) auf die Zelllinie SK-ES-1 bei unterschiedlichen Hyperthermiebedingungen. Die Zellen wurden mit einem Hitzeschock bei 43  $^{\circ}\text{C}$  für 1 Stunde behandelt, mit und ohne Vorbehandlung 24 zuvor mit 42  $^{\circ}\text{C}$  für 1 Stunde. Die Zahl der überlebenden Zellen wurde mit Hilfe des XTT-Assays bestimmt, 72 Stunden nach der Behandlung. Die Ergebnisse sind auf die 37  $^{\circ}\text{C}$ -Kontrolle (=100%) bezogen.

#### **4.5.2. Einfluss von Etoposid (Vepesid®) und Cisplatin (Platinex®) in Kombination mit Quercetin auf das Wachstum der Tumorzelllinie SK-ES-1 unter verschiedenen Hyperthermiebedingungen**

In der anschließenden Versuchsreihe wird das Flavonoid Quercetin im Konzentrationsbereich von 0,4  $\mu\text{M}$  bis 250  $\mu\text{M}$  an SK-ES-1 und RD-ES getestet und zudem eine zytostatischen Behandlung mit Etoposid (20  $\mu\text{g/ml}$ ) für eine Stunde durchgeführt. In Kombination mit unterschiedlichen Hyperthermiebedingungen verändern sich dabei die Wachstumsraten der Zellpopulationen:

Der Vergleich der Versuchsanordnungen in den Abbildungen 10a und 10b sowie 11a und 11b zeigt, dass sich beide durch die zusätzliche Gabe von 20  $\mu\text{g/ml}$  Etoposid unterscheiden. In beiden Darstellungen sind die Nullkontrollen gleich 100 % gesetzt. Da in den Abbildungen 11 auf diese Nullkontrolle jedoch das Zytostatikum wirkt, dürfen nicht die Absolutwerte, sondern nur die relativen Überlebensraten miteinander verglichen werden.

Bis zu einer Quercetin-Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  werden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Der zytostatische Effekt wird durch das Flavonoid nicht beeinflusst. Bei Einsatz von 50  $\mu\text{M}$  Quercetin fallen auch hier die Überlebensraten der Tumorzellen, und zwar wieder ausgeprägter mit einer Vorbehandlung von 42 °C, als ohne dergleichen (91 bzw. 77 % zu 57 bzw. 46 %). Allerdings lässt sich ein signifikanter Unterschied feststellen: Die Zellen, welche Etoposid mit einem einstündigen Hitzeschock von 43 °C erhalten, zeigen höhere Überlebensraten (quadratische Messpunkte in den Abbildungen 10 und 11). 250  $\mu\text{M}$  Quercetin erweist sich auch in dieser Versuchsreihe als zytotoxische Konzentration.

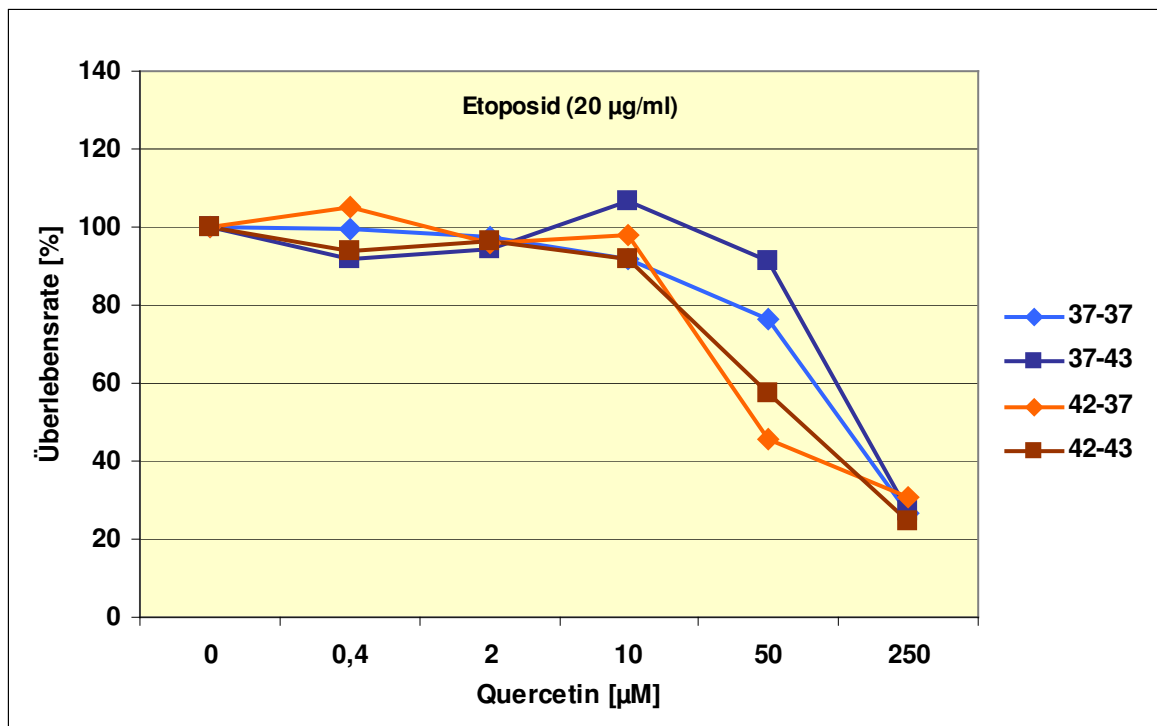


Abb. 11a: Einfluss von Etoposid (20 µg/ml) auf die Zelllinie SK-ES-1 in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen Quercetin (0,4 µM, 2 µM, 10 µM, 50 µM und 250 µM) und unterschiedlichen Hyperthermiebedingungen. Die Zellen wurden mit einem Hitzeschock bei 43 °C für 1 Stunde behandelt, mit und ohne Vorbehandlung 24 Stunden zuvor mit 42 °C für 1 Stunde. Die Zahl der überlebenden Zellen wurde mit Hilfe des XTT-Assays bestimmt, 72 Stunden nach der Behandlung. Die Ergebnisse sind auf die 37 °C-Kontrolle (=100%) bezogen.

Bei der Untersuchung der Ewing-Sarkomzelllinie RD-ES lässt sich zeigen, dass die mit 42 °C und 10 oder 50 µM Quercetin vorbehandelten Tumorzellen bei anschließender Etoposid-Gabe ein signifikant schlechteres Outcome erreichen als sämtliche Vergleichsanordnungen. Der nahezu parallele Verlauf der „Hitzeschock-Linien“ 37-43 und 42-43 legt nahe, dass ein während der Zytostatikawirkung durchgeführter Hitzeschock (43 °C) die Zellen resistenter werden lässt.

Die ohne jegliche Temperaturdifferenz angesetzte Quercetin-Etoposid-Testreihe (37-37) erzielt hohe Überlebensraten der behandelten Zellen, ist jedoch bei einer Maximalkonzentration von 250 µM Quercetin ebenso wie die übrigen Testreihen auf sehr niedrige Restpopulationen geschrumpft. Das beste Ergebnis zeigen hier die ohne Hyperthermie vorbehandelten Tumorzellen, die anschließend die Chemotherapie bei 43 °C erhalten haben (37-43 mit 43 %) (Abb. 11b).

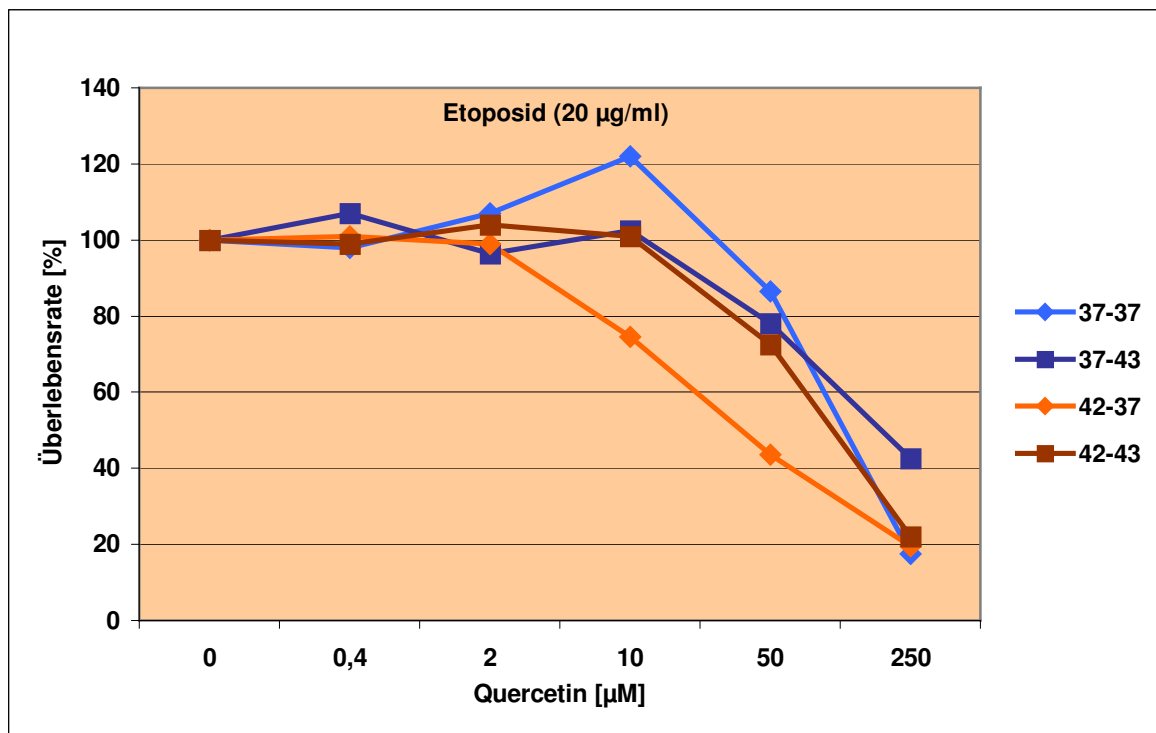


Abb. 11b: Einfluss von Etoposid (20 µg/ml) auf die Zelllinie RD-ES in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen Quercetin (0,4 µM, 2 µM, 10 µM, 50 µM und 250 µM) und unterschiedlichen Hyperthermiebedingungen. Die Zellen wurden mit einem Hitzeschock bei 43 °C für 1 Stunde behandelt, mit und ohne Vorbehandlung 24 Stunden zuvor mit 42 °C für 1 Stunde. Die Zahl der überlebenden Zellen wurde mit Hilfe des XTT-Assays bestimmt, 72 Stunden nach der Behandlung. Die Ergebnisse sind auf die 37 °C-Kontrolle (=100%) bezogen.

Der beobachtete Effekt wird auch mit dem Zytostatikum Cisplatin für beide Tumorzelllinien untersucht. Eine Konzentration von 0,5 µg/ml cDDP wird als Zytostatikagabe gewählt (Abb. 12).

Der Kurvenverlauf der einzelnen Testreihen entspricht im wesentlichen der in Abbildung 10a dargestellten Untersuchungsreihe. Bis zu einer Konzentration von 10 µM Quercetin sind die Überlebensfraktionen der SK-ES-Zellen durch den Flavonoideinsatz nicht beeinflusst. Bei 50 µM lassen die hyperthermievorbehandelten Zellen eine deutlich reduzierte Überlebensrate erkennen (32 % bzw. 40 %). Durch den Einfluss des 43 °C-Hitzeschocks (quadratische Messpunkte) resultiert eine höhere Resistenz bei den Zellen, die während der Cisplatingabe gleichzeitig Hyperthermie erhalten haben.

Für den Einsatz von Cisplatin und Quercetin auf die RD-ES-Zelllinie (Abb. 12b) ergibt sich, dass auch hier bei einer Quercetin-Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  die ohne Temperaturdifferenz behandelte Zellpopulation (in der Abbildung als Linie „37-37“ dargestellt) die höchste Resistenz aufweist (78 %). Die mit 42 °C vorbehandelten Tumorzellen (42-37-Linie) haben erneut die niedrigste Überlebensrate (47 %). Auffällig der Verlauf der Messpunkte bei der „37-43“-Linie in den niedrigen Konzentrationsbereichen. Die Überlebensraten liegen im Durchschnitt über 120 %. Cisplatin wird unter diesen Testbedingungen durch niedrige Quercetinmengen in seiner Wirkung abgeschwächt.

