



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Kombinationen von HDAC- und HSP90- Inhibitoren zur Erhöhung der Cisplatin- Sensitivität von Ovarialkarzinomzellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ana Julieta Rodrigues Moita
aus Bremen

Düsseldorf, Dezember 2016

aus dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent:

Prof. Dr. Matthias U. Kassack

Korreferent:

Prof. Dr. Holger Gohlke

Tag der mündlichen Prüfung: 07.02.2017

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die meisten Methoden, die zur Anfertigung dieser Arbeit erforderlich waren, wurden von mir ausgeführt.

Der HDAC Inhibitor LMK235 sowie die getesteten LSK- und DDK-Substanzen wurden freundlicherweise vom Arbeitskreis von Prof. Kurz vom Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie zur Verfügung gestellt.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder einer ähnlicher Form bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

(Ana Moita)

Für Alexandra

(beide: Nana & Sandra)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Publikationen	V
Abkürzungen	VI
1 Abstract	1
2 Zusammenfassung	3
3 Einleitung	5
3.1 Ovarialkarzinome und ihre Therapie	5
3.1.1 Charakterisierung, Diagnose und Therapie des Ovarialkarzinoms	5
3.1.2 Resistenzentwicklung gegenüber platinhaltigen Therapien	8
3.2 Histon-Deacetylasen	12
3.2.1 Aufbau und Aufgaben von HDAC	12
3.2.2 Histon-Deacetylase-Inhibitoren	14
3.2.3 Resistenzen gegenüber HDACi	18
3.3 Hitzeschockprotein 90	20
3.3.1 Aufbau und Aufgaben des HSP90-Proteins	20
3.3.2 HSP90-Inhibitoren	23
3.3.3 Posttranslationale Beeinflussung der HSP90-Aktivität	28
4 Zielsetzung	31
5 Materialien und Methoden	32
5.1 Reagenzien, Chemikalien und Nährmedien	32
5.2 Antikörper	36
5.3 Verbrauchsmaterialien	37
5.4 Geräte	38
5.5 Programme und Software	40
5.6 Puffer und Lösungen	41

5.6.1	Zellkultur	41
5.6.2	BCA Protein Assay.....	41
5.6.3	Elektrophoresen	42
5.6.4	Western Blot.....	43
5.6.5	MTT Assay.....	43
5.6.6	Apoptose Assay	44
5.6.7	Zellzyklusanalyse	45
5.6.8	Membranintegrität	45
5.6.9	Luciferase-Rückfaltungs-Assay.....	46
5.7	Zelllinien	48
5.8	Methoden	49
5.8.1	Zellkultivierung	49
5.8.2	Zellzählung	50
5.8.3	Bestimmung der Verdopplungszeit.....	50
5.8.4	Generierung cisplatinresistenter Zelllinien.....	51
5.8.5	MTT-Zellviabilitätsassay.....	52
5.8.6	Luciferase-Rückfaltungs-Assay.....	54
5.8.7	Proteinisolierung.....	56
5.8.8	Proteinbestimmung mittels BCA Assay	56
5.8.9	SDS-PAGE	56
5.8.10	Western Blot.....	58
5.8.11	HSP90-Dimerisierungsassay	59
5.8.12	Apoptose Assay	59
5.8.13	Zellzyklusanalyse	61
5.8.14	Bestimmung der Membranintegrität.....	63
5.8.15	Bestimmung des Mitochondrienpotentials	64
5.8.16	Statistik.....	66

6	Ergebnisse	68
6.1	Cisplatinsensitivität von Ovarialkarzinomen.....	68
6.2	HDAC Inhibitoren	69
6.2.1	Zytotoxische Effekte der HDACi.....	69
6.2.2	Beeinflussung der Cisplatinsensitivität durch HDACi.....	71
6.2.3	Untersuchungen zum cisplatinsensitivierenden Effekt der HDACi.....	75
6.2.4	Beeinflussung der Resistenzentwicklung	81
6.2.4.1	Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin.....	81
6.2.4.2	Resistenzentwicklung gegenüber HDACi.....	84
6.2.5	Charakterisierung des potentiellen HDACi DDK137	88
6.3	HSP90-Inhibitoren	92
6.3.1	Zytotoxische Effekte der HSP90i.....	92
6.3.2	Beeinflussung der Cisplatinsensitivität durch HSP90i.....	94
6.3.3	Untersuchungen zum cisplatinsensitivierenden Effekt der HSP90i.....	96
6.3.4	Beeinflussung der Resistenzentwicklung durch HSP90i.....	107
6.3.5	Potentielle HSP90i.....	109
6.3.5.1	Etablierung des Luciferase-Rückfaltungs-Assays.....	109
6.3.5.2	Trispyrimidonamide als HSP90i	116
6.3.5.3	α -Aminoxyoligopeptide als HSP90i	130
6.4	Kombinationen von Inhibitoren zur Beeinflussung der Cisplatinsensitivität	139
6.4.1	HSP90i mit IGF-1R-Modulatoren	139
6.4.2	HSP90i mit PI3K-Modulatoren	143
6.4.3	HSP90i und HDACi	148
6.4.3.1	Gegenseitige Beeinflussung der Zytotoxizität	150
6.4.3.2	Erhöhung der Cisplatinsensitivität durch die Kombination von HDACi und HSP90i.....	155

6.4.3.3	Beeinflussung der funktionellen Aktivität von HSP90 durch die Kombination von HDACi und HSP90i	164
6.4.3.4	HSP90i in Kombination mit DDK137	166
7	Diskussion	168
7.1	Beeinflussung der Cisplatinresistenz	168
7.2	Charakterisierung neuer Wirkstoffe.....	179
	Literaturverzeichnis	183

Publikationen

Originalarbeit

Diedrich, D., **Moita, A. J. R.**, Rüter, A., Frieg, B., Reiss, G. J., Hoepfner, A., Kurz, T., Gohlke, H., Lüdeke, S., Kassack, M. U. & Hansen, F. K. **2016**. α -Aminoxy Oligopeptides: Synthesis, Secondary Structure, and Cytotoxicity of a New Class of Anticancer Foldamers. *Chemistry – A European Journal*, 17600-17611.

Submitted

Moita, A. J. R., Hamacher, A., Hansen, F. K., Kurz, T., Kassack, M.U. Priming with HDAC inhibitors sensitizes ovarian cancer cells to treatment with cisplatin and HSP90 inhibitors. 2016

In preparation

Bhatia, S., Diedrich, D., Frieg, B., Stein, S., Bopp, B., Lang, F., Ernst, T., Kögler, G., Krieg, A., Lüdeke, S., **Moita, A. J. R.**, Kassack, M. U., Marquardt, V., Remke, M., Grez, M., Hochhaus, A., Borkhardt, A., Jose, J., Kurz, T., Gohlke, H., Hansen, F. K., Hauer, J. Targeting HSP90's C-terminus is effective in Imatinib resistant CML and lacks heat shock response (HSR) induction.

Posterpräsentationen

Moita, A. J. R., Hamacher, A., Spanier, L., Kurz, T., Kassack, M. U. Inhibition of HSP90 as a tool to increase chemosensitivity towards cisplatin in the human ovarian cancer cell line A2780. 7th Mildred Scheel Cancer Conference. 17.-19. Juni 2015, Königswinter.

Moita, A. J. R., Hamacher, A., Spanier, L., Ciglia, E., Hansen, F. K., Gohlke, H., Kurz, T., Kassack, M. U. Inhibition of HSP90 as a tool to increase chemosensitivity towards cisplatin in the human ovarian cancer cell line A2780. DPhG Jahrestagung, 23.-25. September 2015, Düsseldorf.

Abkürzungen

17-AAG	17-Allylaminio-geldanamycin, auch Tanespimycin
17-DMAG	17-Dimethylaminoethylamino-demethoxygeldanamycin, auch Alveuspimycin
ABCC2	ATP-binding cassette subfamily C, member 2
ADP	Adenosindiphosphat
Aha1	activator of HSP90 ATPase homologue 1
Akt	Proteinkinase B
AP	Apoptoseinduktion
APAF1	Apoptotic peptidase activating factor 1
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
Bad	Bcl-2 antagonist of cell death
Bak	Bcl-2 antagonist/killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
Bcl-X _L	B-cell lymphoma-extra large
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
Bim	Bcl-2-like protein 11
Bmf	Bcl-2 modifying factor
BRCA 1/2	Breast cancer gene 1/2
BS3	Bis(sulfosuccinimidyl)suberat
BSA	bovine serum albumin
Bzw	beziehungsweise
CA-125	cancer antigen 125

CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon
Cdc37	cell division cycle 37
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CI	Kombinationsindex
CT	Computertomografie
CTR1	Copper Transporter 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGCG	Epigallocatechingallat
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGS	Ethylene-glycol-di(N-succinimidylsuccinate)
ErbB2	Epidermal growth factor receptor 2 (auch: Her2)
ErbB3	Epidermal growth factor receptor 3
ErbB4	Epidermal growth factor receptor 4
ERCC1	Excision Repair Cross-Complementing 1
ERK1	Extracellular signal-regulated Kinase 1
FAK	Focal Adhesion Kinase
FDA	Food and Drug Administration
FKS	fetales Kälberserum
FSC	forward scatter
GSH	Glutathion

HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HDACi	Histon-Deacetylase-Inhibitor
HOP	HSP70-HSP90 Organizing Protein
HRP	Horeseradish peroxidase (Merrettichperoxidase)
Hsf1	Hitzeschockfaktor 1
HSP90	Heat Shock Protein 90 (Hitzeschockprotein mit 90 kDa)
HSP90i	Heat Shock Protein 90 Inhibitor
HSR	Heat Shock Response
IC ₅₀	inhibitorische Konzentration bei halbmaximaler Wirkung
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IGF-1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
KI	95% Konfidenzintervall
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MD	membrane damage, d.h. Membranschädigung
MLH1	mutL homologue 1
MMR	DNA mismatch repair
MRP2	Multidrug resistance-associated protein 2
MRT	Magnetresonanztomografie
MSH2	mutS homologue 2
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
NER	Nukleotidexzisionsreparatur, nucleotide excision repair
NfκB	nuclear factor `κ-light-chain-enhancer´ of activated B-cells
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, non-small-cell lung carcinoma
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)

PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pIC ₅₀	negativer dekadischer Logarithmus des IC ₅₀
PP	Polypropylen
PTEN	Phosphatase and Tendon homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RRL	Rabbit reticulocyte Lysate
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwerts)
SSC	side scatter
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1
TBS	Tris-buffered saline (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
TBS-T	Tris-buffered saline mit Zusatz von Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TMRE	Tetramethylrhodaminethylester
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
Tricin	N-Tris(hydroxymethyl)-methyl-glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
VF	Verdünnungsfaktor
vs.	versus
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
XPF	Xeroderma Pigmentosum Complementation group F

1 Abstract

Ovarian cancer is the second most common malignant cancer of the female sexual organs. Standard therapy of ovarian cancer is a combination of carboplatin with paclitaxel. The high rate of chemoresistance is problematic since there is no standard therapy available for resistant ovarian cancer. Until now, the preservation of the quality of life from patients is decisive for therapy used in resistant ovarian cancer. Since chemoresistance is a multifactorial process, targeting of several activated signal pathways at once would be reasonable. Histone deacetylases (HDACs) and heat shock protein 90 (HSP90) are highly expressed in ovarian cancer. Histone deacetylase inhibitors (HDACi) change the expression of proteins involved in apoptosis and cell proliferation. Inhibitors of heat shock protein 90 (HSP90i) affect different pathways since HSP90 is involved in the folding of more than 280 client proteins.

In this work, the influence on cisplatin sensitivity of different modulators was investigated, mainly at the cisplatin sensitive human ovarian cancer cell line A2780 (cisplatin IC_{50} 1.88 μ M) and the resistant subclone A2780CisR (cisplatin IC_{50} 14.5 μ M). Pretreatment with HDACi or HSP90i increased cisplatin sensitivity with similar efficacy. HDACi pretreatment was accompanied by increased induction of apoptosis. A triple combination of HDACi, HSP90i, and cisplatin was not superior to dual combination of HDACi with cisplatin or HSP90i with cisplatin. Pretreatment with panobinostat achieved an almost 6-fold increase in cisplatin sensitivity in A2780 whereas in A2780CisR, preincubation with panobinostat could completely restore cisplatin sensitivity. When combining HDACi with HSP90i, the sequence of inhibitor incubation had a strong impact: preincubation with HDACi showed a 3.2-fold increase in HSP90i cytotoxicity, whereas the reversed order had no impact.

The early and continuous use of HSP90i or HDACi during cisplatin resistance development over up to 36 weeks showed – compared to the absence of inhibitors – a decrease of resistance development using the HSP90i NVP-AUY922 (cisplatin IC_{50} 7.30 μ M), whereas the HDACi panobinostat and LMK235 almost completely prevented the occurrence of resistance (no significant difference to A2780; cisplatin IC_{50} in the presence of panobinostat 5.05 μ M; cisplatin IC_{50} in the presence of LMK235 4.92 μ M).

Furthermore novel, potential C-terminal inhibitors of HSP90 were investigated. Compounds with trispyrimidonamide structure obtained single- to double-digit μ M

IC₅₀ values and inhibited HSP90. The most active compound LSK082 gave an IC₅₀ of 126 μM in a luciferase refolding assay and reduced the oligomeric HSP90 complex in favor of monomeric HSP90 as seen by western blot analysis. LSK082 further showed a 2.4-fold increase in cisplatin sensitivity. Inhibitors with a hexameric and decameric α-aminoxy oligopeptide structure displayed high cytotoxicity. The most potent decameric compound DDK79Cbz gave IC₅₀ values of 3.30 μM (A2780) and 1.70 μM (A2780CisR). Nearly all α-aminoxy oligopeptides displayed inhibition of HSP90. Beyond that, decameric α-aminoxy oligopeptides showed strong membranolysis which is made responsible for high cytotoxicity.

In summary, this work shows that the use of HDACi or HSP90i is a treatment option for cisplatin resistant ovarian cancer. Triple combination of HDACi, HSP90i, and cisplatin is not superior to dual combination of HDACi or HSP90i with cisplatin. However, triple combination may allow dose reduction of HSP90i or HDACi with possible reduction of adverse reactions but still providing equal efficacy. Furthermore, the early and permanent use of HDACi almost completely prevents the development of cisplatin resistance.

2 Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom ist die zweithäufigste bösartige Erkrankung der weiblichen Geschlechtsorgane. Die Standardtherapie des Ovarialkarzinoms besteht aus der Kombination von Carboplatin und Paclitaxel. Problematisch ist die Resistenzentwicklung gegenüber den eingesetzten Zytostatika, da eine bei Resistenzen wirksame Therapie noch nicht verfügbar ist. Bislang ist der Erhalt der Lebensqualität der Patientin ausschlaggebend für die eingesetzten Zytostatika bei resistenten Ovarialkarzinomen. Die Resistenzentwicklung ist ein multifaktorieller Prozess. Daher wäre die gleichzeitige Hemmung mehrerer aktivierter Signalwege sinnvoll. Histon-Deacetylasen (HDACs) und das Hitzeschockprotein 90 (HSP90) sind in Ovarialkarzinomen verstärkt exprimiert. Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi) verändern die Expression verschiedener an Apoptose oder Zellproliferation beteiligter Proteine. Inhibitoren von HSP90 (HSP90i) beeinflussen verschiedene Signalwege, da HSP90 an der Faltung von mehr als 280 Proteinen beteiligt ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde vorwiegend an der humanen Cisplatin-sensitiven bzw. -resistenten Ovarialkarzinomzelllinie A2780 (IC₅₀-Wert Cisplatin 1,88 µM) und A2780CisR (IC₅₀-Wert Cisplatin 14,5 µM) die Beeinflussung der Cisplatinempfindlichkeit durch verschiedene Modulatoren untersucht. Eine Vorbehandlung mit HDACi oder HSP90i erhöhte die Cisplatinempfindlichkeit gleichermaßen und ging bei HDACi mit einer Erhöhung der Apoptoseinduktion einher. Eine Tripelkombination aus HDACi, HSP90i und Cisplatin war den dualen Kombinationen aus HDACi mit Cisplatin oder HSP90i mit Cisplatin nicht überlegen. Eine Vorbehandlung mit Panobinostat erzielte an A2780 eine fast 6-fache Sensitivierung gegen Cisplatin, bei A2780CisR wurde eine vollständige Revertierung der Cisplatinresistenz beobachtet. Bei der Kombination von HSP90i mit HDACi beeinflusste die Reihenfolge der sequentiellen Gabe die Zytotoxizität der Inhibitoren. Eine Vorbehandlung mit HDACi führte zu einer 3,2-fachen Steigerung der Zytotoxizität von HSP90i, während die umgekehrte Applikationsreihenfolge keinen Effekt zeigte.

Der frühe, permanente Einsatz von HSP90i oder HDACi während der Entwicklung einer Cisplatinresistenz über bis zu 36 Wochen zeigte – im Vergleich zur Abwesenheit von Inhibitoren – für den HSP90i NVP-AUY922 eine Verringerung der Resistenzentwicklung (IC₅₀-Wert Cisplatin 7,30 µM), während die HDACi Panobinostat oder LMK235 in der

Lage waren, die Resistenzentwicklung fast vollständig zu verhindern (kein signifikanter Unterschied zur sensitiven A2780; IC₅₀ Cisplatin in Gegenwart von Panobinostat 5,05 µM bzw. in Gegenwart von LMK235 4,92 µM).