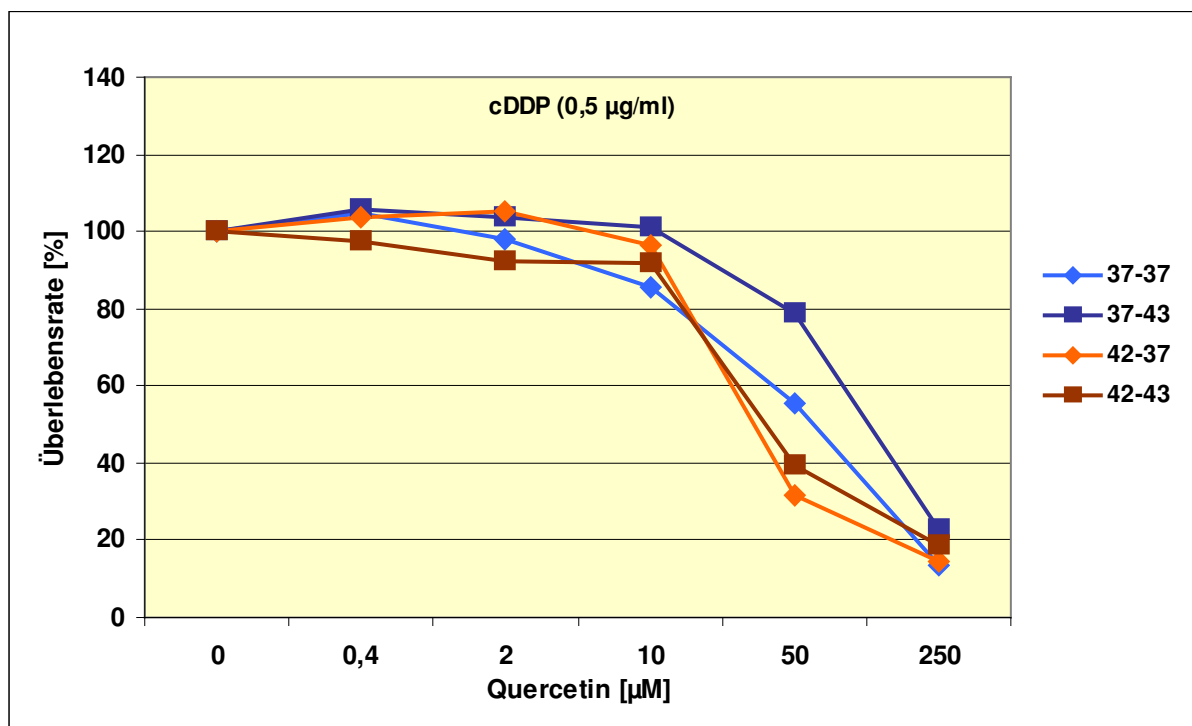


Abb. 12a: Einfluss von Cisplatin (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) auf die Zelllinie SK-ES-1 in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen Quercetin (0,4  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$ ) und unterschiedlichen Hyperthermiebedingungen. Die Zellen wurden mit einem Hitzeschock bei 43 °C für 1 Stunde behandelt, mit und ohne Vorbehandlung 24 Stunden zuvor mit 42 °C für 1 Stunde. Die Zahl der überlebenden Zellen wurde mit Hilfe des XTT-Assays bestimmt, 72 Stunden nach der Behandlung. Die Ergebnisse sind auf die 37 °C-Kontrolle (=100%) bezogen.

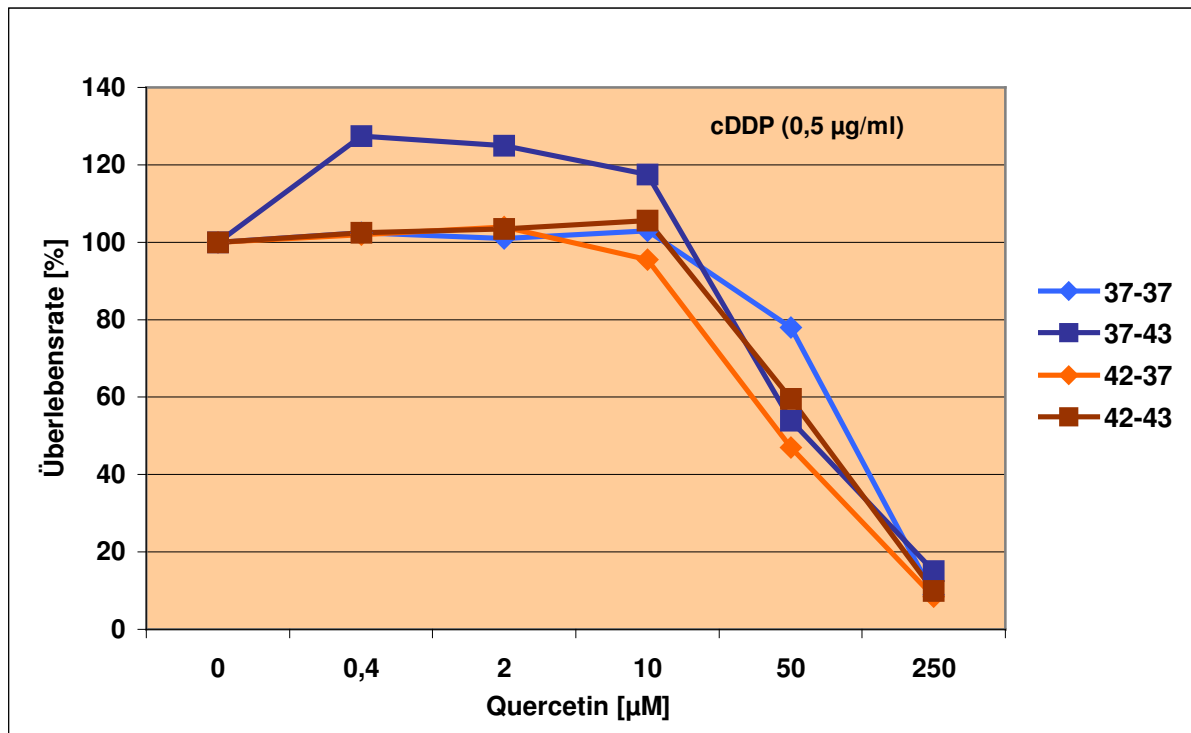


Abb. 12b: Einfluss von Cisplatin (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) auf die Zelllinie RD-ES in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen Quercetin (0,4  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$ ) und unterschiedlichen Hyperthermiebedingungen. Die Zellen wurden mit einem Hitzeschock bei 43 °C für 1 Stunde behandelt, mit und ohne Vorbehandlung 24 Stunden zuvor mit 42 °C für 1 Stunde. Die Zahl der überlebenden Zellen wurde mit Hilfe des XTT-Assays bestimmt, 72 Stunden nach der Behandlung. Die Ergebnisse sind auf die 37 °C-Kontrolle (=100%) bezogen.



#### **4.5.3. Western-Blot-Analyse der intrazellulären Hitzeschockproteinexpression von HSP-27 und HSP-70 nach Einwirkung von Quercetin, Etoposid und Cisplatin unter verschiedenen Hyperthermiebedingungen**

Der Konzentrationsbereich von 10  $\mu\text{M}$  bis 50  $\mu\text{M}$  Quercetin wird an der Zelllinie SK-ES-1 auf die Expression der Hitzeschockproteine 27 und 70 untersucht. Dazu werden die Tumorzellen den Quercetin-Konzentrationen 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  für 24 Stunden behandelt. Anschließend werden sie entweder bei 37 °C inkubiert oder einem 43 °C-Hitzeschock für 1 Stunde ausgesetzt. Nach 18 Stunden Inkubationszeit bei 37 °C wird eine Western-Blot Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 13 und 14 dargestellt.

In der Abbildung 13a zeigt sich eine reduktive Wirkung von Quercetin auf HSP-27 gegenüber der Nullkontrolle ab der 10  $\mu\text{M}$ -Konzentration. Ab 30  $\mu\text{M}$  Quercetin ist nur noch bei 37 °C eine minimale Expression aufgezeichnet. Bei anschließendem Hitzeschock stellt sich keine Bande mehr dar. Die stärkste Expression erreichen die Zellproben, welche zuvor mit Cisplatin behandelt worden sind. Deutlich erkennbar wird, dass nach Behandlung mit einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  Quercetin keine HSP-27-Expression festzustellen ist.

Wird bei Quercetin-Exposition gleichzeitig in der ersten Stunde eine milde Hyperthermie von 42 °C appliziert, ändern sich die Hitzeschockproteinexpressionen von HSP-27 und HSP-70 in den zytostatikafreien Zelllysaten. Eine Quercetin-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  führt zu einer höheren HSP-27-Expression. Ab einer Dosis von 30  $\mu\text{M}$  Quercetin wird die Darstellung des HSP-27 wieder vergleichbar mit den Ergebnissen der nicht-vorbehandelten Zellen, die sich bei einer weiteren auf 50  $\mu\text{M}$  Quercetin nicht ändert.

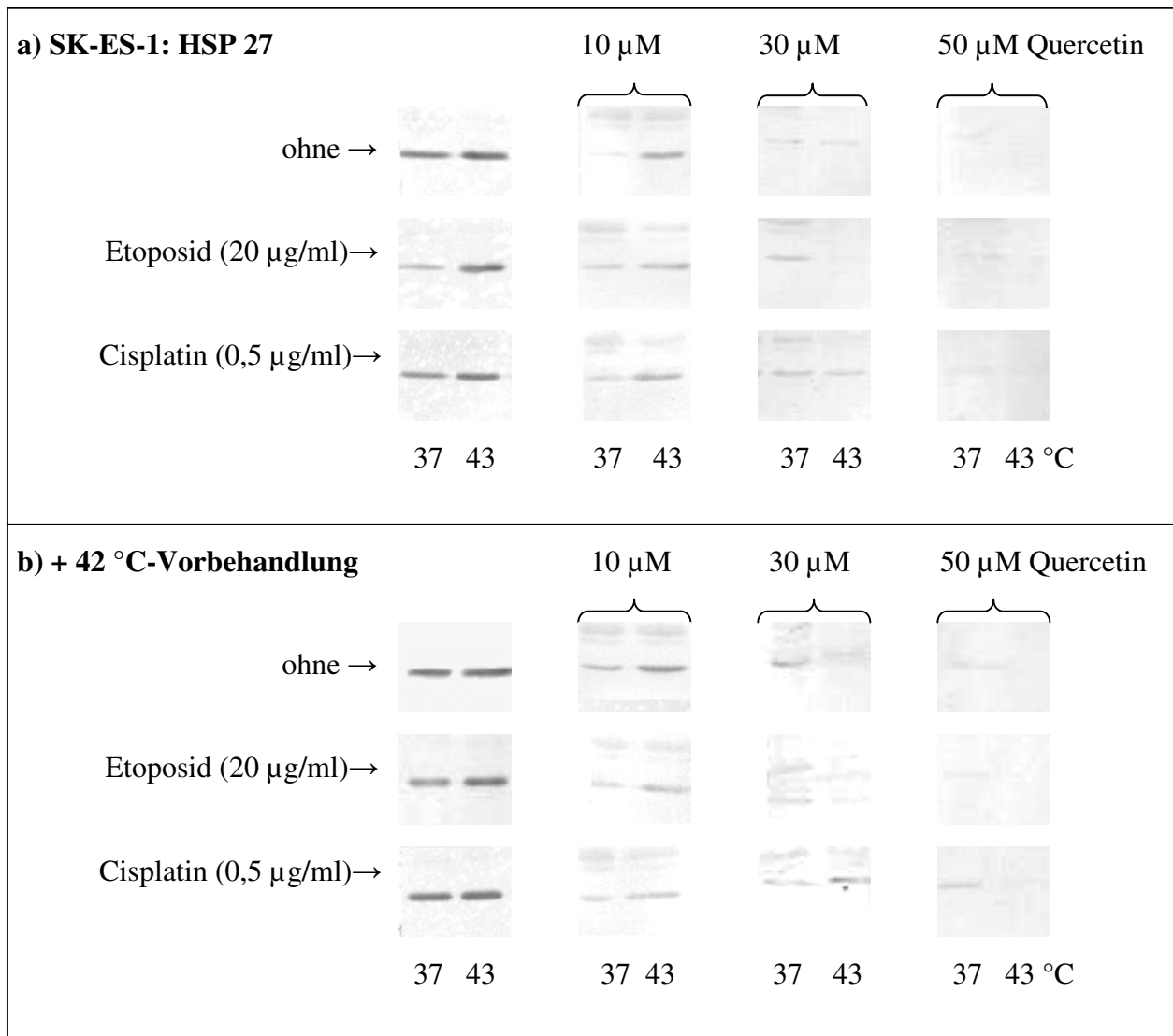


Abb. 13a und 13b: Western-Blot-Analyse: Expression von HSP-27 nach Einwirkung von verschiedenen Konzentrationen Quercetin (10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 50  $\mu$ M), auf die Zelllinie SK-ES-1 und einer 1-stündigen Zytostatikaapplikation 24 Stunden später, mit und ohne 43  $^{\circ}$ C-Hitzeschock. Die Messung erfolgte 18 Stunden nach Hitzeschock. Bei den Ergebnissen der Abb. 13b wurde zusätzlich zur Quercetinbehandlung eine 1-stündige 42  $^{\circ}$ C-Hyperthermievorbehandlung angewandt.