Weiterhin wurden neue, potentielle C-terminale HSP90-Inhibitoren untersucht. Substanzen mit Trispyrimidonamid-Struktur wiesen eine Zytotoxizität im ein- bis zweistelligen µM-Bereich auf und inhibierten HSP90. Die zytotoxischste Substanz LSK082 zeigte im Luciferase-Rückfaltungs-Assay einen IC₅₀-Wert von 126 µM und verringerte den oligomeren HSP90-Komplex zugunsten des HSP90-Monomers im Western Blot. LSK082 zeigte eine 2,4-fache Erhöhung der Cisplatinsensitivität. Inhibitoren mit einer hexameren oder dekameren α-Aminoxyoligopeptid-Struktur wiesen eine hohe Zytotoxizität auf. Die potenteste dekamere Substanz DDK79Cbz ergab IC₅₀-Werte von 3,30 µM (A2780) und 1,7 µM (A2780CisR). Fast alle α-Aminoxyoligopeptide zeigten eine Inhibition des HSP90-Proteins. Dekamere α-Aminoxyoligopeptide zeigten darüber hinaus membranolytische Effekte, die für die hohe zytotoxische Aktivität verantwortlich gemacht wurden.

Zusammengefasst zeigt diese Arbeit, dass der Einsatz von HDACi oder HSP90i eine Therapieoption beim Cisplatin-resistenten Ovarialkarzinom darstellen kann. Eine Tripelkombination aus HDACi, HSP90i und Cisplatin ist der dualen Kombination aus HDACi oder HSP90i und Cisplatin nicht überlegen, erlaubt aber bei gleichem Effekt wie eine duale Kombination eine Reduktion der HSP90i- bzw. HDACi-Konzentrationen mit möglicher Reduktion unerwünschter Wirkungen. Ferner verhindert ein früher und permanenter Einsatz von HDACi die Ausbildung einer Resistenz gegenüber Cisplatin fast vollständig.

3 Einleitung

3.1 Ovarialkarzinome und ihre Therapie

3.1.1 Charakterisierung, Diagnose und Therapie des Ovarialkarzinoms

3,3% aller bösartigen Neubildungen bei Frauen in Deutschland und 5,6% aller tumorassozierten Todesfälle bei Frauen sind auf Ovarialkarzinome zurückzuführen [Kaatsch et al., 2015]. Das relative 5-Jahres-Überleben steigt stetig an, liegt aktuell jedoch bei nur 41% [Wagner et al., 2013b]. Dies ist durch die unspezifischen Symptome und der daraus resultierenden sehr späten Diagnose begründet. Selten treten Ovarialkarzinome bei Frauen unter 30 Jahren auf. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt bei 58 Jahren. Risikofaktoren für das Entwickeln eines Ovarialkarzinoms sind Alter, Kinderlosigkeit bzw. Unfruchtbarkeit, polyzystische Ovarien, Hormonersatztherapie nach der Menopause (insbesondere mit Estrogenmonopräparaten), Adipositas sowie genetische Veranlagung innerhalb der Familie. Dazu zählen insbesondere Genmutationen im BRCA1 und BRCA2 Gen [Kaatsch et al., 2015] und im MSH2 oder MLH1 Gen [Cannistra, 2004]. Sind in der Familie bereits mehrere Frauen an Brust- oder Ovarialkarzinomen erkrankt, steigt das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken um das 4,6-fache an [Cannistra, 2004]. Hingegen sind die Einnahme hormoneller Ovulationshemmer, viele Geburten und eine lange Stillzeit als protektive Faktoren bekannt.

Die meist sehr spät erfolgende Diagnose des Ovarialkarzinoms (Stadium III oder IV) ist auf die diffuse klinische Symptomatik zurück zu führen. Oft führt ein Zufallsbefund zur Diagnose. Selbst Spätsymptome sind unspezifisch. Hierunter fallen die Zunahme des Leibesumfangs mit Völle- oder Fremdkörpergefühl, gekoppelt an eine Gewichtszunahme, akutes Abdomen, Unterbauchschmerzen und Zyklusirregularitäten oder postmenopausale Blutungen. Durch bildgebende Verfahren wie die Sonografie, Röntgen, Computertomografie (CT) oder Magnetresonanztomografie (MRT) kann die Diagnose bestätigt werden [Huober et al., 2010]. Bislang ist noch kein standardisiertes Screening für Ovarialkarzinome verfügbar [Yu et al., 2016]. Der überwiegende Teil der auftretenden Ovarialtumore sind Adenokarzinome. Die Klassifikation der Ovarialkarzinome wird dem intraoperativen Befund zufolge durchgeführt und erfolgt nach der FIGO-Klassifikation (siehe Tabelle 3.1). Die TNM-Klassifikation kann ebenfalls verwendet werden und stimmt meistens mit der FIGO-Klassifikation überein.

Tabelle 3.1 FIGO Klassifizierung des Ovarialkarzinoms und die 5-Jahres Überlebensrate, [Huober et al., 2010].

Stadium	Definition	5-Jahres-Überlebensrate
I	Tumor auf Ovarien begrenzt	80-90%
II	Tumor in einem/beiden Ovarien, Ausbreitung im Becken	60-80%
III	Tumor in einem/beiden Ovarien, Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder Metastasen der Leberkapsel oder Befall der retroperitonealen und/oder inguinalen Lymphknoten	20-25%
IV	Fernmetastasen außerhalb der Bauchhöhle, z.B. Leberparenchymmetastasen, zytologisch gesicherte Pleurametastasen	5-10%

Ovarialkarzinome lassen sich generell in zwei Typen einteilen, was die Heterogenität der Tumorentität berücksichtigt. So werden Typ I Tumore, durch langsames Wachstum, klarzellige, seröse und endometroide Karzinome und gute Diagnose durch transvaginalen Ultraschall charakterisiert. Der Typ I weist eine relative genetische Stabilität auf und ist lediglich für 10% der Todesfälle durch Ovarialkarzinome verantwortlich. Unter den Typ II Ovarialkarzinomen werden aggressive, schnell wachsende, undifferenzierte Ovarialkarzinome zusammengefasst. Diese Tumortypen haben eine hohe chromosomale Instabilität und sind für 90% der Todesfälle durch Ovarialkarzinome verantwortlich. Die späte Diagnose der Typ II Tumore trägt ebenfalls zu der hohen Sterblichkeitsrate bei [Kurman and Shih Ie, 2011]. Das Tumorsuppressorgen p53 ist in etwa 50% der epithelialen Ovarialkarzinome im fortgeschrittenen Stadium mutiert [Huober et al., 2010], wobei die Typ II Ovarialkarzinome häufiger p53 Mutationen aufweisen als Typ I. Auch Mutationen, Translokationen oder Amplifikationen von anderen Protoonkogenen sind an der Pathogenese von Ovarialkarzinomen beteiligt. Hierunter fallen unter anderem Mutationen, die den MAPK/Erk Signaltransduktionsweg aktivieren (unter anderem durch Mutationen in H-RAS, MYC, BRAF, KRAS, ErbB2), aber auch andere Proteine wie PTEN, Akt oder PIK3CA sind betroffen [Kurman and Shih Ie, 2011]. Der MAPK Signaltransduktionsweg ist für die Zellantwort auf Wachstums- und Differenzierungsfaktoren verantwortlich. Eine aktivierende Mutation von KRAS oder dem nachgeschalteten Effektor BRAF führt somit zu einer konstitutiven Aktivierung des

MAPK-Weges und fördert das Zellwachstum. Ebenfalls sind Mutationen im WNT/ β -Catenin und Cadherin Signaltransduktionsweg bekannt, die unter anderem N-Cadherin und P-Cadherin einschließen [Tohill et al., 2008]. Es wird deutlich, dass eine Vielzahl an genetische Mutationen in Ovarialkarzinomen auftreten, die dabei keinem festen Muster folgen, was die Therapie erschwert.

In mehr als 80% der Ovarialkarzinome ist der Spiegel des Tumormarkers CA-125 im Serum erhöht. Jedoch ist dies kein eindeutiges Indiz für das Vorliegen eines Ovarialkarzinoms, da CA-125 auch durch andere Einflüsse erhöht sein kann. Darunter fallen Schwangerschaft, Endometriose, Adenomyose, Gebärmuttermyom, Beckenentzündung, Menstruation, gutartige Zysten, aber auch Lebererkrankungen und Pankreatiden. Außerdem ist der CA-125-Spiegel auch bei anderen Tumorerkrankungen erhöht, unter anderem bei Pankreas-, Brust-, Lungen-, Magen- oder Kolonkarzinomen [Cannistra, 2004]. Der CA-125-Spiegel wird daher eher zur Therapieeinschätzung sowie zur Detektion von Rezidiven verwendet und spielt für die Diagnostik selber nur eine untergeordnete Rolle [Pchejetski et al., 2016].

Zur Therapie des Ovarialkarzinoms kommen operative Maßnahmen, Chemo- und Strahlentherapie zum Einsatz, die je nach dem vorliegenden Stadium eingesetzt werden [Wagner et al., 2013b]. Operativ wird, falls möglich, zunächst eine vollständige Tumorsektion angestrebt, bzw. ein möglichst kleiner Tumorherd hinterlassen, falls keine andere Option besteht. Je nach Umstand werden Appendektomien, Adnexektomien, Omentektomien bis hin zu Hysterektomien durchgeführt. Das Ziel ist hierbei immer eine vollständige Tumorfreiheit. Je kleiner der verbliebene Tumorrest, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer Vollremission. Das Ausmaß des operativen Eingriffes ist hierbei nicht nur vom Stadium und histopathologischen Tumor abhängig, sondern auch vom Alter und dem Gesamtzustand der Patientin [Fung-Kee-Fung et al., 2007].

Als Goldstandard der Chemotherapie gilt die Kombination aus Carboplatin und Paclitaxel. Paclitaxel löste das zuvor eingesetzte Alkylanz Cyclophosphamid ab, da es in der gemeinsamen Therapie mit Cisplatin überlegen war [McGuire et al., 1996]. Seit den 70er Jahren wird eine platinhaltige Therapie eingesetzt. Der Vorzug von Carboplatin gegenüber Cisplatin in der Klinik ist durch das geringere Nebenwirkungsprofil von Carboplatin begründet, da weniger nephrologische und neurologische Schäden auftreten [Hoover et al., 2010, Ozols et al., 2003]. Das Wohlbefinden der Patientin ist beim Vorzug von Carboplatin gegenüber Cisplatin ausschlaggebend. Eine platinhaltige Chemotherapie kann

auch vor einer operativen Maßnahme zur Reduktion des Ausgangstumors durchgeführt werden. Rezidive sind bei Ovarialkarzinomen sehr häufig und problematisch, da die Therapieoptionen limitiert sind. Meistens ist nur noch eine palliative Therapie möglich. Ein Anzeichen für einen Rückfall ist meistens der Anstieg des CA-125-Spiegels bei ausbleibenden Symptomen oder Anomalien im CT oder bei medizinischen Untersuchungen. Spricht der Tumor noch auf das bereits eingesetzte Zytostatikum an, werden weitere Chemotherapiezyklen durchgeführt. Diese Option besteht, wenn mindestens 6 Monate bis zum Rezidiv vergangen sind. Hierbei kommt meistens Carboplatin zum Einsatz. Sind bis zum Auftreten des Rezidivs weniger als 6 Monate vergangen, liegt meistens ein intrinsisch resistenter Tumor zugrunde. Diese Rezidive werden meistens mit Zytostatika ohne Platinsubstanzen behandelt. Hier kommen oft weitere Taxane, liposomales Doxorubicin, Topotecan, Gemcitabin, Etoposid oder Vinorelbin zum Einsatz. Jedoch liegt die Ansprechrate lediglich bei 10-20% [Cannistra, 2004, Wagner et al., 2013b]. Es sollte jedoch nicht vergessen werden, dass es sich bei resistenten Ovarialkarzinomen um eine sehr heterogene Gruppe handelt, die sich in histologische Untergruppen unterteilen lässt, die sich ihrerseits in weitere geno- und phänotypische Gruppen unterteilen. All diese Unterschiede haben Einfluss auf den Therapieerfolg und erschweren die Entscheidung für eine bestimmte Therapie [Davis et al., 2014].

3.1.2 Resistenzentwicklung gegenüber platinhaltigen Therapien

Resistenzen gegenüber platinhaltigen Zytostatika sind ein großes Problem bei der Therapie des Ovarialkarzinoms. Die Resistenzen können zwischen intrinsischen und extrinsisch erworbenen unterschieden werden, wobei bei Ovarialkarzinomen die erworbenen Resistenzen überwiegen. Intrinsische Resistenzen definieren sich, wenn das Rezidiv 6 Monate nach Therapieende oder früher auftritt, bzw. die Chemotherapie keinen Erfolg erbringt. Der genaue Grund für eine Resistenz gegenüber Cisplatin ist nicht auszumachen, da es sich in der Regel um einen multifaktoriellen Prozess handelt [Voigt et al., 2006, Galluzzi et al., 2012]. Bei Cisplatin handelt es sich um einen quadratisch-planaren Komplex, der mittels einer SN-Reaktion mit Nucleophilen, bevorzugt Proteine und Nucleinsäuren, reagiert. Cisplatin wird als Prodrug definiert, da nur die im wässrigen entstehenden Diamminaquachloroplatin(II) und Diammindiaquaplatin(II) Komplexe eine genügende Reaktivität aufweisen. Die Bildung der Aquokomplexe ist durch die geringe Chloridkonzentration intrazellulär von 2-10 mM, im Vergleich zu 100 mM extrazellulär,

begünstigt. Durch die SN-Reaktion entstehen bevorzugt Platin-DNA-Addukte mit dem N7 des Imidazolrings der Purinbasen, vor allem von Guanin als präferierten Partner. Die so gebildeten Platin-DNA-Addukte hemmen die DNA-Replikation und –Transkription und führen letztendlich zum Zellzyklusarrest und zur Apoptose [Ott and Gust, 2006, Galluzzi et al., 2012]. Auch bei Carboplatin handelt es sich um einen Prodrug, das nach Hydrolyse zum aktiven Aquokomplex umgewandelt wird. Es entstehen dieselben DNA-Addukte wie beim Einsatz von Cisplatin. Da Carboplatin höhere Konzentrationen für denselben Effekt im Vergleich zum Einsatz von Cisplatin benötigt und die Bildung der DNA-Addukte langsamer verläuft, wird Cisplatin häufiger in *in vitro* Studien eingesetzt [Burger et al., 2011]. Das Einsatzgebiet von Cisplatin erstreckt sich dabei auf unterschiedliche Tumorentitäten, unter anderen, Lungen-, Ovarial-, Brust-, Magen-, Harnblasen-, Hoden- oder Kopf- und Halstumore, stößt jedoch in allen Tumorentitäten auf das Problem der Resistenzentwicklung und der starken Nebenwirkungen, wie zum Beispiel Hämorrhagien, Oto- und Nephrotoxizität [Dasari and Tchounwou, 2014]. Die Ursachen der Resistenzentwicklung kann für die unterschiedlichen Tumorentitäten, teilweise sogar innerhalb derselben Tumorentität, nicht vereinheitlicht werden, da es sich um einen sehr komplexen Prozess handelt. Gründe sind unter anderem die veränderte Cisplatin Aufnahme und –ausscheidung in bzw. aus der Zelle, die gesteigerte Metabolisierung von Cisplatin zu nicht wirksamen Produkten sowie die gesteigerte Aktivität der DNA-Reparaturmechanismen und antiapoptotischer Mechanismen [Dasari and Tchounwou, 2014].

Galluzzi et al. unterteilen die möglichen Mechanismen der Resistenzentwicklung in pre-target, on-target, post-target und off-target Resistenzen [Galluzzi et al., 2014]. Grundlage dieser Unterteilung ist der Zeitpunkt bei dem die pharmakologische Wirkung von Cisplatin angegriffen wird. Mit pre-target Resistenzen werden solche zusammengefasst, die noch vor der Bindung von Cisplatin an sein Zielmolekül erfolgen. Hierunter fallen die verminderte Umsetzung zum wirksamen Aquokomplex, die verminderte Aufnahme oder erhöhte Ausscheidung über den Kupfertransporter CTR1, der erhöhte Efflux durch die Kupfertransporter ATP7A und ATP7B oder durch die Plasmamembrantransporter CFTR/MRP bei Cisplatin-Kopplung an Glutathion, sowie die erhöhten GSH-Konzentrationen, an die Cisplatin konjugiert und somit inaktiviert wird [Chen and Kuo, 2010]. Metallothioneine besitzen thiolhaltige Cysteinreste, die ebenso als Nukleophil Cisplatin binden können und vermehrt in resistenten Zellen gefunden werden. In Cisplatin-

resistenten Zellen wurden erhöhte Expressionen von ATP7A, ATP7B sowie MRP2 [Nakayama et al., 2002] und auch verminderte Expressionen von CTR1 detektiert [Ishida et al., 2010].

Resistenzen, die den direkten molekularen Schaden durch Cisplatin betreffen werden als on-target Resistenzen bezeichnet. Damit sind erhöhte Aktivitäten in den DNA Reparaturmechanismen gemeint. Hierunter fallen auch das *nucleotide excision repair* (NER) sowie das *mismatch repair* (MMR) System. Die zum NER-Komplex zugehörigen Proteine ERCC1 und XPF werden in Ovarialkarzinomen vermehrt exprimiert und führen zu einer erhöhten Endonukleaseaktivität, sodass Platinaddukte verstärkt entfernt werden [Kelland, 2007]. In Ovarialkarzinomen wurde eine erhöhte Expression von ERCC1 mit einem schlechteren Überleben sowie verminderten Cisplatinsensitivität korreliert [Dabholkar et al., 1992]. Eine verminderte Expression sowie Mutationen in MMR-Proteinen (MLH1, MSH2, MSH3 und MSH6) führen dazu, dass DNA-Schäden nicht erkannt werden. So wird im Folgenden die Apoptose nicht ausgelöst und Resistenzen können sich ausbilden [Kelland, 2007, Fedier and Fink, 2004, Fink et al., 1998].