Die geringe HSP-70-Expression unter Normalbedingungen (s. Abb. 5) wird bei einer Quercetin-Konzentrationen von 10  $\mu$ M und auch 30  $\mu$ M unter Normalbedingungen bei 37  $^{\circ}$ C erhöht. Die HSP-70-Expression wird bei einem Hitzeschock von 43  $^{\circ}$ C in SK-ES-1-Zellen durch 10  $\mu$ M Quercetin deutlich verstärkt. Eine Konzentration von 30  $\mu$ M des Flavonoids unterdrückt dagegen die HSP-70-Expression vollständig.

Bei 42 °C-Vorbehandlung lässt sich ebenfalls feststellen, dass 10 µM Quercetin in Kombination mit Hyperthermie eine positive Wirkung auf dieses Hitzeschockprotein haben. Sowohl bei 37 °C, als auch bei Hitzeschock von 43 °C ist die stärkere Darstellung der Proteinbanden im Western-Blot festzustellen. Auffallend ist zudem in der Auswertung des 30 µM-Ergebnisse, dass diese Konzentration ohne 42 °C-Vorbehandlung noch beide gemessenen Proteinbanden (bei 37 °C und 43 °C) reduziert hat, sich jetzt in der 37 °C-Kontrolle das HSP-70 jedoch deutlich darstellt. Bei Hitzeschock ist jedoch weiterhin keine Expression mehr messbar.

50 µM Quercetin unterdrücken auch hier wie in allen anderen Testreihen die Hitzeschockproteine vollständig (Abb. 13).

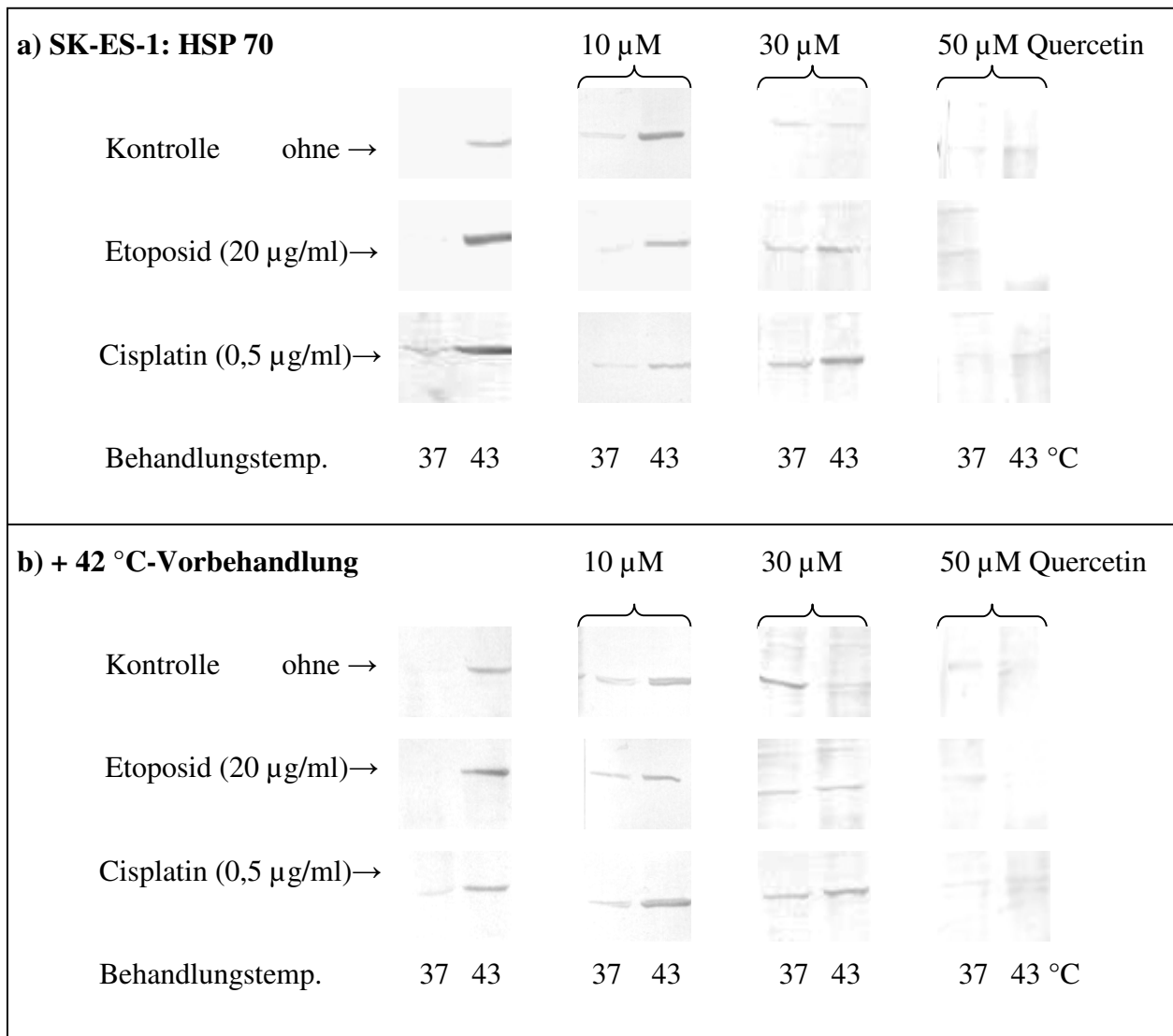


Abb. 14a und 14b: Western-Blot-Analyse: Einfluss von Quercetin (10, 30 und 50  $\mu$ M) auf die Expression von HSP-70 von SK-ES-1 nach Zytostatikaapplikation. Zytostatische Behandlung mit VP-16 oder cDDP erfolgte 24 Stunden nach Quercetinexposition bei 37 °C oder 43 °C Behandlungstemperatur.

In den Abbildungen 13 und 14 sind auch die Wirkungen der Zytostatika Etoposid und Cisplatin in Kombination mit Quercetin unter verschiedenen Hyperthermiebedingungen dargestellt. Die Versuchsanordnung ist dahingehend erweitert worden, dass 24 Stunden nach der Quercetinzugabe eine einstündige Chemotherapiebehandlung bei 37 °C oder bei 43 °C auf die Tumorzellen einwirkt. Etoposid erreicht bei HSP-27 keine Wirkung im 10  $\mu$ M-Quercetin-Konzentrationsbereich (Abb. 10a). Dagegen wird die Expression bei 30  $\mu$ M Quercetin deutlich gesteigert. Ob dabei eine 42 °C-Vorbehandlung eingesetzt wurde oder nicht, spielt für die Darstellung der Proteinbanden keine Rolle (Abb. 10b). Das HSP-70 wird zwar durch

Etoposid und Hitzeschock verstärkt exprimiert, in Kombination mit Quercetin lassen sich jedoch nur geringe Unterschiede feststellen. So liegt die HSP-70-Expression bei 30  $\mu\text{M}$  Quercetin minimal höher, wenn Etoposid auf die Zellen wirkt. Auch hier ist durch die 42 °C-Hyperthermie zu Beginn kaum eine Änderung in der Bandendarstellung auszumachen.

Die Wirkung von Cisplatin und Quercetin auf die Hitzeschockproteine unterscheidet sich in einigen Punkten. So unterdrückt eine 30  $\mu\text{M}$  Quercetin-Konzentration die durch Cisplatin bereits reduzierte HSP-27-Expression noch weiter (Abb. 10a). Wenn nun die bereits beschriebene 42 °C-Vorbehandlung hinzukommt (Abb. 10b), wird die HSP-Reduzierung von Cisplatin durch 10  $\mu\text{M}$  Quercetin vollständig aufgehoben. Es scheint sogar, dass die Proteinbanden im Western-Blot bei dieser Flavonoid-Konzentration noch stärker sind, als bei der Nullkontrolle. Im Gegensatz dazu zeigt die Quercetin-Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  in Kombination mit Cisplatin kein exprimiertes HSP-27. Für das HSP-70 gilt, dass Quercetin in den Konzentrationen 10  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$  die Expression erkennbar abschwächt, nicht aber vollständig unterdrückt. Bei einer 42 °C-Vorbehandlung wird diese Abschwächung eher in eine leichte Verstärkung im 10  $\mu\text{M}$ -Bereich umgewandelt. Keine Unterschiede sind dagegen im 30  $\mu\text{M}$ -Bereich festzustellen.

Für alle Zytostatika-Hyperthermie-Kombinationen mit einer 50  $\mu\text{M}$ -Quercetin-Konzentration lässt sich festhalten, dass im Vergleich zur Nullkontrolle keine HSP-Expression mehr möglich ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Einsatz von Etoposid und Cisplatin unter den gewählten Versuchsbedingungen keine deutlichen Änderungen der Quercetinwirkungen auf die Hitzeschockprotein-Expression der Zelllinie SK-ES-1 hat.

## **5. Diskussion**

In den letzten beiden Jahrzehnten wird in zunehmendem Maße die Hyperthermie im Temperaturbereich 40-44 °C zur Behandlung von malignen Tumoren des Erwachsenen- und Kindesalters eingesetzt. Die Entwicklung von geeigneten Wärmeapplikatoren, Qualitätsstandards zur Temperaturerfassung und umfassendere Kenntnisse über thermobiologische Zusammenhänge haben wesentlich zur Verbesserung von klinischen Behandlungsergebnissen beigetragen. Während in den bisherigen randomisierten Studien (Phase III) eine signifikante Verbesserung von Strahlentherapie durch den zusätzlichen Einsatz der Hyperthermie als erwiesen gilt, stehen klinische Ergebnisse solcher Studien für den kombinierten Einsatz von Chemotherapie und Hyperthermie noch aus. Dennoch existieren inzwischen ermutigende Ergebnisse von Phase-II-Studien bei Erwachsenen und Kindern mit nicht resezierbaren Sarkomen und malignen Keimzelltumoren, in denen durch Einsatz von Thermochemotherapie ein günstiges Tumoransprechen und eine verbesserte lokale Tumorkontrolle erzielt worden sind. Damit ergeben sich erste Hinweise auf eine thermische Wirkungsverstärkung von Chemotherapie in der klinischen Anwendung, die zuvor durch zahlreiche *in vitro* Studien an humanen Tumorzellen belegt worden sind. Obwohl inzwischen viele Einzeleffekte von Hyperthermie auf die Zellregulation in verschiedenen Zellsystemen untersucht worden sind, bleiben viele Faktoren der komplexen Interaktionsmuster von Chemotherapie und Hyperthermie noch unbekannt. Dies gilt in besonderem Maße für bösartige Tumoren des Kindesalters, bei denen bisher nur eine sehr begrenzte Anzahl an Untersuchungen zur Wirksamkeit von Hyperthermie in Kombination mit Chemotherapie vorliegen. Eine zentrale Rolle in der Anwendung von Thermochemotherapie hat die temperatur- und zeitabhängige Expression von Hitzeschockproteinen (HSP), die den zytotoxischen Effekt auf die Tumorzellen abschwächen kann. Deshalb wird zur Verbesserung von klinischen Behandlungsergebnissen nach Modulationsfaktoren gesucht, die der natürlichen Stressantwort von Tumorzellen entgegenwirken.

In der vorliegenden Arbeit wird erstens an den humanen Ewingsarkom-Zelllinien SK-ES-1 und RD-ES der Effekt der Thermotoleranz nachgewiesen sowie zweitens der Zusammenhang mit der Expression der Hitzeschockproteine HSP-27 und HSP-70 unter verschiedenen Hyperthermiebedingungen beschrieben. Drittens wird die Wirkung klinisch relevanter Dosen der Zytostatika Etoposid und Cisplatin in Kombination mit nichtzytotoxischen Konzentrationen Quercetin auf die Zellüberlebensraten der beiden Tumorzelllinien

untersucht. Des Weiteren ergibt die *in vitro* Studie mittels Westernblotanalyse, dass das Flavonoid inhibitorische Wirkung auf die Hitzeschockprotein-Expression haben kann.