Veränderungen in nachgeschalteten Signaltransduktionswegen, die zum Zelltod führen, werden als post-target Resistenzen bezeichnet. Bei den post-target Resistenzen sind viele Proteine beteiligt, die durch epigenetische Alterationen betroffen sind. Diese Resistenzen beziehen sich oft auch auf andere Zytostatika, so dass Kreuzresistenzen entstehen. Im Zusammenhang mit diesen post-target Resistenzen werden oft p53 Mutationen, Mutationen in anderen Proteinen, wie zum Beispiel p38^{MAPK} oder JNK1 [Mansouri et al., 2003], aber auch die veränderte Expression von Proteinen der BCL-2 Familie sowie von Caspasen genannt [Williams et al., 2005].

Molekulare Veränderungen, die nicht direkt durch Cisplatin ausgelöst werden, werden als off-target Resistenzen bezeichnet. Hierunter fallen zum Beispiel die erhöhte Expression von ErbB2 oder auch die Aktivierung des *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1) [Eckstein et al., 2009], die zu einer Resistenzausbildung gegenüber Cisplatin führen können. Auch Makroautophagy und die verstärkte Expression der Hitzeschockproteine können zu off-target Resistenzen führen [Galluzzi et al., 2014]. Diese Mechanismen werden auch in Ovarialkarzinomen gefunden [Davis et al., 2014].

Zielgerichtete Therapien bei Resistenzen gegen hochregulierte Gene oder Proteine zeigten bislang nur wenig Erfolg. Es wurden schon Monotherapien gegen das häufig hochregulierte EGFR getestet [Siwak et al., 2010], sowie auch gegen ErbB2, RAF, mTOR

oder auch PKC. Ein Grund für die breite Testung von Target-gerichteten Therapien könnte die Diversität der Genexpression sein, aber auch der mangelnde Erfolg von Monotherapien [Zhang et al., 2015]. Durch eine Netzwerkanalyse stellten Liu et al. fest, dass viele Klientproteine von HSP90 in Ovarialkarzinomen überexprimiert sind. Hierunter fallen EGFR, Akt, mTOR, JAK2 und c-MYC. Der Einsatz eines HSP90-Inhibitors würde folglich zu einer Hemmung mehrerer Signaltransduktionswege führen, die häufig überexprimiert sind. Somit beeinflusst die Monotherapie mit einem HSP90-Inhibitor mehrere Signaltransduktionswege zur selben Zeit. Zusätzlich führte der Einsatz des HSP90i Ganetespi zu einer höheren Sensitivität gegenüber den Zytostatika Cisplatin und Paclitaxel [Liu et al., 2013]. Eine weitere Erkenntnis in den Ovarialkarzinomen ist, dass es häufig zu epigenetischen Veränderungen kommt, die zur Stilllegung von Tumorsuppressoren oder zur Aktivierung von Onkogenen führen [Balch et al., 2004]. Dies wird besonders häufig bei resistenten Tumoren beobachtet. Generell wurde in Ovarialkarzinomen häufig eine Hochregulierung von Genen beobachtet, die für die Zellproliferation, DNA-Reparaturen, Angiogenese und Zellmigration verantwortlich sind. Im Gegensatz wurden verantwortliche Gene für Proteine der Zelladhäsion, des DNA-*mismatch Repair* Systems sowie proapoptotische und antiproliferative Proteine runter reguliert. Die häufigste Ursache für epigenetische Veränderungen sind dabei Modifikationen in der DNA-Methylierung oder der Histon-Acetylierung. Substanzen, die diese Modifikationen beeinflussen, gelten daher als vielversprechende Therapieoptionen und könnten helfen, Resistenzen zu verhindern [Balch et al., 2004].

An den verwendeten A2780 Zellen wurde bereits gezeigt, dass es bei der Generierung der Resistenz zu einer Aktivierung des *Insulin-like Growth Factor Receptors I* (IGF-1R) kam. So wurde an der A2780CisR Zelllinie im Vergleich zum sensitiven Subklon eine Hyperaktivierung des IGF-1R, ERK1, ERK2 und p38 α detektiert. Dies ließ auf eine Aktivierung des IGF-1R und des PI3K-Signaltransduktionsweges schließen [Eckstein et al., 2009]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Naturstoffe Ellagsäure und Resveratrol bei einem frühen Einsatz die Ausbildung einer Resistenz verhindern konnten. Dies wurde auf eine verminderte Aktivierung von ErbB2 und ErbB3 zurückgeführt [Engelke et al., 2016].

3.2 Histon-Deacetylasen

3.2.1 Aufbau und Aufgaben von HDAC

Histone spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genaktivität und sind somit eng mit der Tumorgenese verknüpft. Es handelt sich dabei überwiegend um basische Proteine, die die DNA in strukturelle Einheiten, die Nucleosomen, im Zellkern von Eukaryoten verpacken. Histone bestehen selber aus einem Oktamer, das aus je zwei der Untereinheiten H2A, H2B, H3 und H4 aufgebaut ist [Marsh et al., 2014]. Durch unterschiedliche posttranslationale Modifikationen können die Eigenschaften der Histone variieren. Unter anderem können Histone acetyliert, ADP-ribosyliert, methyliert oder phosphoryliert werden. Die Acetylierung nimmt hierbei die wichtigste posttranslationale Modifikation ein [Marsh et al., 2014]. Durch diese Modifikationen können epigenetische Regulationen umgesetzt werden, die häufig Proteine der Gentranskription, Replikation und DNA-Reparaturprozesse betreffen. Das Gleichgewicht zwischen Histon-Acetylierung und – Deacetylierung wird durch zwei Enzymgruppen gesteuert: die Histon-Acetyltransferasen (HAT) und die Histon-Deacetylasen (HDAC) (siehe Abbildung 3.1).

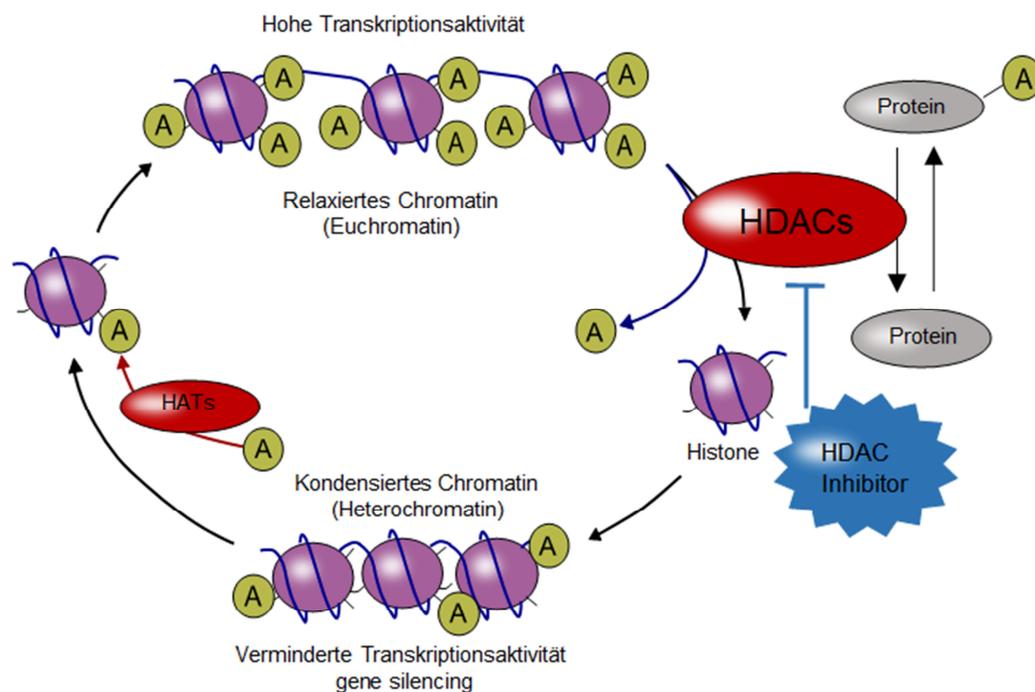


Abbildung 3.1 Schematischer Ablauf der Acetylierung und Deacetylierung von Histonen und Nicht-Histon-Proteinen durch HATs und HDACs nach [Chuang et al., 2009].

Durch eine HAT-vermittelte Acetylierung der ϵ -Aminofunktion der Lysinreste der Histone, geht dessen positive Ladung verloren und die Interaktion mit der DNA wird abgeschwächt, was eine aufgelockerte Chromatinstruktur (Euchromatin) und eine erhöhte Transkriptionsaktivität zur Folge hat. Im Gegensatz, führt eine Deacetylierung durch die HDAC zu einer Kondensierung der Chromatinstruktur und zu einer Abnahme der Transkriptionsaktivität, d.h. zum *gene silencing* [Heinke and Sippl, 2010, Pchejetski et al., 2016]. Die HDAC Enzyme können auch Nicht-Histon-Proteine deacetylieren, z.B. Transkriptionsfaktoren wie p53 oder STAT1, oder auch Proteine wie α -Tubulin, BCL6 und HSP90 [Heinke and Sippl, 2010].

Bisher wurden 18 verschiedene HDAC-Subtypen identifiziert, die sich auf Grundlage der Homologie in vier verschiedene Klassen einteilen lassen. In die Klasse I fallen HDAC 1, 2, 3 und 8. Sie sind hauptsächlich im Nukleus lokalisiert und besitzen ein Molekulargewicht von 40-55 kDa. Eine Überexpression von HDAC1 wird oft in Prostata-, Magen-, Kolon- und Brusttumoren gefunden, während eine erhöhte Expression von HDAC2 vermehrt in Kolorektalen-, Gebärmutterhals- oder Magenkarzinomen vorzufinden ist [Bolden et al., 2006]. Klasse I HDACs beeinflussen außerdem inflammatorische Zytokine und spielen daher im Immunsystem eine große Rolle. HDAC8 hingegen wird im Rahmen von parasitären Erkrankungen mit Beteiligung von Würmern der Gattung Schistosoma als selektives Target genauer untersucht [Roche and Bertrand, 2016]. Die HDAC der Klasse II sind mit 100-130 kDa etwas größer als die HDACs der Klasse I. Sie lassen sich noch weiter in die Klasse IIa mit den HDAC 4, 5, 7 und 9 und die Klasse IIb mit den HDAC 6 und 10 unterteilen. Die HDAC der Klasse IIa befinden sich im Nucleus und im Zytoplasma, wohingegen die der Klasse IIb nur im Zytoplasma zu finden sind. Die Enzyme der Klasse II weisen außerdem gewebespezifisches Vorkommen auf. So sind HDAC 4, 5 und 9 am meisten im Herzen, der Skelettmuskulatur und dem Gehirn zu finden, HDAC7 im Herz- und Lungengewebe, HDAC6 in den Hoden und HDAC10 in Leber, Nieren und Milz [Verdin et al., 2003]. Eine Überexpression von HDAC6 wird in vielen Brusttumoren gefunden [Bolden et al., 2006]. HDAC6 weist außerdem die Besonderheit auf, zwei Deacetylasedomänen zu besitzen. Den HDACs der Klasse IIa wird ebenfalls ein großer Einfluss in der Ausbildung der Immunität zugesagt. HDAC6 hingegen ist über α -Tubulin an der Zellmobilität beteiligt, sowie auch an der Angiogenese und an neurodegenerativen Erkrankungen. Der einzige Vertreter der Klasse IV ist HDAC11. Die bisher genannten HDACs sind alle zinkabhängig. Anders ist es bei den Klasse III HDAC,

die auch als Sirtuine bezeichnet werden. Diese sind NAD^+ abhängig. Jin et al. zeigten in ihrer Studie die Überexpression von HDAC 1, 2 und 3 in 18 Ovarialtumorgewebe im Vergleich zu normalen Gewebe. Dies wurde sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene gezeigt [Jin et al., 2008]. Dies legt nahe, dass HDAC in der Tumorentstehung von Ovarialkarzinomen mit eine tragende Rolle haben.

3.2.2 Histon-Deacetylase-Inhibitoren

Aufgrund des Aufbaus der HDAC-Bindetasche lässt sich für die HDACi (ausgenommen sind Inhibitoren der Sirtuine, die eine andere Struktur aufweisen) ein grundlegendes Pharmakophor festlegen. So bestehen die HDACi aus einer lipophilen Gruppe, die durch einen Linker mit einer zinkbindenden Gruppe (z.B. Hydroxamsäuren, Thiole, Benzamide, Ketone) verbunden ist. Die lipophile Gruppe sorgt dabei für die Interaktion mit der ebenfalls lipophilen Bindetasche und bestimmt die Selektivität der Inhibitoren. Die zinkbindende Gruppe hingegen ist für die Bindungsaffinität verantwortlich [Heinke and Sippl, 2010, Manal et al., 2016]. Die Entwicklung von selektiven HDACi wird mit besseren Regulationen, gesteigerten Selektivitäten zu Tumorzellen und weniger off-target Effekten korreliert. Jedoch ist noch nicht abschließend geklärt, ob nicht die Inhibition mehrerer HDAC für den phenotypischen Effekt benötigt werden [Maolanon et al., 2016, Noureen et al., 2010]. Die meisten HDACi haben eine Hydroxamsäurestruktur, da diese die bisher stärkste zinkbindende Gruppe darstellt. Jedoch kommt es durch Hydroxamsäuren zu keiner guten Selektivität gegenüber den unterschiedlichen HDAC, da die Effektivität meistens zu groß ist. Die Selektivität für die HDAC wird vorwiegend über die lipophile Gruppe bestimmt [Maolanon et al., 2016]. Benzamide, wie zum Beispiel Entinostat, weisen häufig eine Klasse I Selektivität auf. Auch spezifische Inhibitoren für HDAC6 werden in vielen Arbeitsgruppen getestet und entwickelt. Die Hoffnungen liegen hier in einem verbesserten Nebenwirkungsprofil, da die Nebenwirkungen häufig über eine HDAC Klasse I Hemmung hervorgerufen werden. Da HDAC6 nicht nur über Histondeacetylierungen Veränderungen innerhalb der Zelle hervorruft, sondern auch mit Nicht-Histon-Proteine interagiert, wird eine Hemmung von HDAC6 mit einer starken Beeinflussung der Zellmigration und –invasion korreliert. Tubacin und Tubastatin A sind HDAC6-selektive HDACi, die beim multiplen Myelom, NSCLC und Prostatakarzinom eingesetzt werden. Als zinkbindende Gruppe wird in beiden Molekülen eine Hydroxamsäure eingesetzt. Rocilinostat, ebenfalls mit einer Hydroxamsäure-Struktur, ist ein weiterer HDAC6 spezifischer HDACi, der sich bereits in klinischen Studien beim

multiplen Myelom befindet [Kalin and Bergman, 2013]. Selektive HDACi werden *in vitro* zur genauen Untersuchung der Funktion der HDAC eingesetzt, weisen jedoch in der Klinik noch keinen Vorteil gegenüber den pan-HDACi auf. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hauptsächlich der pan-Inhibitor Panobinostat und der HDAC 4 und 5 präferentielle Inhibitor LMK235 verwendet (siehe Abbildung 3.2).

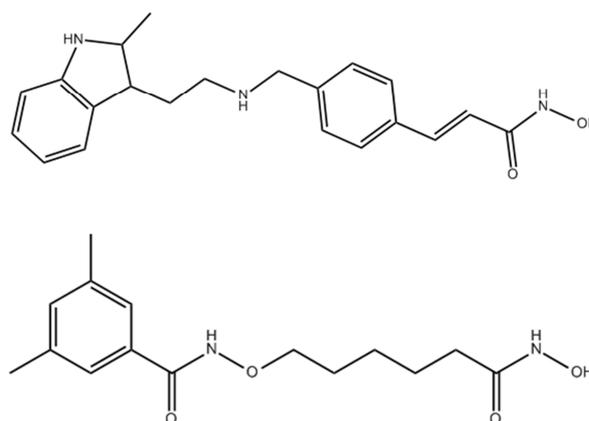


Abbildung 3.2 Strukturen der HDACi Panobinostat (oben) und LMK235 (unten).

Da HDACi in die Gentranskription eingreifen, hat deren Einsatz Einfluss auf die Zellproliferation, Zellzyklusregulierung und Apoptoseauslösung. Das durch die HDAC hervorgerufene *gene silencing* wird durch den Einsatz von HDACi rückgängig gemacht. Es wurden auch anti-angiogenetische, anti-invasive und immunmodulatorische Effekte beobachtet. Die Wirksamkeit der HDACi wurde in mehreren hämatologischen und soliden Tumoren aufgezeigt [Pchejetski et al., 2016]. Auch an mehreren Ovarialkarzinomzelllinien konnte der Einsatz von HDACi zur Hemmung der Zellproliferation, zur Apoptoseinduktion und teilweise zum Zellzyklusarrest führen [Takai et al., 2004, Marek et al., 2013, Diedrich et al., 2016a]. Der Einsatz von HDACi führt zu einer generellen Veränderung der Genexpression, der zugunsten der proapoptotischen Gene ausfällt und somit Apoptose auslösen kann [Bolden et al., 2006]. Dabei sind die HDACi in der Lage, Apoptose sowohl über den Todesrezeptor-Signalweg, als auch über den intrinsischen Signalweg auszulösen. Die Hochregulierung der Todesrezeptoren und dessen Liganden (z.B. TRAIL) beeinflussen den extrinsischen Apoptoseweg, wohingegen die epigenetische Regulierung unterschiedlicher pro- und antiapoptotischer Gene den intrinsischen Weg verändert. So berichteten schon mehrere Gruppen in unterschiedlichen Tumorentitäten, dass nach einem HDACi Einsatz eine Herunterregulierung der antiapoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl_{xL} und XIAP beobachtet wurden [Bolden et al., 2006, Rosato et al., 2006, Yi et al., 2012]. Ebenso wurde die Überexpression von pro-apoptotischen Genen und Proteinen,

wie Bak, Bax, Bim, Bid, Bmf und Apaf1, beschrieben [Xu et al., 2007]. Zusätzlich zeigten viele HDACi einen Zellzyklusarrest, entweder in der G1 oder der G₂/M-Phase. In vielen Tumorentitäten wird von einer Überexpression des p21-Proteins nach einem HDACi-Einsatz berichtet, das die Cyclin-abhängige Kinase (CDK) inhibiert und somit einen G1-Arrest hervorruft [Manal et al., 2016]. Als weitere Wirkung der HDACi ist die Acetylierung von Nicht-Histonproteinen wichtig. Hierunter fallen Transkriptionsfaktoren wie STAT1, STAT3, NF-κB, aber auch der Tumorsuppressor p53. Die Expression der nachgeschalteten Targets dieser Transkriptionsfaktoren wird folglich durch HDACi beeinflusst. Auch die Hyperacetylierung von α-Tubulin und HSP90 trägt zur erhöhten Apoptoserate bei [Bolden et al., 2006, Takai et al., 2004].