Zunächst wird das Verhalten der Tumorzelllinien SK-ES-1 und RD-ES bei verschiedenen Hyperthermiebedingungen beobachtet. Das Phänomen der Thermotoleranz, die gesteigerte Resistenz der Zellen gegenüber einem Hitzeschock nach einer Hyperthermie-Vorbehandlung, bestätigt sich in den Testreihen an den beiden Zelllinien mit Hilfe des XTT-Testes und wird daraufhin im Western-Blot-Verfahren auf die intrazelluläre Hitzeschockprotein-Expression untersucht. Es zeigt sich ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Erhöhung der HSP-70-Expression durch eine einstündige Behandlung mit moderater Hyperthermie von 42 °C und der verbesserten Resistenz der Zellen 24 Stunden später bei Hitzeschock mit 43 °C und 45 °C. Auch das HSP-27, welches bei einem 45 °C-Hitzeschock nicht exprimiert wird, ist in wesentlich höheren Mengen nach einer 42 °C-Vorbehandlung zu finden.

Die Methode des XTT-Testes wurde 1988 von Scudiero *et al.* (71) auf der Basis des MTT-Testes von Mosmann 1983 (70) vorgestellt und findet seither in der zytobiologischen Forschung Verwendung. So nutzten Kondo *et al.* 1994 in ihrem Vergleich des XTT-Testes mit dem MTT-Test eine Konzentration von 1mg/ml XTT und 25 µM PMS. Das Ergebnis stellte den XTT-Test als sensitivere Methode dar. Lechpammer *et al.* beschrieben 2002 diesen Test als hervorragend geeignetes Mittel zur quantitativen Darstellung der Thermotoleranz von Zellkulturen (11). In ihrer Versuchsanordnung setzten sie XTT-Konzentrationen von 0,2 mg/ml und 6,4 µM PMS ein. Außerdem testeten sie den inhibitorischen Effekt des Quercetins auf die Thermotoleranz in Dosen von 1,5 µM, 7 µM und 15 µM an den Zelllinien NIH 3T3 und PC3.

Das Verfahren des Western-Blots, auch Immunoblot, ist die Methode der Wahl, um durch SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennte Proteine darzustellen (Towbin *et al.* 1979, 74). Die Hitzeschockproteine werden durch spezifische Antikörperbindung und anschließender Farbreaktion auf der PVDF-Membran sichtbar gemacht. Durch den standardisierten Versuchsaufbau lassen sich die Banden auf mehreren Membranen miteinander vergleichen.

Die Vorbehandlung der SK-ES-1- und der RD-ES-Zellen mit 42 °C für 1 Stunde im Wasserbad ist in Anlehnung zu den meisten Arbeiten über die Thermotoleranz gewählt. Li *et al.* fassten 1995 zusammen, dass eine kontinuierliche Temperatur < 43 °C sowohl bei Tumorzellen als auch bei normalen Zellen dieses Phänomen auslöst (12). Ein einstündiger Hitzeschock von 43 °C 24 Stunden nach der Hyperthermie-Vorbehandlung zeigt bei den hier

verwendeten Zelllinien keinerlei Einschränkung des Zellwachstums, während dagegen der alleinige Hitzeschock von 43 °C die SK-ES-1-Zellen um ca. 20 % und die RD-ES-Zellen um ca. 10 % reduziert. Noch resistenter zeigen sich die beiden Zelllinien gegenüber einem Hitzeschock von 45 °C, der ebenfalls 1 Stunde einwirkt. Hier wird die Zellüberlebensrate mehr als verdoppelt, statt 20 % (SK-ES-1) bzw. 23 % (RD-ES) finden sich bei vorbehandelten Zellen 54 bzw. 48 % Überlebensraten.

Für den klinischen Alltag sind derartige Ergebnisse insofern von Relevanz, da auch die Hyperthermie in mehreren Sequenzen als Therapie eingesetzt wird. Wenn also die Zyklen zu engmaschig gewählt werden, können Tumorphpopulationen eine Thermotoleranz ausbilden und damit den Effekt abschwächen. Es stellt sich also die Frage, wie lange Zellen ein Gedächtnis für Hitzestress aufbauen. Zunächst muss der Mechanismus der Thermotoleranz geklärt werden. Li *et al.*, Landry *et al.*, Mizzen et Welch und Moseley sahen bereits die Expression mehrere Hitzeschockproteine verschiedener Zelllinien in direktem Zusammenhang mit der Thermotoleranz (12, 37, 40, 44). So beschrieben Landry *et al.* 1982 die Kinetik der Thermotoleranz, ihre Entstehung und ihren Abbau als direktes Korrelat zur Induktion und zur Degeneration des Hitzeschockproteins (HSP) 70.

Daraufhin werden in der vorliegenden Arbeit zellkinetische Versuche durchgeführt, welche den Verlauf der Hitzeschockprotein-Expression von HSP-27 und HSP-70 nach Hitzeschock darstellen. Aus vorangegangenen Experimenten ist bekannt, dass eine einstündige Behandlung mit 43 °C im Wasserbad für die SK-ES-1- und die RD-ES-Zellen einen ausreichenden Stressfaktor darstellt. In diesem Fall wird neben dem HSP-70 auch das HSP-27 untersucht, welches hinsichtlich seiner Wirkung auf die Thermotoleranz bisher nur in wenigen Arbeiten erwähnt wird. Es zeigt sich, dass die HSP-70-Expression in den Tumorzelllinien erst nach einigen Stunden ihr höchstes Level erreicht. Sofort nach dem Hitzeschock, also zum Zeitpunkt Null, werden durch die SK-ES-1-Zellen noch keine HSP-70 im Western-Blot dargestellt. Die RD-ES-Zellen zeigen bereits ein konstantes Level an darstellbaren Proteinen von 70 kDa, das nach einem Hitzeschock wie bei den SK-ES-1-Zellen zu einer deutlichen Zunahme der HSP-70-Expression führt, die über 24 Stunden anhält und erst nach 48 Stunden eine Abnahme erkennen lässt. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Xu *et al.* 1998, die nach Hitzeschock von 41,1 °C die HSP-70-Expression zu den Zeitpunkten 0, 1, 16 und 24 Stunden bei 5 Zelllinien kontrollierten. Dabei konnten sie bei geringfügigen Unterschieden den Anstieg der Expression nach 1 Stunde bis zum höchsten Level bei 16 Stunden für alle Zelllinien nachweisen. Auch nach 24 Stunden war die Expression noch deutlich erhöht (13). Auch Samali *et al.* (1999) beschrieben den



kontinuierlichen Anstieg der Hsp-72-Expression bei JURKAT-Zellen, einer humanleukämischen T-Zellreihe, bis zum Zeitpunkt 6 Stunden. Nicht alle Autoren unterscheiden explizit das HSP-70 in Hsc-70, der konstitutiven Form, und Hsp-72, der induzierbaren Form. Gemeint ist im Zusammenhang mit der Hyperthermie selbstverständlich die induzierbare Form, das Hsp-72. Außerdem untersuchte Samali auch das HSP-27 und konnte hier für seine Zelllinie eine minimale Zunahme der Expression nach 3 Stunden messen (14). Dies lässt sich in der vorliegenden Versuchsreihe für die SK-ES-1-Zellen nur bedingt nachweisen, da diese Zelllinie bereits ein sehr hohes Grundlevel an HSP-27 präsentiert, wohingegen RD-ES-Zellen kaum HSP-27 exprimieren. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Beresford *et al.*, die 1998 zehn hämatopoetische Zelllinien auf ihre HSP-Expression im Immunoblot testeten, und sowohl kräftige Proteinbanden fanden, als auch Zelllinien ohne jegliche HSP-Expression. Beresford kam zu dem Schluss, dass die HSP-27-Expression in Zellen sehr variabel sein kann (15). Bereits 1996 hatten Wissing und Jäättelä diese Erkenntnisse an zwei Tumorzelllinien, WEHI 164 aus einem Fibrosarkom und ME-180 aus einem Zervixkarzinom, beschrieben (16). Zusätzlich wird die Expression dieser beiden Hitzeschockproteine nach einem einstündigen Hitzeschock von 45 °C im Wasserbad kontrolliert. Dies stellt eine Temperatur dar, die laut Fuller *et al.* (1994) und Samali *et al.* (1999) den Zelltod nicht mehr durch Apoptose erzeugt, sondern durch Nekrose. Es zeigt sich, dass das HSP-70 bei den SK-ES-1-Zellen durchaus bei 45 °C-Hitzeschock exprimiert wird, allerdings nicht so deutlich wie bei 43 °C. Dies liegt wohl eher an der Methode, da der 45 °C-Hitzeschock eine extreme Belastung für die Zellen darstellt und bei dieser Temperatur ein Großteil der Tumorzellen abstirbt (27).

Parallel zu den oben genannten Arbeiten lässt sich auch bei den RD-ES-Zellen unter diesen Bedingungen (45 °C) kaum HSP-70 nachweisen. Wird nun 24 Stunden zuvor eine moderate, einstündige Hyperthermie von 42 °C angewandt, und damit die bereits beschriebene Thermotoleranz ausgelöst, finden sich nach 45 °C-Hitzeschock bei beiden Tumorzelllinien deutlich erhöhte HSP-70-Expressionen. Noch eindeutiger Ergebnisse bringen die gleichen Versuchsbedingungen für HSP-27 bei SK-ES-1. Während ohne Vorbehandlung in den SK-ES-1-Zellen nach einstündigem 45 °C-Hitzeschock kein HSP-27 exprimiert wird, lässt sich durch die 42 °C-Vorbehandlung eine massive Erhöhung der exprimierten HSPs feststellen.

Um die Relevanz der Forschungsergebnisse in den klinischen Alltag der Hyperthermie umzusetzen, müssen auch die Effekte von Chemotherapeutika auf Tumorzelllinien unter verschiedenen Hyperthermiebedingungen erarbeitet werden. Des Weiteren ist von Interesse, inwieweit die Expression von Stressproteinen eine Rolle in diesen Kombinationstherapien

spielt. Dass derartige Proteine nicht nur als Reaktion auf Hitzeeinwirkung, sondern auch durch Schwermetalle, Säuren, Salze, Hypoxie oder radioaktiver Strahlung ausgelöst werden können, fassten Fuller *et al.* 1994 in ihrem Review zusammen (27). Zwei Jahre später ergänzten Poccia *et al.* diese Liste um eine Vielzahl von Viren, die auch eine Expression auslösen können (17). Ritossa *et al.* hatten bereits 1962 neben dem Hitzeschock das DNP beschrieben, welches ebenfalls die neuentdeckten Proteine vermehrt exprimiert (30). Die Suche zielt also auf die Effekte von Zytostatika ab, und auf welche Art und Weise sie die Expression in normalen Zellen und in Tumorzellen auslösen. Galen folgerte 1990, dass neben der verbesserten Aufnahme, auch die zelluläre Verteilung und die Rate der Metabolisierung von zunehmenden Temperaturen profitieren. Bereits 1984 hatte die Arbeitsgruppe Issels *et al.* an CHO-Zellen, Eizellen des chinesischen Hamsters, festgestellt, dass es Chemotherapeutika gibt, die keine zytotoxischen Wirkungen bei physiologischen Temperaturen zeigen, wohl aber bei 43 °C und mehr. Diese Chemotherapeutika fielen durch ihre Sulfhydryl-Gruppen in der Struktur auf. In kombinierten Untersuchungen wurden derartige Ergebnisse auch an Tumorzelllinien aus kolo-rektalen Karzinomen, malignen Melanomen und verschiedenen Sarkomen nachgewiesen (27). Issels *et al.* publizierten 1990 eine Phase-II-Studie, in der sie die Regionale Tiefenhyperthermie (RHT) mit Ifosfamid und Etoposid kombinierten und bei lokal fortgeschrittenen Sarkomen anwendeten. Dabei zeigten 34 % der Patienten eine Antwort. Dieses Therapieschema wurde 1998 von Wessalowski *et al.* um Cisplatin erweitert und dies führte zu einer 70 %igen Antwort bei Patienten mit malignen Keimzelltumoren (3). In der vorliegenden Arbeit werden nun zwei Zytostatika eingesetzt, die sich durch unterschiedliche Wirkmechanismen unterscheiden. Während der Topoisomerase-II-hemmer Etoposid Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA induziert, führt Cisplatin zu Quervernetzungen zwischen Basenpaaren in der DNA. In sämtlichen Versuchsanordnungen werden die Konzentrationen 20 µg/ml Etoposid und 0,5 µg/ml Cisplatin angewandt, vergleichbar mit klinisch gemessenen Konzentrationen im Blutplasma. Debes *et al.* beschrieben 2002 XTT-Assays mit den Ewingsarkomzelllinien VH-64 und SK-ES-1, die Cisplatin in Konzentrationen von 0,1 bis 5 µg/ml und Etoposid in Konzentrationen von 1 bis 50 µg/ml verwendeten. In dieser Studie ist ein prädiktives Testsystem bei Tumorzellen zur Anwendung gekommen, um synergistische zytotoxische Effekte von Chemotherapie mit und ohne Hyperthermie unter Berücksichtigung von Veränderungen im Zellzyklus zu evaluieren. Dabei wurde gezeigt, dass Cisplatin in Kombination mit einem Hitzeschock eine synergistische Wirkungsverstärkung im Vergleich zu Etoposid besitzt (100).

An den beiden eingesetzten Tumorzelllinien lassen sich ähnliche Ergebnisse beobachten, wobei RD-ES zu einem gewissen Grad resistenter gegenüber den Zytostatika zu sein scheint. Etoposid zeigt dabei nur einen geringfügigen Einfluss durch eine gleichzeitige Hyperthermiebehandlung, und dieser verläuft parallel zu den Zellüberlebensraten der unbehandelten Zellreihen, die ebenfalls bei Hitzeschock von 43 °C und 45 °C absinken. Wenn die Zellen der einstündigen 42 °C-Vorbehandlung ausgesetzt werden (24 Stunden zuvor), ist auch bei einer Etoposidbehandlung + Hitzeschock (43 °C und 45 °C) eine gesteigerte Überlebensrate zu erkennen. Allerdings bleibt die chemotherapeutische Wirkung doch deutlich zu erkennen.

Cisplatin erreicht in der eingesetzten Konzentration und in der vorliegenden Versuchsanordnung nicht die zytotoxische Wirksamkeit vom Topoisomerase-II-hemmer Etoposid. Etoposid zeigt an beiden Zelllinien eindeutig einen additiven Effekt mit der Hyperthermie. Je höher die gleichzeitige Temperatur, umso effektiver jedoch das Cisplatin. Bei einer Temperatur von 37 °C kann Cisplatin die Zellüberlebensraten gerade einmal auf 68 % (SK-ES-1) und 75 % (RD-ES) absenken. Bei 42 °C-Vorbehandlung zeigt RD-ES Überlebensraten von 81 %, SK-ES-1 von 65 %. Bei einem 43 °C- oder einem 45 °C Hitzeschock überleben signifikant mehr Tumorzellen die kombinierte Thermochemotherapie, wenn sie 24 Stunden zuvor für 1 Stunde mit 42 °C vorbehandelt wurden. Gleichzeitig fällt aber auch eine deutliche Wirkungsverstärkung der zytotoxischen Aktivität des Cisplatins durch Hyperthermie auf, die so bei Etoposid nicht zu finden ist.

Die Ergebnisse aus der Zytotoxizitätsmessung im XTT-Test decken sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. So konnten Urano *et al.* 1992 nachweisen, dass die Wirkung von Cisplatin auf Fibrosarkomzellen (Fsa-II) zum Beispiel bei 43 °C um den Faktor 10 gegenüber 37 °C gesteigert wird (42).

In einem weiteren Schritt wird der Einfluss der Zytostatika Cisplatin und Etoposid unter beschriebenen Konzentrationen auf die Expression der Hitzeschockproteine HSP-70 und HSP-27 gemessen. Das Etoposid unterdrückt HSP-27 in SK-ES-1-Zellen bei 37 °C sicher, ebenfalls scheint Cisplatin die Expression zu reduzieren. Dagegen ist deutlich, dass die HSP-70-Expression in SK-ES-1-Zellen durch Cisplatin bei gleichzeitiger Hyperthermie unter den vorgegebenen Testbedingungen nicht unterdrückt wird. Dies deckt sich mit den Ergebnissen sowohl von Yamamoto *et al.* (2001), die in menschlichen Ovarialtumorzellen für HSP-27 und für HSP-70 sogar einen verstärkenden Einfluss durch Cisplatin beobachteten, als auch mit Jakubowicz-Gil *et al.* (2002), die an 4 Zelllinien (HeLa, Hep-2, A549 und Fibroblasten der menschlichen Haut) die Wirkung von Etoposid und Cisplatin untersuchten (18). Richards *et*

al. folgerten 1996 aus ihren Erkenntnissen, dass höhere HSP-27-Expressionen in Cisplatin-behandelten Hodentumorzellen (833K) die Zytostatikaresistenz erhöhen (101). Bei genauer Betrachtung der Forschungsliteratur über den Einfluss von Cisplatin oder Etoposid auf Tumorzellen zeigt sich, dass die HSP-Expression meist individuell verschieden ist. Es fanden sich sowohl Zunahmen, als auch Abnahmen der HSP-Expression als Reaktion auf die beiden genannten Medikamente (Hettinga et al., 1997). Daraus folgerten die meisten Autoren, dass diese individuelle HSP-Antwort unter anderem ein Maß für die Chemosensitivität eines einzelnen Tumors sein kann (19).

Wenn nun die Hypothese aufgestellt wird, dass die Wirksamkeit von Cisplatin abhängig von der Menge der Hitzeschockproteine ist, würde eine Unterdrückung der HSP-Expression die Entwicklung der Thermotoleranz verhindern und die Thermochemotherapie effizienter machen. An diesem Punkt setzt das Flavonoid Quercetin an. Als sogenannter Sekundärpflanzenstoff kommt es auf natürliche Weise in der Natur vor. Watzl und Rechkemmer fassten 2001 in ihrem Review die mittlerweile zahlreichen Beiträge in der Flavonoidforschung zusammen und beschrieben darin auch, dass die physiologischen Plasmakonzentrationen nach oraler Gabe höchstens 2  $\mu\text{M}$  erreichen (57). *In Vitro* werden Dosen von 2,5  $\mu\text{M}$  bis 500  $\mu\text{M}$  eingesetzt. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass Quercetin die Wirkung von Zytostatika erhöhen kann. So beschrieb Cipak *et al.* 2003 eine Quercetin-Konzentration von 20  $\mu\text{M}$ , welche die Cisplatin-induzierte Apoptose bei Leukämiezellen (HL-60 und L1210) verstärkt (20). Piantelli *et al.* beobachteten 2001, dass durch Quercetin und Tamoxifen Melanomzellen (M14 und MNT1) gegenüber der Hyperthermiebehandlung sensibler werden (21).

In der vorliegenden Arbeit werden Konzentrationen von 0,4  $\mu\text{M}$  bis 250  $\mu\text{M}$  Quercetin eingesetzt. Zunächst soll im XTT-Test an den verwendeten Ewingsarkom-Zelllinien kontrolliert werden, welche Konzentration bei welchen Hyperthermiebedingungen welchen Effekt auf die Überlebensraten hat. Es stellt sich heraus, dass sowohl SK-ES-1 als auch RD-ES bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  unter den angewandten Testbedingungen keine Reaktion auf das Flavonoid zeigen. Erst Konzentrationen, die über diesen Wert hinausgehen, 30  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$ , senken die Zellüberlebensraten deutlich. Für die Zelllinie SK-ES-1 gilt, wenn bei Quercetingabe eine einstündige, moderate Hyperthermie von 42 °C herrscht, ist die Zytotoxizität des Quercetins am höchsten. Statt 68 bzw. 69 % überleben nur 41 bzw. 39 % die Quercetin-Hyperthermie-Vorbehandlung, bzw. den zusätzlichen 43 °C-Hitzeschock nach 24 Stunden. Bei genauer Betrachtung der Ergebnisse liegt die Vermutung

nahe, dass aus der moderaten und in der Nullkontrolle verträglichen Hyperthermie von 42 °C für eine Stunde durch das Quercetin eine schädliche Temperaturhöhe entsteht. Überraschenderweise zeigt nämlich der anschließende Hitzeschock von 43 °C keine weitere Abnahme des Zellüberlebens.

Konzentrationen von 250 µM Quercetin sind in jedem Fall für die beiden Tumorzelllinien zytotoxisch, die Zellüberlebensraten sinken durchschnittlich auf 10 %.

Mittlerweile gibt es zahlreiche Studien, die den inhibitorischen Effekt von Quercetin in Kombination mit Hyperthermie auf Tumorzellen belegen. So beschrieben Asea et al. 2001, dass Quercetinkonzentrationen zwischen 200 µM und 400 µM über 24 Stunden bei nachfolgender Hyperthermie von 43 °C für 1 Stunde einen drastischen, inhibitorischen Effekt auf PC-3- und DU-145-Zellen aus Prostatakarzinomen haben. Diese Ergebnisse sind sowohl *In Vitro*, als auch *In Vivo* belegt worden (22). Choi *et al.* fanden 2001 heraus, dass Quercetin an der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 eine Wachstumshemmung über zwei verschiedene Mechanismen induziert: Zum einen die Hemmung der Zellzyklusprogression durch vorübergehende M-Phase-Akkumulation und nachfolgenden G2-Arrest, zum anderen die Induktion der Apoptose. Die eingesetzte Quercetinkonzentration betrug hier 20 µM (81). Bereits 1994 stellten Wei *et al.* in ihrer Arbeit, in der sie die Quercetin-induzierte Apoptose an drei Leukämie-Zelllinien nachwiesen, die These auf, dass die inhibitorische Wirkung in einem direkten Zusammenhang mit der Hitzeschockprotein-Expression der Tumorzellen steht (9). Gorman *et al.* erklärten 1999, dass die Inhibition der Hitzeschockantwort, also der Hitzeschockprotein-Expression, durch Quercetin in humanen Myelocyten (HL-60) zur Apoptose führt. Interessanterweise erreichten sie dies durch den Einsatz von Antioxidantien, hier Pyrrolidin-Dithiocarbamat (PDTC) und 1,10-Phenanthrolin. Da auch Quercetin den Antioxidantien zugeordnet werden kann, ergibt sich hier eine Parallele (23).

Dies soll an der Zelllinie SK-ES-1 im Western-Blot-Verfahren ebenfalls untersucht werden. Für das HSP-27 wird bereits bei einer Konzentration von 10 µM Quercetin eine verminderte Expression festgestellt, die dann ab 50 µM zur vollständigen Unterdrückung führt. Interessanterweise lässt sich bei einer Quercetinkonzentration von 10 µM unter Normaltemperatur (37 °C) kaum eine HSP-27-Expression darstellen. Wird nun aber nach 24stündiger Quercetineinwirkung ein Hitzeschock von 43 °C als Stimulus für die HSP-Expression eingesetzt, so kann das HSP-27 nicht vollständig unterdrückt werden. Die Effektivität des Quercetins scheint demnach mit Hyperthermie zu korrelieren. Allerdings bringt eine einstündige 42 °C-Vorbehandlung ein anderes Ergebnis. Die HSP-27-Expression lässt sich bei 10 µM Quercetin genauso kräftig darstellen wie in der Nullkontrolle. Daraus

lässt sich folgern, dass das Quercetin eine gewisse Zeit benötigt, um in den Tumorzellen anzufutern und dort seine Wirkung zu entfalten. In den zellkinetischen Versuchen hat sich bereits gezeigt, dass eine HSP-Expression auch über einen längeren Zeitraum bestehen kann. Die gemessenen HSPs wären demnach noch aus der 42 °C- Vorbehandlung und lassen sich durch eine 10 µM Quercetinkonzentration nicht beeindrucken. Ähnliche Ergebnisse lassen sich auch für das HSP-70 festhalten, auch hier nur bis zu einer Konzentration von 10 µM. Wie in den zellkinetischen Versuchen gezeigt, wird HSP-70 ohne Hyperthermieeinwirkung nicht exprimiert. Nach der einstündigen 42 °C-Vorbehandlung, 24 Stunden zuvor, ist die 37 °C-Bande auch noch bei 30 µM Quercetinkonzentration stärker darstellbar als in der Nullkontrolle. Dagegen ist die HSP-70-Expression mit einem Hitzeschock von 43 °C durch diese 30 µM Quercetin fast vollständig unterdrückt worden. Höhere Konzentrationen Quercetin lassen keinerlei HSP-Expression mehr zu.