Vorinostat war im Jahr 2006 der erste HDACi, der für die Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms eine Zulassung durch die FDA erhielt. Für weitere Indikationen befindet sich Vorinostat aktuell noch in klinischen Studien. 2009 wurde Romidepsin für dieselbe Indikation zugelassen. Dabei handelt es sich bei Romidepsin nicht um eine Hydroxamsäure, sondern um ein natürlich vorkommendes cyclisches Peptid. Ein weiterer von der FDA zugelassener HDACi ist Belinostat, der 2014 für die Therapie des refraktären oder progredienten peripheren T-Zell-Lymphom zugelassen wurde [Mottamal et al., 2015]. 2015 wurde Panobinostat in Kombination mit Bortezomib (ein Proteasominhibitor) und Dexamethason für die Behandlung des Multiplen Myeloms von der FDA zugelassen. So sind aktuell diese 4 HDACi von der FDA zugelassen. Dosis-limitierende Nebenwirkungen sind Thrombozytopenie, Übelkeit, Durchfall und das Fatigue-Syndrom [Bolden et al., 2006]. Die Vertreter der Hydroxamsäuren befinden sich zusätzlich in vielen klinischen Studien, sowohl als Mono- als auch in Kombinationstherapien bei unterschiedlichen Tumorarten [Manal et al., 2016]. Dabei werden die Substanzen sowohl in hämatologischen als auch in soliden Tumoren getestet. Die Kombination mit Inhibitoren der DNA-Methyltransferase sowie mit Proteasominhibitoren wird am häufigsten beobachtet. Obwohl HDACi *in vitro* großen Einfluss auf die Zellproliferation von Tumorzellen zeigten, bleibt der klinische Effekt an soliden Tumoren im Vergleich zu hämatologischen Tumoren noch enttäuschend. Für Ovarialkarzinome befinden sich mehrere HDACi in der klinischen Testung. Da HDACis die Sensitivität von Zytostatika verbessern konnten, werden sie häufig in Kombinationstherapien getestet [Lee et al., 2008]. Erstaunlicherweise war die Effektivität der HDACi in Kombinationsstudien mit Cisplatin, Carboplatin oder Paclitaxel an resistenten Zellen höher, im Vergleich zu den sensitiven Zellen [Khabele, 2014]. Die

Kombination von HDACi mit DNA-schädigenden Substanzen, wie z.B. den Alkylanzien, zeigte synergistische Effekte, da die HDACi durch die gelockerte Chromatinstruktur die Angreifbarkeit der DNA-schädigenden Substanzen erleichtern [Marek et al., 2013, Diedrich et al., 2016a]. Zusätzlich werden DNA-Reparatursignalwege unterdrückt. In Ovarialkarzinomzelllinien wurde der Effekt der Kombination von Vorinostat und Cisplatin untersucht. Dafür wurden intrinsisch resistente Zellen gegenüber Cisplatin verwendet. Die Kombinationen zeigten synergistische Effekte, die am stärksten waren, wenn Vorinostat und Cisplatin gleichzeitig zu den Zellen gegeben wurde. Dadurch konnte der IC₅₀-Wert von Cisplatin um das 8-fache gesenkt werden. Eine Veränderung im Zellzyklus wurde dabei nicht beobachtet [Ong et al., 2012]. Eine häufige Kombination mit Inhibitoren der DNA-Methylierung, hat einen rationalen Hintergrund. So würden Gene, die durch DNA-Methylierungen nicht abgelesen werden können, von zwei Seiten wieder aktiviert werden, durch die Demethylierung und die Hyperacetylierung. Die HDACi zeigen ebenfalls gute Effekte in der Kombination mit Topoisomerasehemmer, wie z.B. Topotecan, in Bezug auf DNA-Schädigung und Zellwachstum [Thurn et al., 2011]. Synergistische Effekte wurden ebenfalls bei der Kombination von Taxanen mit HDACi beschrieben. Durch den Einsatz von HDACi, vor allem HDAC6 spezifischen Inhibitoren, kommt es zu einer erhöhten Acetylierung von α -Tubulin, das die Stabilität der Mikrotubuli erhöht. Dies erhöht die Affinität der Taxane und führt zu einem verminderten Zellwachstum und einem erhöhten Zellsterben [Dowdy et al., 2006]. Bei der Behandlung des Brust- und Prostatakarzinoms sind oftmals hormonelle Signalwege hochreguliert. Durch die Kombination von HDACi und Hormontherapie, z.B. Tamoxifen und Bicalutamid, konnte die Effektivität der Hormontherapie in Brust- und Prostatakarzinomen erhöht werden [Thurn et al., 2011]. Mottamal et al. fassen die aktuellen Studien und Entwicklungen im Bereich der HDACi zusammen [Mottamal et al., 2015]. Letztendlich wird deutlich, dass der Einsatz der HDACi in der Kombination mit anderen Zytostatika vielversprechende Ergebnisse in unterschiedlichen Tumorentitäten liefert.

3.2.3 Resistenzen gegenüber HDACi

Obwohl HDACi unterschiedliche Signaltransduktionswege beeinflussen und somit ein breites Wirkspektrum haben, blieben die erwarteten Erfolge in der Klinik aus. Gründe dafür sind unter anderen Resistenzen gegenüber HDACi. Wie bei Resistenzen gegen Cisplatin, handelt es sich auch bei der Resistenz gegen HDACi um einen multifaktoriellen Prozess. Es tragen mehrere Prozesse dazu bei, unter anderem ein vermehrter Efflux der Substanzen, eine Überexpression oder Desensitivierung des HDAC Enzyms und epigenetische Veränderungen, die mit erhöhten Expressionen von Proteinen des Stress-Antwort-Mechanismus (z.B. die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X_L) einhergehen. Bei Resistenzen gegenüber Romidepsin wurden zusätzlich erhöhte Expressionen des P-Glykoproteins beschrieben [Robey et al., 2011]. Beim Einsatz von HDACi wurde beobachtet, dass Zellen mit Mutationen im HDAC, die den Angriff von HDACi verhindern, vermehrt proliferieren. Die Hypermethylierung der DNA spielt nur bei Resistenzmechanismen nach dem HDACi Einsatz eine Rolle. Dies beeinträchtigt die Fähigkeit der HDACi die Transkription von stillgelegten Tumorsuppressorgenen erneut zu aktivieren [Fantin and Richon, 2007].

Gegenüber HDACi wurden auch intrinsische Resistenzen beobachtet. So berichteten Juengel et al. von einem Nicht-Ansprechen von Nierenkarzinomzelllinien auf Valproinsäure. Bei den resistenten Zellen wurde eine erhöhte Expression des Akt-Proteins detektiert. Ebenso zeigten die intrinsisch resistenten Zellen eine erhöhte Expression an Cdk1, das den Übergang in die G₂/M-Phase fördert [Juengel et al., 2013]. Cdk1 ist in der Lage sowohl den Übergang aus der G₁- in die S-Phase, sowie aus der G₂- in die M-Phase zu fördern [Morgan, 1997]. Microarray-Untersuchungen an Zellen des multiplen Myeloms zeigten eine Überexpression von Genen der MAPK, PI3K und FAK Signaltransduktionswege in intrinsisch resistenten Zellen. Eine Kombination vom HDACi Panobinostat mit Inhibitoren des MAPK- und FAK-Weges (GSK1120212 als MAPK-Inhibitor, BKM120 als PI3K-Inhibitor und TAE226 als FAK-Inhibitor) zeigten im Folgenden synergistische Effekte [Mithraprabhu et al., 2014]. An Zellen des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms zeigten Lee et al., dass bei der Ausbildung einer HDACi-Resistenz sowohl die Expression von STAT3 erhöht wird, als auch die Aktivierung des IGF-1R Signaltransduktionsweges eine Rolle spielte [Lee et al., 2016]. Dedes et al. generierten eine Vorinostat-resistente Zelllinie der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 durch eine 7-malige Inkubation mit steigenden Konzentrationen an Vorinostat. Dadurch wurde

der IC₅₀-Wert an diesen Zelllinien um das 14-fache erhöht. Selbst bei Kultivierung der Zellen ohne weiteren Vorinostat Zusatz, wurde die Resistenz für mindestens 6 Monate aufrechterhalten. Die Vorinostat-Resistenz führte an den HCT116 Zellen zu einer verminderten Histon-Acetylierung. Die Acetylierung der Nicht-Histon Proteine p53, Tubulin und HSP90 wurden jedoch nicht beeinflusst, ebenso wenig wie die Aktivität der HAT und HDAC. Ein Verlust des G₂-Checkpoints wurde an den resistenten Zellen ebenfalls festgestellt, das mit einer verminderten Apoptoseinduktion einherging. Erstaunlich war außerdem, dass sich eine Kreuzresistenz zu anderen HDACi ausbildete. So waren auch höhere IC₅₀-Werte gegenüber Valproinsäure, Panobinostat und JNJ26481585 festzustellen [Dedes et al., 2009]. Auch Fiskus et al. zeigten die Ausbildung einer Resistenz gegenüber einem HDACi (Dacinostat) an akuten myeloischen Leukämiezellen. Ein multifaktorieller Prozess mit erhöhten Expressionen an Akt und c-Raf und eine erhöhte Phosphorylierung von Akt wurde beschrieben. Ebenso konnte auch hier eine Kreuzresistenz zu anderen HDACi festgestellt werden. Erstaunlich war, dass die resistente Zelllinie eine Hyperacetylierung des HSP90-Proteins mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber dem HSP90i 17-AAG aufwies [Fiskus et al., 2008].

Abschließend lässt sich feststellen, dass HDACi nicht nur eine breite Angriffsfläche über die epigenetische Regulierung von Genen aufweisen, sondern auch andere Proteine beeinflussen, die einen Einfluss auf die Zellviabilität haben, wie z.B. das HSP90-Protein. Daher sind HDACi als Kombinationspartner mit anderen Modulatoren oder auch anderen Zytostatika vielversprechend.

3.3 Hitzeschockprotein 90

3.3.1 Aufbau und Aufgaben des HSP90-Proteins

Bei Chaperonen handelt es sich um Proteine, die in Zellen dabei helfen, andere Proteine, sogenannte Klientproteine, in ihre funktionelle Konformation zu falten. Dabei wird die Zelle vor inkorrekt gefalteten Proteinen und der daraus resultierenden Aggregation geschützt. Eine Gruppe innerhalb der Chaperone sind die Hitzeschockproteine (HSP), die bei zellulärem Stress vermehrt exprimiert werden. Hierunter fallen Entzündungen, Infektionen, Nährstoffmangel, Hypoxie oder Hitzestress [Whitesell and Lindquist, 2005]. Die Hitzeschockproteine helfen zusätzlich noch beim Transport von Proteinen durch die Zellmembran, da die transportierten Proteine hierfür als lange, unpolare Peptidkette vorliegen müssen. Die HSP lassen sich anhand ihrer Größe und Sequenzhomologie in fünf Gruppen einteilen. In der Gruppe der kleinen Hitzeschockproteine (*small heat shock proteins*) werden die Proteine mit 15-42 kDa zusammengefasst. Die weiteren Gruppen bilden die HSP60, HSP70, HSP90 und HSP100, wobei letztere Gruppe nur in Eubakterien, niederen Eukaryoten und Pflanzen vorkommt. Die größte und bedeutendste Gruppe bilden die 90 kDa großen HSP90-Proteine [Richter et al., 2007]. Bereits in einer normalen Zellen bestehen 1-2% der Gesamtproteinmenge aus dem HSP90-Protein, welches unter Stress auf das doppelte ansteigen kann [Eckl and Richter, 2013]. HSP90 besteht aus zwei Isoformen, ein konstitutiv exprimiertes HSP90 β , sowie ein hitze-induzierbares HSP90 α -Protein. Dabei interagieren beide Isoformen mit ca. 10% des eukaryotischen Proteoms, das ungefähr 2000 Proteinen entspricht [Prodromou, 2016]. Auch in Tumorzellen wird häufig eine Überexpression des HSP90-Proteins gefunden. Dies erklärt, warum Tumorzellen oftmals in der Lage sind, selbst in einem hypoxischen oder aziden Milieu innerhalb eines Tumors die normale Zellhomöostase aufrecht zu erhalten [Mahalingam et al., 2009]. Der Hitzeschockfaktor1 (Hsf1) reguliert über einen negativen feedback-Mechanismus die Expression des HSP90-Proteins, da es selber ein Klientprotein von HSP90 ist. Unter normalen Bedingungen liegt Hsf1 in einem inaktiven Komplex mit HSP70 und HSP90 vor. Erst unter Hitzestress wird es aus dem Komplex freigelassen. Durch eine Temperatur- und Konzentrationsabhängige Trimerisierung von Hsf1 erfolgt dessen Aktivierung [Hentze et al., 2016] und es kann als Transkriptionsfaktor die HSP90-Expression hochregulieren [Taipale et al., 2010]. Eine Phosphorylierung an Ser121 des Hsf1 erhöht die Bindung vom Hsf1-Protein im Komplex und hält es somit länger in der inaktiven Form [Wang et al., 2006]. Das HSP90-Protein wird aus einem Homodimer gebildet und funktioniert in einem

Multichaperonkomplex. Dabei interagiert das HSP90-Protein mit mehr als 20 Cochaperonen, die dabei helfen, die richtigen Klientproteine zu erkennen, sowie die biochemische Aktivität zu steuern. Jedes Monomer lässt sich nochmal in drei Untereinheiten aufteilen. An der 25 kDa großen N-terminalen Domäne findet die ATP-Bindung und -Hydrolyse zur Energiegewinnung statt. Diese Domäne besteht aus α - und β -Sandwiches und zeigt eine hochkonservierte Sequenz. Die 12 kDa große C-terminale Domäne ist für die Dimerisierung der beiden Monomere notwendig, sowie für die Anlagerung der Cochaperone. Sie besteht aus einer gemischten α - und β -Domäne, wobei jeweils 2 α -Helices des Monomers zur Dimerisierung verwendet werden. Es entsteht somit ein Bündel aus 4 Helices bei der Dimerisierung. Außerdem befindet sich hier, das für die Cochaperone wichtige Bindemotiv MEEVD. Dieses Motiv wird von den meisten Cochaperonen mit einer TPR (*Tetratricopeptide-Repeat*) Domäne erkannt. Die 35 kDa große Mitteldomäne verbindet zum einen die beiden anderen Untereinheiten, erkennt aber auch die sogenannten Klientproteine, die gefaltet werden sollen. Sie besteht aus zwei $\alpha\beta\alpha$ -Motiven, die durch α -Helices verbunden werden [Eckl and Richter, 2013, Richter et al., 2007, Taipale et al., 2010]. Das HSP90-Protein durchläuft bei seiner Aktivität einen Zyklus (siehe Abbildung 3.3), der durch die ATP-Bindung bestimmt wird. Die ATP-Bindung erfolgt dabei in einer unüblichen genickten Form, der Bergerat-Falte [Li et al., 2012]. So befindet sich das Homodimer bei einer ADP-gebundenen Form in einer offenen, hydrophoben Konformation. Durch die ATP-Bindung kommt es zur Konformationsänderung des N-Terminus des HSP90-Proteins. Hierbei ist auch das Cochaperon p23 beteiligt, das bei der Faltung des Klientproteins hilft. Das ATP-Lid, bestehend aus α -Helices und einem flexiblem Loop, schließt sich über der Bindetasche, so dass das Klientprotein und das Nukleotid durch das HSP90-Protein eingeschlossen sind. Zusätzlich kommt es zu einer Stabilisierung der Dimerisierung. Hier findet die Faltung des Proteins statt. Durch die Neuorientierung der Domänen im ganzen HSP90-Dimer, nähern sich die Mitteldomäne und die N-terminale Domäne an. Das Arg-380 der Mitteldomäne ist nun in der Lage, die ATP-Hydrolyse zu katalysieren. Es kommt zur Abspaltung des γ -Phosphats von ATP, das Dimer geht in seine ADP-gebundene offene Konformation und das reife Klientprotein wird aus dem Komplex entlassen. Die Klientproteine werden mit Hilfe von HSP40 und HSP70 in die richtige Konformation für das HSP90-Protein gebracht. Ein weiteres Cochaperon, das *HSP70-HSP90 Organizing Protein* (HOP), hilft bei der Bindung des Klientproteins an die Mitteldomäne und der ATP-Bindung. Der

während des Zyklus geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die große Konformationsänderung, welche die beiden N-Termini zusammenführt [Taipale et al., 2010, Pearl and Prodromou, 2006, Ali et al., 2006].