Hosokawa *et al.* waren 1990 die ersten, die eine Inhibition der HSP-70-Expression durch Flavonoide, unter anderem Quercetin, in HeLa-Zellen und COLO320DM-Zellen aus einem Colonkarzinom entdeckten. Eingesetzt wurden hier Quercetinkonzentrationen von 30 µM, 60 µM und 100 µM, sowie verschiedene Hyperthermieschemata (7). Zwei Jahre später beschrieben Hosokawa *et al.* dann die Inhibition der Hitzeschockfaktor(HSF)-Aktivierung als Mechanismus der verminderten HSP-70-Expression (8). Elia et Santoro (1994) setzten an der Leukämiezelllinie K562 Quercetindosen bis zu 100 µM ein und fanden sehr ähnliche Ergebnisse zur vorliegenden Arbeit. Konzentrationen von 20 µM bis 40 µM hemmen spezifisch die HSP-70-Synthese, ohne das Zellüberleben zu beeinflussen. Ebenfalls identisch die Aussage der Autoren, dass 50 µM und 100 µM Quercetin die Expression vollständig blockieren. Elia et Santoro wiesen ausdrücklich daraufhin, dass die Effektivität des Quercetins von mindestens drei Faktoren abhängig ist: Temperatur, Zeitraum und Konzentration (24). In einer neueren Arbeit von Jakubowicz-Gil *et al.* (2002) wurde eine Konzentration von 15 µg/ml Quercetin (entsprechen ungefähr 45 µM) angewandt und dabei eine Inhibition der HSP-70-Synthese in direkten Zusammenhang mit der Induktion der Apoptose gesehen (25). Es zeigt sich, dass alle Arbeitsgruppen an ihren unterschiedlichen Zelllinien sehr ähnliche Konzentrationen des Quercetins eingesetzt haben. Die Versuchsbedingungen bezüglich der angewandten Hyperthermie variierten dagegen deutlich voneinander. In der vorliegenden Arbeit ist die Idee bei der Testanordnung zum einen, ob das Quercetin eine gewisse Einwirkzeit benötigt und zum anderen, ob HSPs nur dann durch Quercetin inhibiert werden, wenn gleichzeitig Hyperthermie gegeben wird. Die Wahl der zeitlichen Anordnung der Hyperthermieeinwirkungen zum Quercetineinsatz wird sicherlich

ein Schwerpunkt in der weiteren Forschung werden. Die Fragestellung lautet, wann wird Hyperthermie gegeben, wie lange sollte sie einwirken und welche Temperaturen werden eingesetzt.

Nun wird in der vorliegenden Arbeit zusätzlich zu verschiedenen Dosen Quercetin die festgelegte Konzentration Etoposid oder Cisplatin gegeben. Es zeigt sich, dass 50  $\mu\text{M}$  Quercetin unter sämtlichen gewählten Hyperthermiebedingungen die Wirkung der 20  $\mu\text{g/ml}$  Etoposid verstärken können. Vor allem bei SK-ES-1 bringt die einstündige 42 °C-Hyperthermie zur Quercetingabe 24 Stunden vor dem Einsatz des Zytostatikums einen eindeutigen additiven Effekt. Für diese Zelllinie werden die Zellüberlebensraten im XTT-Test nur mit 57 bzw. 46 % gemessen, je nachdem ob zum Etoposid noch ein Hitzeschock von 43 °C gegeben wurde oder nicht. Bei RD-ES finden sich für diesen Fall Werte von 73 bzw. 44 %. Wiederum bringt der 43 °C-Hitzeschock bei gleichzeitiger Etoposidgabe keine Verbesserung, sondern eine relative Verschlechterung der Zytotoxizität. Bei Betrachtung der Ergebnisse zum Cisplatin-Einsatz finden sich keine bedeutenden Veränderungen der Kurvenverläufe in der XTT-Auswertung. Auch hier ergibt sich für eine Quercetinkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  kein nennenswerter Effekt auf die Zytotoxizität von Cisplatin, ab 50  $\mu\text{M}$  aber sehr wohl, und in dieser Testung sogar noch ein wenig stärker als in den Etoposid-Versuchen. Es liegt nahe, dass der bekannte additive Effekt der Hyperthermie auf die Cisplatinwirkung auch hier zum Tragen kommt.

Scambia *et al.* hatten 1990 beschrieben, dass Quercetin und Cisplatin eine synergistische antiproliferative Aktivität auf das Wachstum von Ovarialkarzinom-Zellen haben (102). Zwei Jahre zuvor erwähnten Hofmann *et al.* die synergistische Hemmung beider Stoffe auf die Proteinkinase C und damit ihren pro-apoptotischen Effekt. 1990 belegte Hofmann seine Aussage mit einer zweiten Arbeitsgruppe durch In-Vivo-Versuche an Mäusen, denen er humane Bronchialkarzinom-Zellen (LXFL529) eingepflanzt hatte. Als verträgliche Dosis für die Mäuse ergab sich eine Kombination von 20 mg Quercetin und 3 mg cDDP/3mal täglich. Die Reduzierung der Tumormasse war signifikant höher als bei alleiniger Cisplatinbehandlung (104). In die gleiche Richtung zielte die Arbeit von Cipak *et al.*, die 2003 drei Flavonoide testeten, darunter Quercetin ebenfalls als pro-apoptotisch beschrieben, und dies mit einer Steigerung der Cisplatin-induzierten Apoptose an der humanen Zelllinien HL-60 aus Promyelozyten und der Mäuse-Leukämiezelllinie L1210 bewiesen. Als Apoptosemaß wurde die Quantität der DNA-Fragmentation nach der Methode von Rauko *et al.* bestimmt. Alleinige Flavonoidbehandlung ergab keinerlei Einfluss auf die DNA-Fragmentation. Dass die Flavonoide nicht alle dieselbe Wirkung entfalten, zeigten die

Autoren an Galangin, welches im Gegensatz zu Quercetin einen inhibitorischen Effekt auf die Cisplatin-induzierte Apoptose ausübt. Der Mechanismus ist für diesen Fall jedoch nicht geklärt (20).

Zuletzt wird die bereits diskutierte Inhibition der Hitzeschockprotein-Expression durch Quercetin bei gleichzeitigem Einsatz der Chemotherapeutika Etoposid und Cisplatin im Western-Blot-Verfahren untersucht werden. In den meisten Versuchsanordnungen verändern die Zytostatika die Reduktion der Hitzeschockproteine 27 und 70 durch Quercetin kaum. Allerdings findet sich bei einer Quercetin-Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  eine deutliche Zunahme der exprimierten Hitzeschockproteine 27 durch den Einsatz von 20  $\mu\text{g/ml}$  Etoposid gegenüber der Nullkontrolle. Auch 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Cisplatin erreichen eine geringe Steigerung der HSP-27-Expression, obwohl 30  $\mu\text{M}$  Quercetin eingewirkt haben. Für HSP-70 ist dieser Effekt eher bei Cisplatin zu beobachten und besonders dann, wenn gleichzeitig der 43 °C-Hitzeschock eingesetzt wird. Ab einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  scheint also das Quercetin seinen inhibitorischen Effekt auf die Hitzeschockprotein-Expression der beiden untersuchten Tumorzelllinien auszuüben. Durch den Stressfaktor Zytostatikum lässt sich bei dieser Konzentration jedoch die Expression noch auslösen. Bei Einwirken von 50  $\mu\text{M}$  Quercetin können die gewählten Konzentrationen Etoposid und Cisplatin dann keinerlei Hitzeschockprotein-Expression mehr auslösen.

Bis dato sind die Erkenntnisse über den Einfluss von Hyperthermie-Sensitizern wie Quercetin auf die Expression von Stressproteinen und die damit verbesserte Ansprechbarkeit von Tumorzellen auf Chemotherapeutika überschaubar. Jakubowicz-Gil et al. beschrieben 2002 sehr ähnliche Ergebnisse sowohl an drei Tumorzelllinien (HeLa, Hep-2 und A549) als auch an humanen Hautfibroblasten. Sie wiesen gleichzeitig nach, dass die Sensitivität der Zellen auf Zytostatika nicht nur medikamenten- und zelltypspezifisch ist, sondern auch von dem verwendeten Zellkulturmodell abhängt (18).

In der vorliegenden Arbeit lässt sich zeigen, dass die Ansprechbarkeit von malignen Tumorzellen des Kindes- und Jugendalters, hier Ewingsarkom, auf Zytostatika der gebräuchlichen Behandlungsschemata durch gleichzeitige Wärmeapplikation eindeutig zunimmt. Entscheidend ist hierbei die Wahl der Temperatur und die Dauer der Applikation vor dem Hintergrund des ausführlich beschriebenen Effektes der Thermotoleranz. In diesem Zusammenhang wird mittels Western-Blot-Analyse auf die Rolle der Hitzeschockprotein-expression eingegangen, die für die Tumorzellen einen physiologischen Schutzschild gegenüber exogener Stressfaktoren darstellt. Es stellt sich heraus, dass auch der Stressfaktor



Zytostatikum eine Hitzeschockprotein-Expression in den Tumorzellen auslösen kann und somit seinem gewünschten Effekt entgegensteuert. Es ist Ziel der Arbeit, einen in der Literatur bereits erwähnten Modulator, Quercetin, bezüglich seiner Wirkung auf die Hitzeschockprotein-Expression zu untersuchen. Dabei zeigt sich, dass die Expression der Hitzeschockproteine durch dieses Flavonoid bei bestimmten Konzentrationen unterdrückt werden kann. Im Vergleich der Konzentrationen des Quercetins mit den vorliegenden Angaben aus der Literatur ist in besonderem Maße die mögliche Serumkonzentration im Patienten zu beachten, denn bisher ließen sich nach oraler Aufnahme nur geringfügigere Konzentrationen messen, als für einen in dieser Testreihe nachgewiesenen positiven Effekt zu wünschen wäre. Einen Anfang macht die Phase-I-Studie von Ferry *et al* 1996 (56).

Inwieweit der Einsatz therapeutischer Dosierungen des Quercetins in Kombination mit Chemotherapie und/oder Hyperthermie die Gesamttoxizität für den Patienten erhöhen kann, bedarf weiterer Abklärung. Vor einer klinischen Anwendung des Quercetins in effektiver Wirkkonzentration sollten deshalb im Rahmen von weiteren Dosiseskaltationsstudien die zytotoxischen Nebenwirkungen bei gleichzeitiger Gabe von systemischer Chemotherapie durchgeführt werden. Des weiteren finden sich in der Literatur noch weitere sogenannte „Sensitizer“ neben den Flavonoiden, denen in Bezug auf die Hitzeschockprotein-Expression eine modulatorische Wirkung nachgesagt wird, z. B. das Bimoclomol (Nature Medicine 1997, 76).

## **6. Zusammenfassung**

Mit der Wiederentdeckung der Hyperthermie als adjuvante Behandlungsmethode zur Chemo- und Radiotherapie der malignen Tumoren ist die medizinische Wissenschaft hinsichtlich effektiver Verbesserungsstrategien gefragt. Das genaue Verständnis der molekularen biologischen Vorgänge sowie die möglichen therapeutischen Interventionen sind dabei Kernpunkte der Forschung. In der vorliegenden Arbeit wird zum einen der Zusammenhang zwischen dem Phänomen der Thermotoleranz und der Expression von Hitzeschockproteinen (HSPs) untersucht, zum anderen soll die Einflussnahme sogenannter Thermosensitizer wie dem Bioflavonoid Quercetin als Therapieoption dargestellt werden.

Anhand des XTT-Zytotoxizitätstestes werden die Überlebensraten der Ewingsarkom-Zelllinien SK-ES-1 und RD-ES auf verschiedene Hyperthermiefrequenzen von 42 °C bis 45 °C in Kombination mit einstündigen Chemobehandlungen des Schwermetallkomplexes Cis-Diammindichloroplatin II (Cisplatin) sowie des Topoisomerase-II-hemmers VP16 (Etoposid) gemessen. Des Weiteren wird der erzielte Effekt auf die Entwicklung der Hitzeschockproteine HSP 27 und der induzierbaren Form des HSP 70 mit Hilfe des Western-Blot-Verfahrens dargestellt. In einem weiteren Schritt wirken unterschiedliche Dosierungen des Quercetins 24 Stunden vor Chemotherapie sowohl ohne als auch mit einer einstündigen 42 °C-Behandlung auf die Tumorzellen ein.

Es zeigt sich, dass eine moderate Hyperthermie-Vorbehandlung (eine Stunde 42 °C) der Zelllinien SK-ES-1 und RD-ES eine Resistenzentwicklung gegenüber alleinigem Hitzeschock oder kombinierter Zytostatikatherapie erzielt, die sogenannte Thermotoleranz. Quercetin kann nun in höheren Dosierungen die Zellproliferation hemmen, den zytostatischen Effekt erhöhen und vor allem die Entwicklung der Thermotoleranz negativ beeinflussen. Ein Hitzeschock von 43 °C oder 45 °C induziert hohe Mengen von HSP 70, wohingegen HSP 27, welches bereits unter normothermischen Bedingungen exprimiert wird, lediglich bei 43 °C leicht erhöht und bei 45 °C nahezu nicht mehr nachweisbar ist. Die Induktion der Thermotoleranz beruht unter anderem auf der vermehrten Expression der Hitzeschockproteine HSP 27 und HSP 70. Es kann nachgewiesen werden, dass der Einsatz höherer Dosen Quercetin, alleine oder in Kombination mit Thermochemotherapie, die Expression beider HSPs unterdrücken kann.

Es gilt nun, die Möglichkeiten des klinischen Einsatzes des Pflanzenstoffes Quercetin anhand von weiteren wissenschaftlichen Arbeiten zu erforschen, um die Effektivität der Hyperthermie in der Behandlung maligner Tumoren zu erhöhen.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Riess H, Felix R and Schlag PM: Hyperthermia in combined treatment of cancer. *THE LANCET Oncology*, Vol 3, 2002
2. Wessalowski R, Schilling N, Kruck H, Pape H, Kahn T, Willnow U and Göbel U: Hyperthermie in Kombination mit Chemotherapie und Strahlentherapie. *Klinische Onkologie '94/'95*, 67-72
3. Wessalowski R, Kruck H, Pape H, Kahn T, Willers R and Göbel U: Hyperthermia for the Treatment of Patients with Malignant Germ Cell Tumors. *Cancer*, Vol 82, Nr. 4, 1998
4. Wessalowski R, van Heek-Romanowski R, Issels RD, Jürgens HT and Göbel U: Estimated number of children with cancer eligible for hyperthermia based on population- and treatment-related criteria. *Int. J. Hyperthermia*, Vol. 15, No. 6, 455-466, 1999
5. Wessalowski R, Blohm M, Calaminus G, Engert J, Harms D, Krause I, Kruck H, Grüttner HP, Pape H and Göbel U: Treatment Results in Children and Adolescents with loco-regional Recurrences of abdominal Germ-Cell Tumors. *Klin. Pädiatr.* 209, 250-256, 1997
6. Rommel F: Zellkinetische Untersuchungen nach Thermochemotherapie an der humanen Ewingsarkom-Zelllinie SK-ES-1. *Dissertation HHU Düsseldorf*, 1999
7. Hosokawa N et al: Flavonoids Inhibit the Expression of Heat Shock Proteins. *Cell Structure and Function* 15, 393-401, 1990
8. Hosokawa N et al: Inhibition of the Activation of Heat Shock Factor In Vivo and In Vitro by Flavonoids. *Mol. Cell. Biol.* p. 3490-3498, 1992

9. Wei YQ, Zhao X, Kariya Y, Fukata H, Teshgawara K, Ulchida A: Induction of apoptosis by quercetin: Involvement of heat shock protein. *Cancer Res* 54, 4952-4957, 1994
10. Kim JH, Kim SH, Alfieri AA, Young CW: Quercetin, an inhibitor of lactate transport and a hyperthermic sensitizer of HeLa cells. *Cancer Res* 44, 102-106, 1984
11. Lechpammer S, Asea A, Mallick R, Zhong R, Sherman MY, Calderwood SK: Development of an XTT tetrazolium salt-based assay for detection of specific hyperthermia sensitizers in a high-flux screening programme. *Int. J. Hyperthermia*, Vol. 18, No. 3, 203-215, 2002
12. Li GC, Mivechi NF, Weitzel G: Heat shock proteins, thermotolerance, and their relevance to clinical hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia*, Vol. 11, No. 4, 459-488, 1995
13. Xu M, Wright WD, Higashikubo R, Roti Roti J: Intracellular distribution of hsp70 during long duration moderate hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia*, Vol. 14, No. 2, 211-225, 1998
14. Samali A, Holmberg CI, Sistonen L, Orrenius S: Thermotolerance and cell death are distinct cellular responses to stress dependence on heat shock proteins. *FEBS Letters* 461, 306-310, 1999
15. Beresford PJ, Jaju M, Friedman RS, Yoon MJ, Lieberman J: A Role for Heat Shock Protein 27 in CTL-Mediated Cell Death. *J. Immunol*, 161-167, 1998
16. Wissing D, Jäättelä: HSP27 and HSP70 increase the survival of WEHI-S cells exposed to hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia*, Vol. 12, No. 1, 125-138, 1996
17. Poccia F, Piselli P, Vendetti S, Bach S, Amendola A, Placido R, Colizzi V: Heat-shock protein expression on the membrane of t cells undergoing apoptosis. *Immunology* 88, 6-12, 1996

18. Jakubowicz-Gil J, Paduch R, Gawron A, Kandefer-Szerszen M: The effect of heat shock, cisplatin, etoposide and quercetin on Hsp27 expression in human normal and Tumour cells. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, Vol. 40, No. 1, pp. 31-35, 2002
19. Hettinga JVE, Lemstra W, Meijer C, Los G, De Vries EGE, Konings AWT, Kampinga HH: Heat-Shock Protein Expression in Cisplatin-Sensitive and -Resistant Human Tumor Cells. *Int. J. Cancer* 67, 800-807, 1996
20. Cipak L, Rauko P, Miadokova E, Cipakova I, Novotny L: Effects of flavonoids on cisplatin-induced apoptosis of HL-60 and L1210 leukemia cells. *Leukemia Research* 27, 65-72, 2003
21. Piantelli M, Tatone D, Castrilli G, Savini F, Maggiano N, Larocca LM, Ranelletti FO, Natali PG: Quercetin and tamoxifen sensitize human melanoma cells to hyperthermia. *Melanoma Research* 11, pp.469-476, 2001
22. Asea A, Ara G, Teicher BA, Stevenson MA, Calderwood SK: Effects of the flavonoid drug Quercetin on the response of human prostate tumours to hyperthermia invitro and in vivo. *Int. J. Hyperthermia*, Vol. 17, No. 4, 347-356, 2001
23. Gorman AM, Heavey B, Creagh E, Cotter TG, Samali A: Antioxidant-mediated inhibition of the heat shock response leads to apoptosis. *FEBS Letters* 445, 98-102, 1999
24. Elia G, Santoro MG: Regulation of heat shock protein synthesis by quercetin in human erythroleukaemia cells. *Biochem. J.* 300, 201-209, 1994
25. Jakubowicz-Gil J, Rzymowska J, Gawron A: Quercetin, apoptosis, heat shock. *Biochemical Pharmacology* 64, 1591-1595, 2002
26. Lindquist S, Craig EA.: The heat shock response. *Ann Rev Genet*, 22, 631-677,1988
27. K.J. Fuller, R.D. Issels, D.O. Slosman, J.-G. Guillet, T. Soussi and B.S. Polla: Cancer and the Heat Shock Response. *Eur J Cancer* (England, 30A(12) p1884-91), 1994

28. Morimoto RI, Tissères A, Georgopolous C, eds. Stress Proteins in Biology and Medicine. *Laboratory Press, Cold Spring Harbour*, 1990
29. Milarski KL, Welch WJ, Morimoto RI. Cell cycle-dependent association of hsp70 with specific cellular proteins. *J Cell Biology*, 108, 413-423, 1989
30. Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571-573, 1962
31. Kregel KC. Invited Review: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* 92:2177-2186, 2002
32. Arrigo, A-P and Landry, J. Expression and function of the low molecular weight heat shock proteins. In: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. R. Morimoto, A. Tissières and C. Georgopopoulos, eds. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press). pp. 335-373, 1994
33. Jakob U, Gaestel M, Engels K, Buchner J. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* 268, 1517-1520, 1993
34. Ingolia TD, and Craig E. Four small *Drosophila* heat shock proteins are related to each other and to mammalian alpha-crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2360-2364
35. Arrigo A-P. Small Stress Proteins: Chaperones that Act as Regulators of Intracellular Redox State and Programmed Cell Death. *Biol. Chem.*, Vol. 379, pp. 19-26, 1998
36. Kiang JG and Tsokos GC. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry and physiology. *Pharmacol Ther* 80: 183-201, 1998
37. Mizzen LA and Welch WJ. Characterization of the thermotolerant cell. I. Effects on protein synthesis activity and the regulation of heat-shock 70 expression. *J Cell Biol* 106: 1105-1116, 1988

38. Pelham HR. Heat shock and the sorting of luminal ER proteins. *EMBO J.* 8, 3171-3176, 1989
39. Multhoff G, Botzler C, Issels R. The role of Heat Shock Proteins in the Stimulation of an Immune Response. *Biol Chem*, Vol. 379, pp. 295-300, 1998
40. Landry J, Bernier D, Chretien P, Nicole LM, Tanguay RM, and Marceau N. Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance. *Cancer Res* 42: 2457-2461, 1982
41. Weshler Z, Kapp DS, Lord PF, and Hayes T. Development and decay of systemic thermotolerance in rats. *Cancer Res* 44: 1347-1351, 1984
42. Urano M. Kinetics of thermotolerance in normal and tumor tissues; a review. *Cancer Res* 46: 474-482, 1986
43. Hall DM, Oberley TD, Moseley PL, Buettner GR, Oberley LW, Weindruch R, and Kregel KC. Caloric restriction improves thermotolerance and reduces hyperthermia-induced cellular damage in old rats. *FASEB J* 14: 78-86, 2000
44. Moseley PL. Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism. *J Appl Physiol* 83: 1413-1417, 1997
45. Flanagan SW, Ryan AJ, Gisolfi CV, and Moseley PL. Tissue-specific HSP70 response in animals undergoing heat stress. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 268: R28-R32, 1995
46. Johnston RN and Kucey BL. Competitive inhibition of hsp70 gene expression causes thermosensitivity. *Science* 242: 1551-1554, 1988
47. Swain T. *The Flavonoids*. London: Chapman and Hall, 1975
48. Anton R. *Flavonoids and Traditional Medicine*. New York: Alan R. Liss, Inc., 1988

49. Kuhnau J. The Flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.* 24: 117-191, 1976
50. Bitsch, R. Pflanzenphenole und ihre gesundheitliche Wirkung. *Naturw Rdsch* 49: 47-51, 1996
51. Herrmann, K. Flavonols and flavones in food plants: a review. *J. Food Technol.* 11, S. 433-438, 1976
52. Block G, Patterson B, Subar A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer* 18: 1-29, 1992
53. Hollman PC, Feskens EJ, Katan MB. Tea flavonols in cardiovascular disease and cancer epidemiology. *Proc Soc Exp Biol Med* 220(4), 198-202, 1999
54. Hollmann PC, Katan MB. Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Arch Toxicol Suppl* 20, 237-248, 1998
55. Scalbert A, Williamson G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols, *J. Nutr.* 130 (8S Suppl), 2073S-85S, Review, 2000
56. Ferry DR, Smith A, Malkhandi J, Fyfe DW, deTakats PG, Anderson D, Baker J and Kerr DJ. Phase I Clinical Trial of the Flavonoid Quercetin: Pharmacokinetics and Evidence for in Vivo Tyrosine Kinase Inhibition. *Clin Cancer Res*, Vol. 2: 659-668, 1996
57. Watzl B, Rechkemmer G. Flavonoide, *Ernährungs-Umschau* 48, Heft 12, 2001
58. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* 33, S. 1061-1080, 1995
59. Loehrer P, Einhorn L. Drugs Five Years Later: Cisplatin. *Ann. Intern. Med.* 100, 704-713, 1984