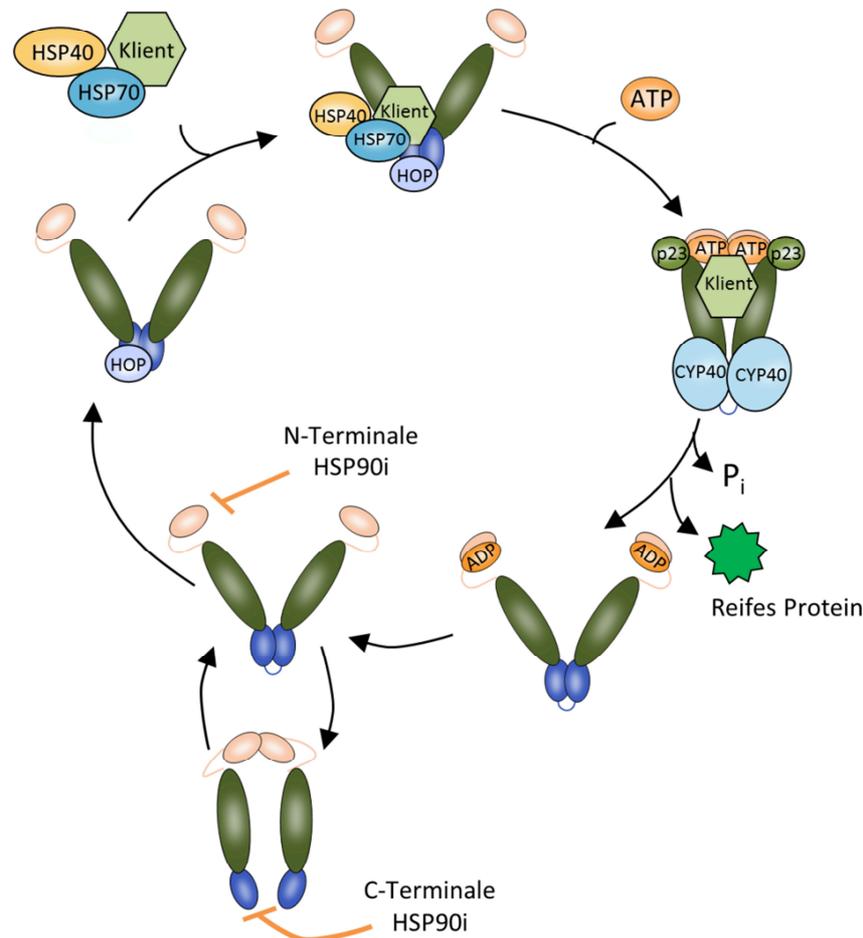


Abbildung 3.3 Schematischer Ablauf des HSP90-Zyklus nach [Taipale et al., 2010, Ratzke et al., 2010].

Ratzke et al. zeigten, dass das HSP90-Dimer nicht nur über den C-Terminus dimerisieren kann, sondern sich vielmehr in einem Gleichgewicht zwischen C-terminaler und N-terminaler Dimerisierung bewegt. Bei der Dimerisierung an einem Terminus, öffnet sich im Gegenzug der andere Terminus. Diese Zustände werden hauptsächlich durch die Anwesenheit von ATP oder ADP bestimmt. Dadurch werden neue Möglichkeiten zur Inhibition des HSP90-Proteins denkbar, da der Angriff am C-Terminus durch eine N-terminale Dimerisierung vereinfacht vorstellbar ist [Ratzke et al., 2010].

Als Bindungspartner von HSP90 lassen sich zwei Gruppen festlegen, zum einen die Klientproteine, die auf HSP90 angewiesen sind, um ihre Funktionalität wieder aufzunehmen, zum anderen die Cochaperone, auf die HSP90 angewiesen ist. Die Gruppe

der Klientproteine hat schon mehr als 280 identifizierte Proteine, die in weiten Bereichen der Zellproliferation, Differenzierung und Wachstum Einfluss haben. Die Cochaperone regulieren die ATPase Aktivität des HSP90-Proteins und unterstützen es außerdem bei der Erkennung und Prozessierung der Substratproteine. Das Protein *activator of HSP90 ATPase homologue 1* (Aha1) ist zum Beispiel in der Lage die ATPase Aktivität von HSP90 um ein Vielfaches zu steigern [Taipale et al., 2010]. Das Cochaperon p23 hingegen bindet bevorzugt an die ATP-gebundene Form des HSP90-Proteins, konserviert dadurch eine für die ATP Hydrolyse unvorteilhafte Konformation und sorgt somit für eine Hemmung der ATPase Aktivität [Richter et al., 2004]. Gleichzeitig wird aber die Bindung der Klientproteine bevorzugt. Die Cochaperone Cdc37 und HOP wirken auch hemmend auf den HSP90-Zyklus durch eine Hemmung der ATPase Aktivität [Eckl and Richter, 2013, Pearl and Prodromou, 2006].

3.3.2 HSP90-Inhibitoren

Die HSP90-Inhibition führt zur Hemmung der Aktivität der Klientproteine von HSP90, gefolgt von einer Ubiquitin-vermittelten proteosomalen Degradierung der Klientproteine. Dies führt zu einer gleichzeitigen verminderten Aktivität verschiedener Onkoproteine und der Herunterregulierung von Signaltransduktionswegen, so dass die Zellproliferation und das Zellüberleben von malignen Zellen gehemmt werden. Das Hsf1-Protein wird durch den Einsatz von HSP90i nicht mehr inhibiert. Dies führt zu einer Überexpression des HSP70 Proteins. Bei Testungen von neuen, möglichen HSP90i wird die Überexpression des HSP70 Proteins oft als Indikator für die Hemmung des HSP90-Proteins verwendet [Prodromou, 2016]. Der PI3K-Akt Signaltransduktionsweg vermittelt, über ein Netzwerk von mehreren Proteinen, Zellproliferation und die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. In einer Vielzahl von Tumorarten sind Überexpressionen von Proteinen des PI3K-Akt-Weges bekannt, die zu einer erhöhten Zellproliferation und verminderter Apoptose führen. Akt ist ein zentrales Protein dieses Signaltransduktionsweges, das proapoptische Proteine in ihrer Funktion hemmen kann. Durch den Einsatz von HSP90i kommt es vermehrt zu einer Degradierung von Akt und somit zu einer Hemmung der Zellviabilität [Sato et al., 2000]. Das HSP90-Protein führt außerdem über die Aktivierung von NF- κ B zum Zellüberleben. Durch die Inhibition des HSP90-Proteins wird daher auch vermehrt Apoptose induziert und ein verringertes Zellüberleben beobachtet [Mahalingam et al., 2009]. Auch führen HSP90i zu einer vermehrten Degradierung des mutierten Tumorsuppressorgenes p53. Wildtyp p53 wird über das HSP90-Multichaperon Komplex in

der richtigen Konformation gehalten, um an die DNA binden zu können und als Transkriptionsfaktor zu fungieren. Sind keine DNA-Schäden vorhanden, wird wildtyp p53 zur proteosomalen Degradierung geführt. Somit wird eine Gleichgewichtskonzentration des p53 Proteins aufrechterhalten. Mutiertes p53 hingegen bildet mit HSP90 und HSP70 Kopräzipitate und geht dadurch eine längere Bindung mit dem HSP90-Multichaperon-Komplex ein. Es ist nicht in der Lage eine Konformation zur DNA Bindung einzunehmen oder über die proteosomale Degradierung abgebaut zu werden. Dies führt zu einer erhöhten Konzentration an mutiertem p53, welches im Komplex mit HSP90 gebunden vorliegt. Durch den Einsatz eines HSP90i wird dieser Komplex aufgelöst und das mutierte p53 kann abgebaut werden, so dass die Konzentration erneut sinkt und ein besseres Ansprechen von DNA-schädigenden Substanzen beobachtet wird [Whitesell et al., 1998]. Somit ist der Einsatz von HSP90i in der Krebstherapie ein vielversprechender Ansatz.

Die ersten identifizierten HSP90i waren die Naturstoffe Geldanamycin und Radicol. Beide Inhibitoren agierten als kompetitive Inhibitoren an der ATP-Bindestelle des HSP90-Proteins [Roe et al., 1999]. Solar et al. zeigten, dass der Einsatz von Geldanamycin an den resistenten A2780CisR Zellen zu einem zytotoxischen Effekt führte, der mit einem S-Phasen Arrest einherging. Eine Verringerung der Akt-Expression konnte jedoch erst beim Einsatz einer IC₉₀-Konzentration von Geldanamycin gezeigt werden. Dennoch wurde die Sensitivität gegenüber Cisplatin bereits beim Einsatz einer IC₁₀-Konzentration von Geldanamycin erhöht [Solar et al., 2007]. Es konnte keine Korrelation zwischen der erhöhten Cisplatin sensitivität und einem einzigen Protein gefunden werden, da durch die HSP90-Hemmung eine Vielzahl an Proteinen beeinflusst werden. Die ersten beiden HSP90i wiesen jedoch eine schlechte Wasserlöslichkeit auf, weshalb die Entwicklung zu den besser wasserlöslichen Substanzen 17-AAG und 17-DMAG führte [Taldone et al., 2008]. 17-AAG war der erste HSP90i, der in der Klinik getestet wurde und konnte dabei das HSP90-Protein im gleichen Ausmaß wie Geldanamycin inhibieren. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Affinität von 17-AAG zum HSP90-Protein in Tumorzellen 100-fach höher war als zum HSP90-Protein in gesunden Zellen. Dies wurde durch kompetitive Bindungsstudien gezeigt. Beim Einsatz von 17-AAG in den Brustkarzinomzellen BT474 ergab sich ein IC₅₀-Wert von 6 nM, während beim Einsatz in primären Nierenepithelzellen RPTEC ein IC₅₀-Wert von 600 nM erzielt wurde. Diese Tendenz wurde auch in Versuchen an weiteren Tumor- und Nicht-Tumor-Zellen gesehen. Veränderte HSP90-Protein Konzentrationen in den Zelllinien wurden hingegen nicht festgestellt. Beim isolierten

HSP90-Protein ergab sich ein IC_{50} -Wert von 17-AAG von 600 nM, der durch den Zusatz der Cochaperone sank. Daraus wurde geschlossen, dass die erhöhte Effektivität in Tumorzellen im Vergleich zu nativen Zellen durch den HSP90-Multichaperon-Komplex bedingt ist, da dieser vermutlich in Tumorzellen veränderte Aktivitäten der Cochaperone aufweist [Kamal et al., 2003]. Diese Aussage konnte jedoch durch Folgestudien nicht immer bestätigt werden und wird daher kontrovers diskutiert. Die Benzochinonstruktur der bisher genannten HSP90i führte in der Klinik zu einer starken Hepatotoxizität, weshalb die Entwicklung der HSP90i andere Strukturen favorisierte [Porter et al., 2010]. So wurden klinische Studien mit 17-AAG und 17-DMAG seit 2008 nicht weiter geführt. Obwohl bisher 17 HSP90i in klinischen Studien getestet wurden, hat noch kein HSP90i eine Zulassung erhalten. Die aktuell in Studien getesteten HSP90i binden alle an die N-terminale ATP-Bindetasche mit einer höheren Affinität, als das natürliche Nukleotid und unterbrechen so den HSP90-Zyklus [Tatokoro et al., 2015]. Ein *small-molecule* HSP90i mit Resorcinol-Teilstruktur ist NVP-AUY922 (Luminespib, siehe Abbildung 3.4 links), das sich bereits in Phase II klinischen Studien in NSCLC, metastasierendem Pankreaskarzinom und gastrointestinalen Stromatumoren befindet.

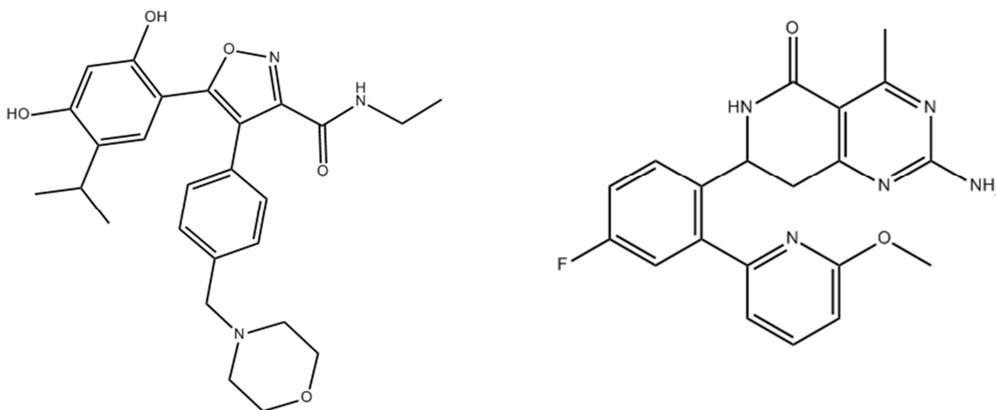


Abbildung 3.4 Strukturen der N-terminalen HSP90i NVP-AUY922 (links) und NVP-HSP990 (rechts).

Eccles et al. zeigten, dass es durch den Einsatz von NVP-AUY922 zu einer Hemmung der Zellproliferation bei Brust-, Ovarial- und Prostatakarzinomen, sowie bei Glioblastomen und Melanomen kam. Eine Überexpression des HSP70-Proteins, welches mit einer HSP90-Inaktivierung korreliert, wurde ebenfalls gezeigt, genauso wie eine verminderte Expression von ErbB2, CRAF, Akt und dessen Phosphorylierung. Eine Apoptoseinduktion konnte nur in Melanomzellen gezeigt werden [Eccles et al., 2008]. Ein weiterer N-terminaler Inhibitor ist NVP-HSP990 (siehe Abbildung 3.4 rechts). Beide Substanzen wurden vergleichend in neuroendokrinen Karzinomzellen getestet [Zitzmann et al., 2013]. Beide HSP90i wiesen

ähnliche Zytotoxizitäten auf und konnten einen leichten G₂/M-Arrest in den Zellen auslösen. Ebenso waren beide Inhibitoren in der Lage die Phosphorylierung von Erk, Akt und 4EBP1 in einer konzentrationsabhängigen Weise zu vermindern. Auch NVP-HSP990 wurde in klinischen Studien bei soliden Tumoren getestet. Da jedoch die erwünschten Wirkungen bei den höchsten tolerierten Dosen nicht erzielt wurden, nahm Novartis NVP-HSP990 2012 aus allen klinischen Studien [Sidera and Patsavoudi, 2014]. Ein weiterer Inhibitor vom Resorcinol-Typ ist STA-9090 (Ganetespib) der sich wie NVP-AUY922 ebenfalls in klinischen Studien befindet. STA-9090 weist bessere pharmakologische Eigenschaften auf, als die anderen getesteten HSP90i und zeigte sowohl in hämatologischen als auch in soliden Tumoren eine höhere Effektivität als 17-AAG [Ying et al., 2012].

Beim Einsatz von HSP90i kommt es oft zu einer verringerten Wirkung, die auf eine Aktivierung der Hitze-Schock-Antwort (*heat shock response*, HSR) und der anschließenden Hochregulierung von HSP70, HSP72, HSP27 und anderen Chaperonen zurückzuführen ist. Dies führt zu einer verminderten Wirkung der HSP90i, d.h. zu einer verminderten Apoptoseinduktion. Diese Effekte werden hauptsächlich bei N-terminalen Inhibitoren beobachtet. Ebenso erklärt dies auch Resistenzen, die gegenüber N-terminalen HSP90i beobachtet werden. Daher ist die Erforschung von C-terminalen HSP90i von wachsendem Interesse [Donnelly and Blagg, 2008]. Ein Naturstoff, der das HSP90-Protein hemmt, ist Novobiocin. Dieses Cumarinantibiotikum bindet, im Gegensatz zu den bisher genannten HSP90i, an der ATP-Bindestelle des C-Terminus und verhindert somit die essentielle Dimerisierung des HSP90-Proteins [Allan et al., 2006]. Dadurch wird die Interaktion des HSP90-Proteins mit den Cochaperonen p23 und HSP70 vermindert und im gleichen Maße auch die Aktivität des HSP90-Proteins. Die Inhibition durch Novobiocin erfolgt jedoch erst bei hohen Konzentrationen im mikromolaren Bereich. Novobiocin-Analoga werden daher als neue C-terminale Inhibitoren des HSP90-Proteins synthetisiert und getestet. Matthews et al. untersuchten Novobiocin-Analoga an Prostatakarzinomzellen. Der neu entwickelte Inhibitor F-4 war dabei in der Lage, die Expression der Klientproteine ErbB2 und Akt zu senken. Außerdem war er an den getesteten Zellen meistens zytotoxischer als der N-terminale Inhibitor 17-AAG [Matthews et al., 2010]. Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) ist ein aktives Polyphenol aus dem grünen Tee. Yin et al. zeigten, dass es in der Lage ist, an die C-terminale Domäne des HSP90-Proteins zu binden und somit die Dimerisierung des Proteins zu verhindern. Ebenso wurden bei

gleichbleibenden HSP90-Expressionen, ErbB2 und Raf-1 vermindert exprimiert, sowie Akt vermindert phosphoryliert [Yin et al., 2009]. An Prostatakarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von EGCG zu einer verminderten Expression von ErbB2, Raf1 und Akt mit einer verminderten Phosphorylierung von Akt führte, während die Expression von HSP90 und HSP70 unverändert blieb. Auch zeigten Tumorzellen ein besseres Ansprechen auf EGCG im Vergleich zu Nicht-Tumorzellen [Moses et al., 2015]. Es wurde *in vitro* ebenfalls versucht, die Dimerisierung des HSP90-Proteins zu hemmen. Durch Energieberechnungen mittels MM-GB/SA konnten sogenannte Hot spots in der C-terminalen Dimerisierungsdomäne des HSP90-Proteins ermittelt werden [Ciglia et al., 2014]. Mit Peptiden, die die α -Helices des C-Terminus imitieren und die Protein-Protein-Interaktionen am C-Terminus stören, konnte die Dimerisierung gehemmt werden. Mittels Durchflusszytometrie- und Thermophoresemessungen konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung des HSP90-Proteins durch die entwickelten Proteine verhindert wurde. Jedoch müssen die Inhibitoren für zellbiologische Untersuchungen optimiert werden, da die Peptide so nicht in der Zellkultur oder *in vivo* eingesetzt werden konnten [Bopp et al., 2016]. Der Einsatz von C-terminalen HSP90i in der Klinik erfolgte bislang noch nicht, eröffnet damit aber neue Angriffsmöglichkeiten.

Die vielversprechenden Ergebnisse beim Einsatz von HSP90i in *in vitro* Studien konnten in der Klinik bislang nicht reproduziert werden. Ein Grund könnte sein, dass die beste HSP90i Effektivität bei Tumorentitäten mit überexprimierten oder dauerhaft aktivierten Klientprotein von HSP90 gesehen werden. So ist zum Beispiel der Einsatz von HSP90i bei ErbB2 positiven Brustkarzinomen begründet [Butler et al., 2015]. Ein weiterer Faktor ist die beobachtete Überexpression des Hsf1 Proteins nach dem Einsatz von HSP90i und der daraus resultierenden *heat shock response*. So führt der Einsatz von HSP90i häufig zur Überexpression von Hsf1, welches wiederum zur Überexpression von HSP70, HSP40 und HSP27 führt, die dem Überleben der Zelle helfen. Somit wird der Effekt der HSP90i vermindert. Es werden bereits Inhibitoren von Hsf1 und HSP70 als mögliche Kombinationspartner mit den HSP90i getestet, um diesen Regulationsmechanismus zu verhindern [Wang and McAlpine, 2015]. C-terminale Inhibitoren des HSP90 zeigten bislang keine Überexpression des HSR-Systems [Butler et al., 2015]. Um den kompensatorischen Mechanismen nach der HSP90i-Gabe entgegen zu wirken, wurden Kombinationen mit anderen Substanzen getestet. Unter anderem wurden in klinischen Studien bereits HSP90i mit Docetaxel, Trastuzumab oder Kinaseinhibitoren (z.B.

Crizotinib) kombiniert [Tatokoro et al., 2015]. In präklinischen Studien erfolgt die Kombination der HSP90i mit weiteren Substanzgruppen. So sind viele Zytostatika (Taxane, Cisplatin, Gemcitabin und Cytarabin), Todesrezeptor-modulierende Substanzen (TRAIL), Proteasominhibitoren (Bortezomib), Proteinkinaseinhibitoren (Imatinib), HDACi sowie neuere Substanzgruppen (z.B. Emunin, ein Inhibitor der HSR) vertreten [Lu et al., 2012]. Bei der Kombination von 17-AAG mit Carboplatin an unterschiedlichen Ovarialkarzinomzellen, ergab sich jedoch kein synergistischer Effekt bezogen auf die Zytotoxizität. Es wurden sogar antagonistische Wirkungen beobachtet. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Reihenfolge der Applikation ausschlaggebend für den Erfolg war. So führte eine gleichzeitige Gabe von Carboplatin und 17-AAG zu einem antagonistischen Effekt, während eine sequentielle Gabe zu einem synergistischen Effekt führte, unabhängig davon, ob 17-AAG oder Carboplatin zuerst verabreicht wurde [Banerji et al., 2008]. An gastrointestinalen Karzinomen wurde gezeigt, dass der Einsatz eines HSP90i zu einer Reduktion des IGF-1R führte. Durch eine Kombination des HSP90i (Retaspimycin) mit einem Akt-Inhibitor (Triciribin) ergab sich ein additiver Effekt auf die Proliferation, Zellzyklus und Apoptose. Dies wurde auch durch den Einsatz eines mTOR-Inhibitors (Everolimus) beobachtet, der ebenfalls in den PI3K/Akt-Signalweg eingreift [Gloesenkamp et al., 2012]. Durch die Kombination der HSP90i mit anderen Inhibitoren als auch mit Zytostatika, könnten Kompensationsmechanismen vermindert und somit der Therapieerfolg erhöht werden.

3.3.3 Posttranslationale Beeinflussung der HSP90-Aktivität

Das HSP90-Protein wird außer durch das Hsf1 Protein noch durch posttranslationale Modifikationen reguliert. Hierunter fallen Phosphorylierungen, Methylierungen, S-Nitrosylierungen, Ubiquitinierungen und Acetylierungen [Prodromou, 2016]. Der Acetylierungsstatus des HSP90-Proteins weist dabei den bedeutendsten Effekt auf. Deacetylierungen von HSP90 erfolgen hauptsächlich durch HDAC6, aber auch durch HDAC1 und HDAC10 [Prodromou, 2016]. Microarrayanalysen zeigten, dass durch den HDACi Einsatz lediglich 2-5% der Gene beeinflusst werden. Dies stärkt die Theorie, dass nicht nur epigenetische Regulierungen, sondern auch Beeinflussungen des Acetylierungsstatus von Nicht-Histon-Proteinen (z.B. HSP90, α -Tubulin, β -Catenin oder p53) eine wichtige Rolle beim Effekt der HDACi spielen [New et al., 2012]. Vor allem die Inhibition von HDAC6 führt zur Acetylierung und somit zur Störung der Funktionalität des HSP90-Proteins [Kovacs et al., 2005]. Dies wiederum führt zur verminderten Expression

von Bcr-Abl, c-RAF, Akt, ErbB1, und ErbB2 durch eine proteosomale Degradierung der Klientproteine [Bolden et al., 2006, Kramer et al., 2014, Bali et al., 2005]. Außerdem kommt es durch die Hyperacetylierung von HSP90 zu einer verminderten Interaktion mit den Cochaperonen, wie z.B. p23 [Kovacs et al., 2005]. Zusätzlich kann HDAC6 Hsf1 aktivieren, indem es zur Dissoziation von Hsf1 von HSP90 führt. Erst dann kann HSP90 seine Funktion ausführen [Haakenson and Zhang, 2013].

Die Kombination von HDACi und HSP90i wurde bereits an einigen Tumorzellen getestet. So zeigte die gemeinsame Therapie von 17-AAG mit Panobinostat einen Synergismus bei der Apoptoseinduktion an akuten myeloischen Leukämiezellen [George et al., 2005]. Es kam durch den Einsatz von Panobinostat zu einer Hyperacetylierung der H3 und H4 Histone sowie zu einer erhöhten Expression von p21. Die Kombination mit 17-AAG führte zu einer verminderten Phosphorylierung des Akt-Proteins. An anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzellen führte die gleichzeitige Gabe von Belinostat und NVP-AUY922 zu synergistischen zytotoxischen Effekten. Durch den Einsatz der Kombination der beiden Inhibitoren konnte die Akt-Expression stärker vermindert werden als durch den Einsatz der Inhibitoren allein. Dies bestätigte, dass eine Inaktivierung des PI3K/Akt-Signaltransduktionsweges für die erhöhte Zytotoxizität verantwortlich war [Kim et al., 2015]. Der HSP90-Inhibitor SNX5422 zeigte an anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzellen synergistische Effekte in der Kombination mit Belinostat, Vorinostat oder Trichostatin A. Die gleichzeitige Behandlung mit einem der HDACi und SNX5422 führte zu einer verringerten Expression von Akt und dessen Phosphorylierung, sowie zu einer erhöhten Acetylierung der Histone H3 und H4 [Kim et al., 2016]. Folglich wurden die Effekte beider Inhibitoren verstärkt. In Myelomzellen wurde NVP-AUY922 jeweils mit Panobinostat, Vorinostat, Melphalan oder Doxorubicin kombiniert. In allen Kombinationen wurde ein synergistischer Effekt bezogen auf die Apoptoseinduktion und Zellviabilität festgestellt, bei einer Applikation von NVP-AUY922 24 Stunden nach der Applikation der anderen Substanzen. Zusätzlich zeigten Kaiser et al., dass die HSP90i einen stärkeren Effekt aufwiesen, wenn die Kombinationspartner zunächst für 24 Stunden präinkubiert wurden. Bei der Kombination der HDACi mit HSP90i wurde dies dadurch erklärt, dass die HDACi zunächst für eine Hyperacetylierung des HSP90-Proteins sorgen. Dadurch wird bereits die Aktivität des HSP90-Proteins vermindert. Durch die zusätzliche Gabe eines HSP90i wird der Effekt verstärkt. Dies konnte sogar an gegenüber HSP90i intrinsisch resistenten Zellen gezeigt werden. So ließ sich hier durch eine

Kombinationstherapie ein Ansprechen auf die HSP90i-Therapie zeigen [Kaiser et al., 2010]. An NSCLC-Zellen wurde durch die gleichzeitige Gabe von 17-DMAG und PTACH (ein HDACi) ebenfalls eine erhöhte Apoptoseinduktion gezeigt. Dies wurde mit einer stärkeren Schädigung am endoplasmatischen Retikulum korreliert. Zismanov et al. stellten dabei die Hypothese auf, dass es durch den Einsatz des HSP90i zu einer verstärkten Aggregation der nicht korrekt gefalteten Proteine kommt. Der HDACi-Einsatz führt dazu, dass die Aggregate von der Zelle nicht entfernt werden. Im Folgenden kommt es zum zellulären Stress und schließlich zur Apoptoseinduktion [Zismanov et al., 2013]. Der Einsatz einer Kombinationstherapie von HSP90i mit HDACi ist auf molekularer Ebene begründet, da eine Vielzahl an Genen sowohl von den HDACi als auch von den HSP90i adressiert wird.

4 Zielsetzung

Bei Ovarialkarzinomen ist die Resistenz gegenüber platinhaltigen Zytostatika ein großes klinisches Problem. Resistente Ovarialkarzinome sind heterogen und lassen sich nicht einheitlich therapieren. Diese Arbeit beschäftigt sich mit neuen Strategien zur Adressierung von Chemoresistenzen bei Ovarialkarzinomen.

Ziel war, durch Wirkstoffkombinationen die Platinsensitivität von Ovarialkarzinomzellen zu erhöhen. Dafür wurden Inhibitoren eingesetzt, die in mehrere Signaltransduktionswege gleichzeitig eingreifen. Zum einen waren dies Inhibitoren der Histon-Deacetylase (HDACi) und zum anderen Inhibitoren des HSP90-Proteins (HSP90i). Beide Inhibitorclassen wurden ebenfalls gemeinsam als Kombination mit Cisplatin, also als Tripeltherapie, eingesetzt, um eine gesteigerte Beeinflussung der Cisplatinsensitivität im Vergleich zur dualen Therapie zu erzielen.

Ein weiteres Ziel war, zu untersuchen, ob die Entstehung von Platinresistenzen durch den Einsatz von HDACi oder HSP90i verhindert werden kann. Dafür wurden die HDACi sowie die HSP90i vor der Entstehung einer Resistenz gegenüber Cisplatin eingesetzt und die Resistenzentwicklung über einen Zeitraum von bis zu 36 Wochen unter permanenter Anwesenheit des Inhibitors untersucht.

Als weiteres Ziel sollten potentielle HSP90i, welche in der Arbeitsgruppe von Prof. Kurz synthetisiert wurden, auf die Inhibition der Protein-Protein-Interaktion am HSP90-Protein und die antitumor-Wirkung an Ovarialkarzinomzellen getestet werden.

5 Materialien und Methoden

5.1 Reagenzien, Chemikalien und Nährmedien

Tabelle 5.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
Acetyl-Coenzym A-Trilithiumsalz	AppliChem, Darmstadt
Adenosintriphosphat-Dinatriumsalz Hydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumperoxodisulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau-Natriumsalz	Acros Organics/Thermo Fisher Scientific Inc., USA
BSA (Rinderserumalbumin)	AppliChem, Darmstadt
BS ₃ – Bis(Sulfosuccinimidyl)suberat	Thermo Scientific, Rockford, USA
RLT Puffer	QIAGEN, Hilden
Calciumchlorid-Dihydrat	KMF Laborchemie, Leipzig
Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon	Acros Organics/Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Cisplatin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Creatin-Phosphat Dinatriumsalz-Tetrahydrat	AppliChem, Darmstadt
Creatin-Phospho-Kinase aus Kaninchenmuskeln	Sigma-Aldrich, Steinheim
DDK38Phth, DDK51Phth	Synthese im AK Kurz von Daniela Diedrich
DDK51Cbz, DDK77Cbz, DDK78Cbz, DDK79Cbz, DDK81Cbz, DDK88Cbz, DDK89Cbz, DDK124Cbz, DDK125Cbz, DDK137Cbz	Synthese im AK Kurz von Daniela Diedrich
Dimethylsulfoxid (DMSO), p.a.	VWR® BDH PROLABO®, Darmstadt

Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
Dinatriumphosphat-Dihydrat	VWR® BDH PROLAB®, Darmstadt
Dithiothreitol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
D-Luciferin-Natriumsalz	AppliChem, Darmstadt
DNase-freie RNase A	AppliChem, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
EGS - Ethylenglycolbissuccinimidylsuccinat	Thermo Scientific, Rockford, USA
Eosin B (C.I. 45400)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol AnalaR NORMAPUR	VWR® BDH PROLABO®, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat	AppliChem, Darmstadt
Fetales Kälberserum	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Glycerol wasserfrei, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Helipur®	B Braun Melsungen AG, Melsungen
Isopropanol, techn.	Abfüllung Zentrales Chemikalienlager HHU
Kaliumchlorid AnalaR NORMAPUR	VWR® BDH PROLABO®, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
LMK235	Synthese im AK Kurz analog zu [Marek et al., 2013]
LSK082, LSK084, LSK090, LSK096	Synthese im AK Kurz von Lukas Spanier [Spanier, 2014]
Luciferase aus Photinus pyralis (L9506)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
Lysis Buffer 6	R&D Systems, Wiesbaden
Magnesiumacetat-Tetrahydrat	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
2-Mercaptoethanol 99%, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol, techn.	Abfüllung Zentrales Chemikalienlager HHU
2-Methoxyethanol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Milchpulver Blotting Grade	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumazid 99%	ACROS ORGANICS/Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Natriumchlorid AnalaR NORMAPUR	Fisher Chemicals, Thermo Scientific, Rockford, USA
Natriumchlorid-Lösung 0,9% (isotonisch)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Natriumcitrat tribasisch-Dihydrat	Fisher Chemicals, Thermo Scientific, Rockford, USA
Natriumhydrogencarbonat AnalaR NORMAPUR	VWR® BDH PROLABO®, Darmstadt
Natriumhydroxid	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Novobiocin	AppliChem, Darmstadt
NVP-AEW541	Novartis Pharma GmbH, Basel
NVP-AUY922	Novartis Pharma GmbH, Basel
NVP-BEZ235	Novartis Pharma GmbH, Basel

Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
NVP-HSP990	Novartis Pharma GmbH, Basel
Paclitaxel	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln
PageRuler™, vorgefärbte Proteinleiter	Thermo Scientific, Rockford, USA
PageRuler Plus™, vorgefärbte Proteinleiter	Thermo Scientific, Rockford, USA
Panobinostat	Selleckchem, Eching
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 U/ml; 10 mg/ml)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Pierce® BCA Protein Assay Reagents	Thermo Scientific, Rockford, USA
Propidiumiodid	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Q-VD-Oph Hydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Reinstwasser (Aqua bidestilla)	Eigene Herstellung
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure 37% AnalaR NORMAPUR	VWR® BDH PROLABO®, Darmstadt
SDS Ultra pure	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Steriles Reinstwasser	Bidestilliertes Wasser autoklaviert
Tetramethyldiamin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tetramethylrhodaminethylesterperchlorat	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln
N-Tris(hydroxymethyl)-methyl-glycin (Tricin)	AppliChem, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	AppliChem, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan- hydrochlorid (Tris-HCl)	AppliChem, Darmstadt

Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
Triton [®] X-100	AppliChem, Darmstadt
Trypsin-EDTA Lösung 1x	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Tween [®] 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Vorinostat	Synthese im AK Kurz von Linda Marek
Western Blotting Luminol Reagents	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

5.2 Antikörper

Tabelle 5.2 Verwendete Antikörper.