60. Hayes D, Cvitkovic E, Golbey RB, Scheiner E, Helson L, Krakoff IH. High Dose cis-Platinum diammine dichloride: Amelioration of Renal Toxicity by Mannitol Diuresis, *Cancer* 39, 1372-1381, 1977
61. Ribaud P, Gouveia J, Bonnay M, Mathe G. Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics of cis-Platinum and Analogs, *Canc. Treat. Rep.* 65 Suppl.3, 97-105, 1981
62. Bacci G, Picci P, Ferrari S, Forni C, et al. Neoadjuvant chemotherapy for Ewing's sarcoma of bone. *Cancer* 15, 1174-1183, 1998
63. Ewing J. Diffuse endothelioma of bone. *Proc N Y Path So.* 21, 17-24, 1921
64. Van Valen F. Ewing's Sarcoma Family of Tumors. In J.R.W. Masters and B. Palsson (eds.), *Human Cell Culture* Vol. 1, 55-85, 1999
65. Creutzig U, Henze G, Bielack S, Herold R, Kaatsch P, Klussmann JH, Graf N, Reinhardt D, Schrappe M, Zimmermann M, Juergens H. Krebserkrankungen bei Kindern – Erfolg durch einheitliche Therapiekonzepte seit 25 Jahren, *Dtsch. Aerzteblatt*, 100, 13, A842-852, März 2003
66. Kaatsch P, Haaf G, Michaelis J: Childhood malignancies in Germany--methods and results of a nationwide registry. *Eur J Cancer* 31A(6):993-9, 1995
67. Ambros IM, Ambros PF, Strehl S et al.: MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration. *Cancer* 67, 1886, 1991
68. Schmidt D, Hermann C, Jürgens H et al.: Malignant peripheral neuroectodermal tumor and its necessary distinction from Ewing's sarcoma: A report from the Kiel Pediatric Tumor Registry. *Cancer* 68, 2251, 1991

69. Wessalowski R, Jürgens H, Bodenstern H, Brandeis W, Gutjahr P, Havers W, Huckels-Klasen ML, Kotz R, Kuhl J, Salzer-Kuntschik M et al.: Results of treatment of primary metastatic Ewing sarcoma. Retrospective analysis of 48 patients. *Klin Padiatr*, 200(3):253-60, 1988
70. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65: 55-63, 1983
71. Scudiero, D. A. et al., Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Research* 48, 4827-4833 1988
72. Bradford, M., *Anal. Biochem.*, 72, 248 1976
73. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T., *Nature* 227, 680-685, 1970
74. Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose: procedure and some applications. *J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4350-4354, 1979
75. Harlow, E., Lane, D. Antibodies: laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory (1988) –XIII, 726 S
76. Vigh L, Literati PN, Horvath I, Torok Z, Balogh G, Glatz A, Kovacs E, Boros I, Ferdinandy P, Farkas B, Jaszlits L, Jednakovits A, Koranyi L and Maresca B: Bimoclomol: A nontoxic, hydroxylamine derivative with stress protein-inducing activity and cytoprotective effects. *Nature Medicine*, Vol. 3, No. 10, 1150-1154, 1997
77. Thies U: Thermo-Chemosensibilitätstestung an der humanen Ewing-Sarkomzelllinie VH-64. *Dissertation an der HHU Düsseldorf*, 1996

78. Breise M: Frühzeitige Einflüsse von Chemotherapie alleine oder in Kombination mit Hyperthermie auf den Zellzyklus der humanen Ewing-Sarkomzelllinie SK-ES-1. *Dissertation an der HHU Düsseldorf*, 1999
79. Böhm V, Bitsch R: Antioxidative Aktivität von Frucht- und Gemüsekonzentration. *Nutrifood-complex.de*, 2000
80. Calderwood SK, Asea A: Targeting HSP70-induced thermotolerance for design of thermal sensitizers. *Int. J. Hyperthermia*, Vol. 18, No. 6, 597-608, 2002
81. Choi JA, Kim JY, Lee JY, Kang CM, Kwon HJ, Yoo YD, Kim T: Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *International J. Oncology* 19, 837-844, 2001
82. Erlund J, Kosonen T, Alfthan G, Mäenpää J, Perttunen K, Kenraali J, Parantainen J, Aro A: Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 56, 545-553, 2000
83. Galen WP : Hyperthermia and chemotherapy. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1990
84. Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ: Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin. Biochemistry* 36, 79-87, 2003
85. Harper A, Kerr DJ, Gescher A, Chipman JK: Antioxidant Effects of Isoflavonoids and Lignans, and Protection against DNA Oxidation. *Free Rad. Res.*, Vol. 31, pp. 149-160, 1999
86. Hayashi S, Kano E, Tsuji K, Furukawa-Furuya M, Yoshikawa S, Hatashita M, Matsumoto H, Jin ZH, Ohtsubo T, Kitai R: Modification of thermosensitivity and chemosensitivity induced by combined treatments with hyperthermia and adriamycin. *Int. J. Molecular Medicine* 8, 417-422, 2001
87. Hettinga JVE, Konings A: Reduction of cellular cisplatin resistance by hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia*, 1997

88. Ito A, Shinkai M, Honda H, Yoshikawa K, Saga S, Wakabayashi T, Yoshida J, Kobayashi T: Heat shock protein 70 expression induces antitumor immunity during intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles. *Cancer Immunol. Immunother.* 52, 80-88, 2003
89. Jäättelä M: Escaping Cell Death: Survival Proteins in Cancer. *Exp. Cell Res.* 248, 30-43, 1999
90. Kessler M, Jung L: Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *J. Pharmacy and Pharmacology* 55, 131-142, 2003
91. Kobayashi T, Nakata T, Kuzumaki T: Effect of flavonoids on cell cycle progression in prostate cancer cells. *Cancer Letters* 176, 17-23, 2002
92. Kudo M, Naito Z, Yokoyama M, Asano G: Effects of Quercetin and Sunphenon on Responses of Cancer Cells to Heat Shock Damage. *Experimental and Molecular Pathology* 66, 66-75, 1999
93. Lee YJ, Erdos G, Hou ZZ, Kim SH, Kim JH, Cho JM, Corry PM: Mechanism of Quercetin-induced suppression and delay of heat shock gene expression and thermotolerance development in HT-29 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 137, 141-154, 1994
94. Leitlinien Pädiatrische Onkologie/Hämatologie: Therapie des Ewing-Sarkoms, *AWMF Online*, 2003
95. Melcher A, Todryk S, Hardwick N, Ford M, Jacobson M, Vile RG: Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression. *Nature Medicine*, Vol. 4, No. 5, 581-587, 1998
96. Multhoff G, Hightower LE: Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response. *Cell stress and Chaperones* 1 (3), 167-176, 1996

97. Multhoff G: Activation of natural killer cells by heat shock protein 70. *Int. J. Hyperthermia*, Vol. 18, No. 6, 576-585, 2002
98. Schuck A, Ahrens S, Paulussen M, Kuhlen M, Könemann S, Rube C, Winkelmann W, Kotz R, Dunst J, Willich N, Juergens H: Local Therapy in Localized Ewing Tumors: Results of 1058 Patients treated in the CESS 81, CESS 86, and EICESS 92 Trials. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, Vol. 55, No. 1, pp. 168-177, 2003
99. Spencer JPE, Kuhnle GGC, Williams RJ, Rice-Evans C: Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. *Biochem. J. Immediate Pub.*, 2003
100. Debes A, Rommel F, Breise M, Willers R, Göbel U and Wessalowski R: In vitro test-system for chemo- and thermosensitivity: an analysis of survival fractions and cell-cycle distributions in human Ewing's sarcomas as a model for tumours in pediatric oncology. *Klin. Pediatr.*, 214, 223-229, 2002
101. Richards EH, Hickey E, Weber L, Master JR: Effect of overexpression of the small heat shock protein on the heat and drug sensitivities of human testis tumor cells. *Cancer Res.* 56,2446-2451, 1996
102. Scambia G, Ranelletti FO, Benedetti PP, Piantelli M, Bonanno G, De Vincenzo R, Ferrandina G, Rumi C, Larocca LM and Mancuso S: Inhibitory effect of quercetin on OVA 433 cells and presence of type II oestrogen binding sites in primary ovarian tumours and cultured cells. *Br. J. cancer* 62, 942-946, 1990
103. Hofmann J, Doppler W, Jakob A, Maly K, Posch L, Uberall F, et al.: Enhancement of the antiproliferative effect of cis-diamminedichloro-platinum(II) and nitrogen mustard by inhibitors of protein kinase C. *Int. J. Cancer* 42, 382, 1988
104. Hofmann J, Fiebig HH, Winterhalter BR, Berger DP, Grunicke H: Enhancement of the antiproliferative activity of cis-diamminedichloroplatinum(II) by quercetin. *Int. J. Cancer* 45, 536, 1990

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Name: Oerding  
Vorname: Matthias  
Geburtsdatum: 14.05.1976  
Geburtsort: Münster/Westfalen  
Nationalität: Deutsch  
Konfession: Römisch-katholisch  
Anschrift: Paul-Esser-Strasse 6a, 47608 Geldern  
Familienstand: Verheiratet mit Tanja Oerding, geb. Hornen  
Eltern: Dr. med. Hanns-Udo Oerding, praktischer Arzt  
Elke Oerding, geb. Schübel, exam. Krankenschwester

### **Schulbildung:**

1982-1986 Mariengrundschule in Kapellen/Geldern  
1986-1995 Friedrich-Spee-Gymnasium in Geldern  
1995 Abitur

### **Hochschulbildung:**

1996-2003 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität  
in Düsseldorf  
1998 Ärztliche Vorprüfung  
1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### **Praktisches Jahr:**

2002-2003 Hospital zum Heiligen Geist in Kempen, Niederrhein

### **Arzt im Praktikum:**

2003-2004 St. Clemens-Hospital in Geldern, Niederrhein

Z. Zt. Weiterbildung zum Facharzt für Allgemeinmedizin

## **Abstract:**

Mit der Wiederentdeckung der Hyperthermie als adjuvante Behandlungsmethode zur Chemo- und Radiotherapie der malignen Tumoren ist die medizinische Wissenschaft hinsichtlich effektiver Verbesserungsstrategien gefragt. Das genaue Verständnis der molekularbiologischen Vorgänge sowie die möglichen therapeutischen Interventionen sind dabei Kernpunkte der Forschung. In der vorliegenden Arbeit wird zum einen der Zusammenhang zwischen dem Phänomen der Thermotoleranz und der Expression von Hitzeschockproteinen (HSPs) untersucht, zum anderen soll die Einflussnahme sogenannter Thermosensitizer wie dem Bioflavonoid Quercetin als Therapieoption dargestellt werden.

Anhand des XTT-Zytotoxizitätstestes werden die Überlebensraten der Ewingsarkom-Zelllinien SK-ES-1 und RD-ES auf verschiedene Hyperthermiefrequenzen von 42 °C bis 45 °C in Kombination mit einstündigen Chemobehandlungen des Schwermetallkomplexes Cis-Diammindichloroplatin II (Cisplatin) sowie des Topoisomerase-II-hemmers VP16 (Etoposid) gemessen. Des Weiteren wird der erzielte Effekt auf die Entwicklung der Hitzeschockproteine HSP 27 und der induzierbaren Form des HSP 70 mit Hilfe des Western-Blot-Verfahrens dargestellt. In einem weiteren Schritt wirken unterschiedliche Dosierungen des Quercetins 24 Stunden vor Chemotherapie sowohl ohne als auch mit einer einstündigen 42 °C-Behandlung auf die Tumorzellen ein.

Es zeigt sich, dass eine moderate Hyperthermie-Vorbehandlung (eine Stunde 42 °C) der Zelllinien SK-ES-1 und RD-ES eine Resistenzentwicklung gegenüber alleinigem Hitzeschock oder kombinierter Zytostatikatherapie erzielt, die sogenannte Thermotoleranz.. Quercetin kann nun in höheren Dosierungen die Zellproliferation hemmen, den zytostatischen Effekt erhöhen und vor allem die Entwicklung der Thermotoleranz negativ beeinflussen. Ein Hitzeschock von 43 °C oder 45 °C induziert hohe Mengen von HSP 70, wohingegen HSP 27, welches bereits unter normothermischen Bedingungen exprimiert wird, lediglich bei 43 °C leicht erhöht und bei 45 °C nahezu nicht mehr nachweisbar ist. Die Induktion der Thermotoleranz beruht unter anderem auf der vermehrten Expression der Hitzeschockproteine HSP 27 und HSP 70. Es kann nachgewiesen werden, dass der Einsatz höherer Dosen Quercetin, alleine oder in Kombination mit Thermochemotherapie, die Expression beider HSPs unterdrücken kann.

Es gilt nun, die Möglichkeiten des klinischen Einsatzes des Pflanzenstoffes Quercetin anhand von weiteren wissenschaftlichen Arbeiten zu erforschen, um die Effektivität der Hyperthermie in der Behandlung maligner Tumoren zu erhöhen.