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Goat Anti-EGFR	R&D Systems, Wiesbaden	1:250
Goat Anti-ErbB2	R&D Systems, Wiesbaden	1:500
Goat Anti-HSP90 α , β	R&D Systems, Wiesbaden	1:1000
Mouse Anti- α -Tubulin	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:200
Mouse Anti- β -Aktin (C4)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:2000
Mouse Anti-acetylated- α -Tubulin	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:200
Mouse Anti-p-ERK	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:200
Rabbit Anti-Akt1/2/3	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:200
Rabbit Anti-p-Akt1/2/3	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:2000
Rabbit Anti-HSP90 α/β , C-Terminus (sc-7497)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:2000

Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-goat IgG-HRP	R&D Systems, Wiesbaden	1:3000
Anti-mouse IgG-HRP	R&D Systems, Wiesbaden	1:3000
Anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:3000

5.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5.3 Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
BD Discardit™ II Spritzen 2 ml	Becton Dickinson S.A., Fraga, Spanien
Biosphere® Pipettenspitzen mit Aerosolfilter 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Chromatographie Papier	Whatman® International Ltd, Maldstone, UK
Gewebekulturflaschen T25, T75, T175	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Immobilon®-P Transfer Membran, Porengröße 0,45 µm	Millipore Corporation, Billerica, USA
Kryoröhrchen Cryo Pure	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Parafilm®	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
PCR-Reaktionsgefäße MicroAmp Tubes 0,2 ml	Applied Biosystems/Applera, Darmstadt
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl, 5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Pipettenspitzen mit Kapillare für Gelbeladung	VWR, Darmstadt
PP-Mikroplatte weiß, 96K	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
PP-Röhre 15 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Röhren 3,5 ml, 55 x 12 mm, PS	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Sterile Einmalpipetten 10 ml	VWR, Darmstadt
Sterilfilter aus Celluloseacetat 0,2 µm	VWR, Darmstadt
Zellkultur-Mikroplatte 96-Well (Costar®)	Corning Inc., Corning, USA
Zellkultur Multiwell Platte 6-Well, 24-Well	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

5.4 Geräte

Tabelle 5.4 Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Heizblock AccuBlock™ Digital Dry Bath	Labnet International Inc., Edison, USA
Autoklav Systec V-65	Systec GmbH, Wetzlar
2100 Bioanalytiker	Agilent Technologies, USA
Blottingapparatur Semi-Dry-Blotter	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Durchflusszytometer CyFlow space	Partec GmbH, Münster
Feinwaage ABS 220-4	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommen
Feinwaage BP 221S	Sartorius AG, Göttingen

Gerät	Hersteller
Gelelektrophoresekammer Bio-Rad MINI-SUB® Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
NanoPhotometer P300	Implen GmbH, München
Inkubator Heraeus® Function-line	Heraeus®/Thermo Electron Corporation, Dreieich
Laminar air flow Werkbank MSC-advantage	Thermo Scientific, Dreieich
Laminar air flow Werkbank Hera Safe	Heraeus®/Thermo Electron Corporation, Dreieich
Magnetrührer IKA® RCT basic	IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen
Mikroplatten-Messgerät FLUOstar	BMG Labtechnologies, Offenburg
Mikroplatten-Messgerät LUMIstar	BMG Labtechnologies, Offenburg
Motic® AE 20/21 Inversmikroskop	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar
NanoKüvette IMPLEN	Implen GmbH, München
Neubauerzählkammer	LO-Laboroptik GmbH, Bad Homburg
PCR-Werkbank	Envirco Corporation, Sandorf, US
pH-Meter 713	Metrohm GmbH & Co. KG, Filderstadt
Roller mixer SRT6	Bibby Scientific LTD, Stone (Staffordshire), UK
Schwenker Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwalbach
Spannungsquellen: Power Pack 3000 Standard Power Pack P25	Bio-Rad Laboratories GmbH, München Biometra GmbH, Göttingen
Trockenschrank	Heraeus Instrument GmbH, Hanau

Gerät	Hersteller
Ultraschallbad Sonorex Super RK514BH	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
UV-Vis-Spektrometer Spectronic Genesys 10 Bio	Thermo Electron GmbH, Dreieich
Vortex-Genie®	VWR, Darmstadt
Waage SBA52	SCALTEC Instruments, Heiligenstadt
Wasserbad mit Heizelement Julabo 19/ED	JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach
Western Blot-Detektionssystem INTAS ChemiLux ECL Imager HR16 Pro	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Zentrifugen: MIKRO 200R ROTINA 420R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

5.5 Programme und Software

Tabelle 5.5 Verwendete Programme und Software.

Programm	Hersteller
CalcuSyn 2.1	Biosoft, Cambridge, U.K.
FloMax 2.82	Partec GmbH, Münster
GraphPad Prism® 4.00	GraphPad Software, San Diego, USA
ImageJ 1.47v	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
INTAS ChemoStar	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Microsoft Office Excel 2010	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim

Microsoft Office Word 2010	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Motic Images Plus 2.0	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar

5.6 Puffer und Lösungen

5.6.1 Zellkultur

Eosin-Lösung 0,4% (m/V) zur Zellzahlbestimmung

60 mg Eosin wurden in 15 ml Natriumchlorid-Lösung 0,9% (m/V) gelöst. Die Lösung wurde bei 2-8°C gelagert.

PBS 10X

NaCl	1,4 M
KCl	30 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	80 mM
KH ₂ PO ₄	15 mM

Die Salze wurden in Aqua dest. gelöst, ein pH-Wert von 7,4 eingestellt und zu 50 ml aliquotiert. Bei Bedarf wurde eine 1:10 Verdünnung mit Aqua dest. hergestellt. Nach dem Autoklavieren war die Lösung gebrauchsfertig.

Nährmedien

DMEM bzw. RPMI 1640 wurden je nach Zelllinie mit 10% FKS versetzt, welches zuvor bei 56°C für eine Stunde inaktiviert wurde. Den Nährmedien wurden außerdem 120 U/ml Penicillin und 120 µg/ml Streptomycin zugegeben. Die Lagerung erfolgte bei 2-8°C.

5.6.2 BCA Protein Assay

BSA-Standard

Der BSA-Standard wurde in steril filtriertem Aqua dest. zu einer Konzentration von 2 mg/ml gelöst. Für die Standard-Verdünnungsreihe wurden folgende Konzentrationen in steril filtriertem Aqua dest. hergestellt: 1.500, 1.000, 700, 500, 250, 125 und 25 µg/ml. Die Verdünnungsreihe wurde bei -20°C gelagert.

Kupfersulfatlösung

Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat wurde zu 4% (m/V) in destilliertem Wasser gelöst.

BCA-Working reagent

Das *BCA Protein Assay Reagent A*, welches die Bicinchoninsäure enthält, wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration 50:1 mit Kupfersulfatlösung gemischt. Diese Mischung wurde stets frisch kurz vor der Verwendung hergestellt.

5.6.3 Elektrophoresen

Laemmli-Puffer 2X mit 2-Mercaptoethanol

Tris	125 mM
SDS	6% (m/V)
2-Mercaptoethanol	10% (V/V)
Glycerin	30% (V/V)
Bromphenolblau	1 Spatelspitze

Die Substanzen wurden in Aqua dest. ad 10 ml gelöst, der pH-Wert auf 6,7 eingestellt und Bromphenolblau hinzugefügt.

APS-Lösung 10%

1 g Ammoniumperoxodisulfat wurden in 10 ml Aqua dest. gelöst, anschließend aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Sammelgelpuffer 4X (SDS-PAGE)

Tris	0,5 M
SDS	0,4% (m/V)

Die Substanzen wurden in Aqua dest. ad 1000 ml gelöst und der pH-Wert mit 6 N HCl auf 6,8 eingestellt.

Trenngelpuffer 4X (SDS-PAGE)

Tris	1,5 M
SDS	0,4% (m/V)

Die Substanzen wurden in Aqua dest. ad 1000 ml gelöst und der pH-Wert mit 6N HCl auf 8,8 eingestellt.

SDS-Laufpuffer 10X

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	1% (m/V)

Die Substanzen wurden in Aqua dest. ad 1000 ml gelöst. Der Puffer wurde 1:10 mit Aqua dest. zur weiteren Anwendung verdünnt.

5.6.4 Western Blot

Semi-Dry Puffer

SDS-Laufpuffer 1X mit 10 % Methanol versetzt.

Blocking Puffer

In TBST 1X wurden 3 % Milchpulver gelöst.

TBS 10X

Tris	200 mM
NaCl	9% (m/V)

Die Salze wurden in Aqua dest. ad 1000 ml gelöst und der pH-Wert auf 7,4 mit 6 N HCl eingestellt. Der Puffer wurde 1:10 mit Aqua dest. zur weiteren Anwendung verdünnt.

TBST 10X

Tris	200 mM
NaCl	9% (m/V)
Tween 20	1% (m/V)

Die Substanzen wurden in Aqua dest. ad 1000 ml gelöst. Der pH-Wert wurde mit 6 N HCl auf 7,4 eingestellt. Der Puffer wurde 1:10 mit Aqua dest. zur weiteren Anwendung verdünnt.

5.6.5 MTT Assay

Natriumchlorid-Lösung (0,9 % (m/V))

0,9 g Natriumchlorid wurden in 100 ml Aqua dest. gelöst und anschließend autoklaviert. Die Lösung wurde nach Aliquotierung zu je 50 ml bei -20°C gelagert.

Cisplatin-Stammlösung

Cisplatin wurde in autoklavierter 0,9% (m/V) Natriumchlorid-Lösung zu 5 mM gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Cisplatin-Standard-Verdünnungsreihe wurde aus der Stammlösung mit autoklavierter 0,9% (m/V) NaCl-Lösung in den Konzentrationen $10^{2,5}$ M, 10^{-3} M, $10^{-3,5}$ M, 10^{-4} M, $10^{-4,5}$ M, 10^{-5} M, $10^{-5,5}$ M, 10^{-6} M und 10^{-7} M verdünnt. Die Verdünnungsreihe wurde bei -20°C gelagert. 0,9%-ige NaCl-Lösung wurde im MTT Assay für die Cisplatinverdünnungsreihe als Lösemittelkontrolle eingesetzt.

MTT-Lösung

250 mg MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) wurden in 50 ml PBS gelöst und bei 2-8°C im Dunkeln gelagert.

Stammlösungen und Verdünnungen anderer Stoffe

Von den zu testenden Substanzen wurden Stammlösungen in der Konzentration 10^{-2} M in DMSO hergestellt und bei -20°C gelagert. Wenn die Substanzen nicht in dieser Konzentration löslich waren, wurden geringere Konzentrationen in der höchsten möglichen Konzentration hergestellt. Aus den Stammlösungen wurden Verdünnungsreihen in den jeweiligen Nährmedien hergestellt. Die finale Konzentration an DMSO auf den Zellen überschritt dabei nie 1%. Diese DMSO-Konzentration führte zu keinem Effekt an den Zellen. Als Kontrolllösung wurde für die Inhibitoren im MTT-Assay Medium verwendet.

5.6.6 Apoptose Assay

Propidiumiodid Stammlösung

Propidiumiodid wurde in sterilem Aqua dest. zu 500 µg/ml gelöst und die Lösung bei 2-8°C im Dunkeln gelagert.

Lysis-Puffer

Na-Citrat	0,1% (m/V)
Triton X-100	0,1% (V/V)
Propidiumiodid	100 µg/ml

Für den hypotonen Puffer zum Lysieren der Zellen wurden die Substanzen in steril filtriertem Aqua dest. gelöst. Der Puffer wurde im Dunkeln bei 2-8°C gelagert.

Sheath fluid

Als *sheath fluid* für die Durchflusszytometrie wurde kommerziell erhältliche sterile 0,9%iger Natriumchloridlösung verwendet, die mit 0,01% Natriumazid zur Konservierung versetzt wurde. Zur Entfernung von Luftblasen wurde das *sheath fluid* vor Benutzung für mindestens 30 Minuten im Ultraschallbad entgast.

5.6.7 Zellzyklusanalyse

Ethanol-Lösung

Absoluter Ethanol wurde mit Aqua dest. zu 70% verdünnt und bei -20°C gelagert.

Färbelösung

Triton X-100	0,5 µl
DNase freie RNase (10 mg/ml)	10 µl
Propidiumiodid	20 µg/ml
NaCl 0,9%, steril	500 µl

Die Lösung wurde kurz vor der Verwendung hergestellt und im Dunkeln auf Eis gelagert.

Die Mengenangaben beziehen sich auf das Zellpellet einer zu vermessenden Probe.

5.6.8 Membranintegrität

Färbelösung

20 µg/ml Propidiumiodid wurde in 0,9%iger kommerziell erhältlicher steriler Natriumchloridlösung gelöst. Pro Zellpellet einer zu vermessenden Probe wurden 500 µl Färbelösung verwendet. Die Lösung wurde stets frisch hergestellt und im Dunkeln auf Eis gelagert.

5.6.9 Luciferase-Rückfaltungs-Assay

Stabilitätspuffer

Tricin-HCl	25 mM
MgSO ₄	8 mM
Natrium-EDTA	0,1 mM
Glycerol	10%
Triton X-100	0,01%
BSA	10 mg/ml

Die Substanzen wurden in steril filtriertem Aqua dest. ad 10 ml gelöst. Der Stabilitätspuffer wurde verwendet, um die Luciferase in einer Konzentration von 0,5 mg/ml in Lösung zu halten. Die Luciferase setzt $15\text{-}30 \times 10^6$ Lichteinheiten/mg um.

Tris-Puffer

Tris-HCl	20 mM
KCl	75 mM

Die Substanzen wurden in steril filtriertem Aqua dest. ad 10 ml gelöst und ein pH von 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde bei -20°C gelagert.

Cold Mix

Tris-HCl	66,67 mM
Mg(CH ₃ COO) ₂	6,67 mM
KCl	250 mM
ATP-Dinatriumsalz	10 mM
Creatin-Phosphat	16,67 mM

Die Substanzen werden in steril filtriertem Aqua dest. gelöst. Es wurden jeweils maximal 1,5 ml hergestellt und bei -20°C gelagert, um das Creatin-Phosphat keinen häufigen Auftau- und Einfrierzyklen auszusetzen.

Master Mix

steril filtriertes Aqua dest.	6,6 µl
Cold Mix	4,8 µl
Creatin-Phospho-Kinase (10 mg/ml)	0,48 µl
denaturierte Luciferase (0,5 mg/ml in Stabilitätspuffer)	0,12 µl

Für jeden Assay wurden die oben genannten Mengen bei Assaydurchführung pro Well zusammenpipettiert und auf Eis gelagert. Die denaturierte Luciferase wurde erst kurz vor dem Gebrauch zu den restlichen Bestandteilen gegeben. Es wurde jeweils ein 10%iger Überschuss hergestellt, um den Pipettierverlust auszugleichen.

Assay Puffer

Tricin	25 mM
MgSO ₄	8 mM
Natrium-EDTA	0,1 mM
Dithiothreitol (DTT)	33 µM
D-Luciferin	50 µM
Coenzym A	240 µM

Die Substanzen, mit Ausnahme von D-Luciferin und Coenzym A wurden in steril filtrierte Aqua dest. ad 15 ml gelöst und ein pH von 7,8 eingestellt. Die Lösung wurde bei -20°C gelagert. Vor der Verwendung wurden D-Luciferin und Coenzym A dem Assaypuffer frisch zugesetzt.

5.7 Zelllinien

Tabelle 5.6 führt die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien auf. Die Cisplatin-resistenten Zelllinien Cal27CisR, CaOV3CisR, Kyse510CisR und OVCAR3CisR wurden analog zu [Eckstein et al., 2009] und [Gosepath et al., 2008] im Arbeitskreis Prof. Kassack generiert und im selben Nährmedium wie die Ursprungszelllinie kultiviert.

Tabelle 5.6 Verwendete Zelllinien und verwendete Nährmedien.

Zelllinie	Gewebetyp	Nährmedium	Herkunft
A2780	Ovarialkarzinom	RPMI-I	ECACC, Salisbury, Whiteshire, UK
A2780CisR			
Cal27	Zungenkarzinom	DMEM-I	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen, Braunschweig
CaOV3	Ovarialkarzinom	RPMI	ATCC/LGC Standards GmbH Wesel
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen	DMEM-I	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen, Braunschweig
Kyse510	Ösophaguskarzinom	RPMI-I	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen, Braunschweig
OVCAR3	Ovarialkarzinom	RPMI	ATCC/LGC Standards GmbH Wesel

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die A2780 und A2780CisR Zellen als bevorzugtes Testsystem verwendet. Daher wurde an diesen Zelllinien am Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf mittels DNA-Analyse die *short tandem repeats* zur Zellauthentifizierung bestimmt. Es zeigte sich durch einen Abgleich mit der Datenbank der *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC), dass es sich bei den verwendeten Zellen um A2780 und A2780CisR Zellen handelt (siehe Tabelle 5.7).

Tabelle 5.7 Ergebnisse der STR-Analyse an den A2780 und A2780CisR Zellen.

Loci	A2780	A2780 (ECACC)	A2780CisR	A2780CisR (ECACC)
D5S818	11, 12	11, 12	11, 12	11
D16S539	11, 13	11, 13	11, 13	11, 13
vWA	15, 16	15, 16	15, 16	15, 16
D13S317	12, 13	12, 13	13	13
CSF1PO	10, 11	10, 11	10, 11	10, 11
TPOX	8, 10	8, 10	8	8, 10
TH01	6	6	6	6
D21S11	28		28	
D7S820	10	10	10	10
AMEL	X	X	X	X

5.8 Methoden

5.8.1 Zellkultivierung

Die Kultivierung der Zellen erfolgte im entsprechenden Nährmedium im Inkubator bei 37°C, einer relativen Luftfeuchte von 96% und 5% CO₂-Gehalt, der gemeinsam mit dem Hydrogencarbonat des Medium den physiologischen pH-Wert von 7,2-7,4 aufrechterhält. Die Kontamination der Zellen mit Bakterien wurde zum einen durch das Arbeiten unter einer Laminar-Airflow-Sterilwerkbank nach Desinfektion der Arbeitsmaterialien mit Isopropanol 70% (V/V) oder Helipur® 1,5% (V/V) und zum anderen durch den Zusatz von 120 µg/ml Streptomycin und 120 U/ml Penicillin zum Nährmedium verhindert. Das Zellwachstum und die Morphologie wurden mikroskopisch kontrolliert.

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 80-90% in Zellkulturflaschen kultiviert. Zum Passagieren wurde das Nährmedium vollständig entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin 0,02%-EDTA bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von 7 ml Nähmedium wurden die Zellen komplett von der Zellkulturflasche gelöst. Nach dem Überführen der Zellsuspension in eine 50 ml PP-Röhre, dem Zentrifugieren für 4 Minuten bei 1137 rpm und 4°C, wurde der Überstand abgesaugt und das entstandenen Zellpellet in 5 ml Nährmedium resuspendiert. Ein Teil dieser

Zellsuspension wurde für die weitere Kultivierung in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium passagiert.

5.8.2 Zellzählung

Für die Experimente wurden bestimmte Zellzahlen pro Well benötigt, um reproduzierbare Bedingungen gewährleisten zu können. Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden die Zellen zunächst, wie oben beschrieben, geerntet. Von der Zellsuspension wurde je nach Zelllinie eine 1:5 bzw. 1:10 Verdünnung mit Eosinlösung hergestellt. Diese wurde zum Zählen in einer Neubauerzählkammer unter dem Mikroskop verwendet. Bei Eosin handelt es sich um einen roten Farbstoff, der die Zellmembran nicht passieren kann. Dadurch erscheinen abgestorbene Zellen unter dem Mikroskop rot und intakte, lebende Zellen ungefärbt und hell. Die Neubauerzählkammer besteht aus vier Quadranten, die jeweils in 16 Quadrate unterteilt sind. Die Zellen in diesen Quadranten wurden mäanderförmig gezählt, wobei nur die Zellen berücksichtigt wurden, die sich in den Teilquadranten und auf deren jeweiligen linken und oberen Begrenzungen befanden. Um die Zellzahl pro μl Zellsuspension zu berechnen wurde Formel 1 verwendet, die abhängig von der verwendeten Neubauerkammer und vom Verdünnungsfaktor (VF) ist.

Formel 1

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\mu\text{l}} = \frac{\sum n_{1-4}}{0,4} \times VF$$

5.8.3 Bestimmung der Verdopplungszeit

Zur Analyse des Einflusses der Substanzen auf die Zellproliferation wurde von den A2780 Zelllinien die Verdopplungszeit bestimmt. Dafür wurden die Zellen in 24-well Platten ausgesät (A2780 30.000 Zellen/Well, A2780CisR 40.000 Zellen/Well). Nach 24 Stunden wurde je ein Well geerntet, in 1 ml *sheath fluid* verdünnt und die Probe vollständig am Durchflusszytometer gezählt. Dieser Wert entsprach der Zellzahl zum Zeitpunkt Null. Zu diesem Zeitpunkt wurden auch die zu testenden Substanzen zu den Zellen gegeben. Die anderen Wells, sowohl behandelt als auch die unbehandelte Kontrolle, wurden nach 48, 72 und 96 Stunden geerntet und gezählt. Um die Geschwindigkeitskonstante K zu bestimmen, wurden die absoluten Zellzahlen gegen die Zeit aufgetragen. Die Funktionsgleichung dieser Exponentialkurve wurde mit Hilfe von GraphPad Prism ermittelt (siehe Formel 2).

Formel 2

$$y = \text{Start} * e^{k*x}$$

y = Zellzahl zum Zeitpunkt x

Start = Zellzahl zum Zeitpunkt 0

k = Geschwindigkeitskonstante

x = Zeit [h]

Mit Hilfe der Geschwindigkeitskonstante wurde über die Formel 3 die Verdopplungszeit berechnet.

Formel 3

$$VZ = \frac{\ln 2}{k}$$

VZ = Verdopplungszeit [h]

k = Geschwindigkeitskonstante [1/h]

5.8.4 Generierung cisplatinresistenter Zelllinien

Zur Generierung einer cisplatinresistenten Zelllinien wurden die A2780 Zellen analog zu [Engelke et al., 2016] einmal wöchentlich für 6 Stunden mit Cisplatin behandelt. Die eingesetzte Cisplatinkonzentration entsprach dem IC₅₀-Wert der sensitiven Zelllinie A2780, der mittels MTT-Assay bestimmt wurde. Die Zelllinien wurden bei einer Konfluenz von mindestens 40-50% für 6 Stunden mit Cisplatin behandelt. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen und nach 3 Tagen zur Bestimmung des aktuellen IC₅₀-Wertes für einen MTT-Assay ausplattiert. Ein Teil der Zellsuspension wurde in eine Zellkulturflasche überführt, um die Cisplatinbehandlung weiterzuführen. Ein anderer Teil wurde in einer Zellkulturflasche bis zu einer Konfluenz von 90-100% kultiviert und im Folgenden geerntet und bei -80°C in Kryovials gelagert. Der Zellsuspension wurde hierfür 10% DMSO als Gefrierschutz zugesetzt. Der ermittelte IC₅₀-Wert wurde über die Zeit beobachtet. Die Resistenzkinetiken wurden über einen Zeitraum von maximal 36 Wochen durchgeführt. Parallel wurde der IC₅₀-Wert der unbehandelten A2780 Zellen alle zwei Wochen bestimmt, um Zellkultur-typische Schwankungen des IC₅₀-Wertes zu dokumentieren. Der Durchschnitt aller IC₅₀-Werte der unbehandelten A2780 Zellen über die Zeit wurde für die Berechnung des Resistenzfaktors

verwendet. Hierbei wurde der ermittelte IC₅₀-Wert der mit Cisplatin behandelten Zelllinien durch den IC₅₀-Wert der unbehandelten Zelllinie geteilt.

Die hier generierte resistente Zelllinie ohne einen Modulatorzusatz während der Resistenzentwicklung wurde A2780CisR_{neu} genannt. Der finale, gemittelte IC₅₀-Wert über 22 Wochen an A2780CisR_{neu} lag im selben Größenordnungsbereich der A2780CisR. Die durchgeführten Experimente zur Cisplatinsensitivierung wurden mit den A2780CisR durchgeführt. A2780CisR_{neu} wurde nur als Vergleich der Kinetiken verwendet.

Des Weiteren erfolgten Resistenzkinetiken unter Verwendung von A2780 in permanenter Gegenwart von 1 µM NVP-AEW541, 3 nM NVP-AUY922, 3 nM Panobinostat und 200 nM LMK235. Auch diese Zelllinien wurden einmal wöchentlich mit Cisplatin behandelt. Bei der Generierung der A2780CisR LMK235 Zellen musste das Vorgehen angepasst werden, da die Zellen durch den Einsatz von 200 nM LMK235 gegenüber Cisplatin hypersensitiviert wurden. Die eingesetzte Cisplatinkonzentration wurde daher dem ermittelten IC₅₀-Wert von Cisplatin angepasst und allmählich über die Zeit gesteigert, bis die Konzentration der anderen Behandlungen erreicht wurde. Die eingesetzte Cisplatinkonzentration überstieg dabei nie 3,5 µM, die ebenfalls für die Generierung der anderen resistenten Zelllinien verwendet wurde.

5.8.5 MTT-Zellviabilitätsassay

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde der MTT-Assay analog zu [Marek et al., 2013] und [Engelke et al., 2016] verwendet. Dazu wurden die Zellen in 96-well Platten ausgesät und für 24 Stunden unter Kulturbedingungen kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Nährmedium ausgetauscht und die Zellen mit den zu testenden Substanzen versetzt. Nach 72 Stunden wurde zur Bestimmung der Zellviabilität 25 µl MTT-Lösung in jedes Well gegeben. Intakte Zellen mit funktionierendem Stoffwechsel sind in der Lage, das wasserlösliche MTT durch die mitochondriale Dehydrogenase unter NADH-Verbrauch zu violetterem, wasserunlöslichem Formazan umzusetzen. Dafür wurden die Zellen, je nach Zelllinie, 10-20 Minuten im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit dem enthaltenen Formazan in 75 µl DMSO lysiert. Die Absorption wurde bei 544 nm im FLUOstar Mikroplatten-Reader vermessen. Um die Hintergrundabsorption durch Zelltrümmer zu berücksichtigen wurde die 96-well Platte zusätzlich bei 690 nm vermessen. Die erhaltenen Absorptionswerte bei 690 nm wurden von denen von 544 nm subtrahiert. Mit diesen

bereinigten Werten wurde die Auswertung vorgenommen, indem sie gegen den dekadischen Logarithmus der molaren Substanzkonzentration aufgetragen wurden. Mit dem Programm GraphPad Prism wurde eine Konzentrations-Effekt-Kurve mit Hilfe der nicht-linearen Regression unter Verwendung der 4-Parameter-Hill-analogen Gleichung mit variabler Steigung (siehe Formel 4) erstellt.

Formel 4

$$y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{(1 + 10^{((logIC_{50}-x)*Hillsteigung)})}$$

y = Absorption

x = log [Testsubstanz], M

Bottom = niedrigster y-Wert

Top = höchster y-Wert

Hillsteigung = Steigung im Wendepunkt der Kurve

IC₅₀ = Substanzkonzentration im Wendepunkt der Kurve

Zur Analyse des Einflusses von Substanzen auf die Cisplatinsensitivität, wurden die Zellen in der Regel für 48 Stunden mit den Substanzen präinkubiert. Nach Erneuerung des Zellmediums und erneuter Zugabe der Substanzen wurden die Zellen für 72 Stunden mit Cisplatin inkubiert. Bei diesen Versuchen wurde die Zellzahl den längeren Inkubationszeiten entsprechend reduziert. In einigen Experimenten, wurde die Präinkubationszeit auf 0, 6 oder 24 Stunden verringert. Zur Analyse einer Zeitabhängigkeit des Einflusses der Substanzen aufeinander wurden HDACi für 48 Stunden präinkubiert, gefolgt von einer 24-stündigen Inkubation mit dem HDACi und HSP90i und gefolgt von einer 48-stündigen Behandlung mit Cisplatin in Anwesenheit der beiden Inhibitoren.

Im Rahmen von Synergismusstudien nach der Chou-Talalay-Methode [Chou, 2010] wurden die Zellen für 48 Stunden mit den Substanzen inkubiert. Daran schloss sich eine 72-stündige Behandlung mit Cisplatin an. Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Assay ermittelt, durch die die Kombinationsindices mittels Calcsyn berechnet werden konnten. Der resultierende Kombinationsindex (CI) gibt an, ob die Kombination der Inhibitoren einen additiven (CI = 1), synergistischen (CI < 0,9) oder antagonistischen (CI > 1) Effekt hervorrufen.

5.8.6 Luciferase-Rückfaltungs-Assay

Der Assay wurde im Rahmen dieser Arbeit basierend auf [Galam et al., 2007] etabliert. Dabei wurde anstatt des dort eingesetzten Kaninchen Retikulozytenlysates ein Zelllysate der Kyse510 Zellen als HSP90-Quelle verwendet. Das durch hypotone Lyse in Wasser erhaltene Zelllysate enthält neben HSP90 ebenfalls alle nötigen Proteine und Cochaperone zum Ablauf der HSP90-Faltungs-Reaktion. Zur Gewinnung des Zelllysates, wurden Kyse510 Zellen in T175-Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 90-100% kultiviert. Es wurden in der Regel 6-8 Flaschen gleichzeitig geerntet, um für mehrere Assays dieselbe Charge an Zelllysate verwenden zu können. Nach Ablösen der Zellen mit einem Zellschaber, wurden die abgelösten Zellen je Flasche in 7 ml PBS aufgenommen und zentrifugiert (4°C, 1137 rpm, 8 Minuten). Das erhaltene Zellpellet wurde im zweifachen Pelletvolumen in filtriertem Aqua dest. resuspendiert und bei Raumtemperatur für 1 Stunde unter gelegentlichem Vortexen lysiert. Die Lagerung erfolgte nach Aliquotierung in flüssigem Stickstoff. Für den Assay wurde je ein Aliquot des Zelllysates auf Eis aufgetaut, in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bei 4°C für 20 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Für den Assay wurde der Überstand mit demselben Volumen Tris-Puffer verdünnt. Da einige der zu testenden Substanzen schlecht löslich waren, wurden die Verdünnungsreihen der HSP90i in DMSO hergestellt. Der entsprechende Volumenanteil an DMSO (10% bezogen auf das eingesetzte Zelllysatevolumen) wurde als Lösemittelkontrolle eingesetzt. Um das Minimum des Messfensters zu definieren, wurde reinem Tris-Puffer 10% DMSO zugesetzt.

Das Assayprinzip basiert auf der Fähigkeit des HSP90-Proteins, andere Proteine wieder in ihre Tertiärstruktur zu falten. Dafür wurde das Enzym Luciferase verwendet, welches beim Umsetzen des Substrates D-Luciferin Licht freisetzt [Virta et al., 1998]. Das Enzym gelöst in einer Konzentration von 0,5 mg/ml in Stabilitätspuffer wurde vor dem Assay bei 41°C für 10 Minuten im Thermocycler hitzedenaturiert und im Laufe des Assays durch das HSP90-Protein wieder gefaltet und konnte so die ablaufende Reaktion katalysieren (siehe Abbildung 5.1).

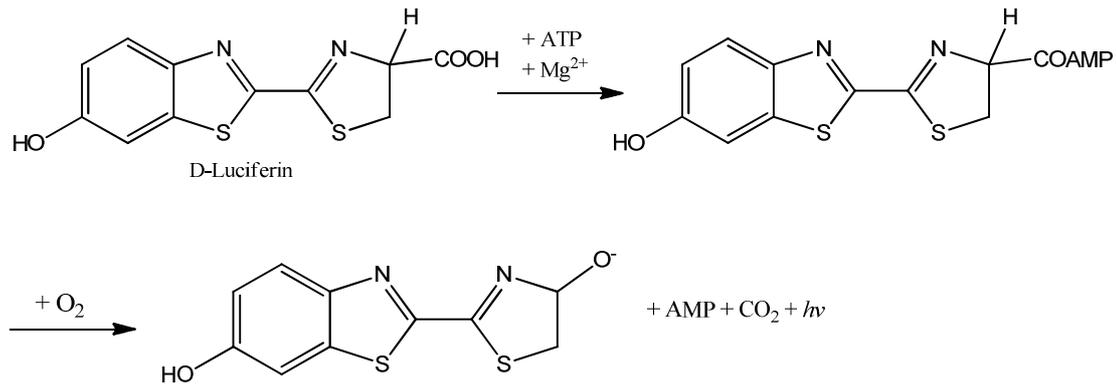


Abbildung 5.1 Durch Luciferase katalysierte Reaktion der Umsetzung von D-Luciferin [Virta et al., 1998].

Um der Inhibition des HSP90-Proteins Zeit zu lassen, wurde das Zelllysate mit dem Inhibitor für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Master Mix, welches die benötigten Cofaktoren wie Magnesium und Kalium und auch die denaturierte Luciferase enthält, zu dem Gemisch gegeben. Pro Well wurden 12 μ l Zelllysate mit 1,2 μ l des Inhibitor oder DMSO (Lösungsmittelkontrolle) und 12 μ l des Master Mix zusammengegeben. Die Lösungsmittel und Negativkontrolle wurden jeweils vierfach vermessen, die Inhibitoren in Triplikaten. Die Volumina wurden für dieselben Bedingungen gemeinsam in ein Eppendorfgefäß pipettiert und von dort jeweils 21 μ l pro Well in eine 96-well Platte gegeben und bei 25°C für 2 Stunden inkubiert. Während dieser Zeit hatte das HSP90-Protein Zeit, die denaturierte Luciferase wieder zu falten, so dass diese wieder aktiv war. Nach Ablauf der Zeit wurden durch den LUMIstar pro Well 100 μ l Assaypuffer hinzugefügt und die Lumineszenz-Zeit-Kurven für 60 Sekunden aufgezeichnet. Im Assaypuffer war das Substrat D-Luciferin enthalten, welches die ablaufende Reaktion startet. Zusätzlich wurden 3 Sekunden vor Zugabe des Assaypuffers die Lumineszenzintensität vermessen um eine Eigenlumineszenz der Stoffe auszuschließen. Zur Auswertung wurden die Maxima der erhaltenen Lumineszenz-Zeit-Kurven verwendet. Zunächst wurden die Mittelwerte der maximalen Lumineszenzintensität der Negativkontrolle von allen anderen Werten abgezogen. Anschließend erfolgte die Auswertung analog zum MTT Assay mit Hilfe des Programms GraphPad Prism und der 4-Parameter-Hill-analogen Gleichung.

5.8.7 Proteinisolierung

Zur Analyse des Einflusses der Inhibitoren auf die Proteinexpression wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 80-90% in einer T25-Zellkulturflasche kultiviert. Anschließend wurde das Nährmedium vollständig entfernt, die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und das PBS wieder vollständig entfernt. Nach Zugabe von Lysis Buffer 6 wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und zur vollständigen Lyse bei 4°C für 30 Minuten gerollt. Das Lysat wurde bei 14.000 rpm und 4°C für 10-15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und weiterverwendet. 10 µl davon wurden für die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Assay eingesetzt. Der restliche Überstand wurde 1:1 mit Laemmli Puffer 2x versetzt, bei 95°C für 5 Minuten erhitzt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

5.8.8 Proteinbestimmung mittels BCA Assay

Zur Quantifizierung des Proteingehaltes der gewonnenen Lysate wurde der BCA Assay analog zu [Engelke et al., 2016] durchgeführt. Nach einer 1:10 Verdünnung des Proteinlysates mit filtriertem Aqua dest. wurden jeweils 25 µl der Proben pro Well in eine 96-well Platte gegeben. Als interner Standard wurde bei jedem Assay eine BSA-Standardreihe integriert. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Zu den Proben und den BSA-Standards wurden jeweils 200 µl des BCA *working reagent* pipettiert und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Das im *working reagent* enthaltene Cu^{2+} wird proportional zur anwesenden Proteinmenge zu Cu^+ reduziert, welches wiederum mit zwei Molekülen BCA einen violetten Chelatkomplex bildet, der bei 544 nm im FLUOstar vermessen wird [Smith et al., 1985]. Mit den erhaltenen Absorptionen der Standardreihe wurde durch lineare Regression die Geradengleichung ermittelt. Die mittels der BSA Standardreihe ermittelte Geradengleichung wurde nach Umformung verwendet, um die jeweilige Proteinkonzentration der Proben zu errechnen. Die Proben und die Standards wurden jeweils in Duplikaten vermessen.

5.8.9 SDS-PAGE

Zur Untersuchung der Proteinexpression wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Zur Untersuchung des HSP90-Proteins und seinen Klientproteinen wurden Trenngele mit 8% Acrylamid, zur Untersuchung der Tubulin und α -Tubulin-Expression 10% Acrylamid verwendet (siehe Tabelle 5.8).

Tabelle 5.8 Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels.

Komponente	Trenngel		Sammelgel
	8%	10%	5%
Rotiphorese® Gel 30	1,6 ml	2,0 ml	0,5 ml
Aqua dest.	2,9 ml	2,5 ml	1,75 ml
Trenngelpuffer 4x	1,5 ml	1,5 ml	-
Sammelgelpuffer 4x	-	-	0,75 ml
APS-Lösung 10%	60 µl	60 µl	30 µl
TEMED	6 µl	6 µl	3 µl

Alle Gele waren 1 mm dick und hatten ein 5%iges Acrylamid-Sammelgel. Die Bestandteile für das Trenngel wurden gemischt und mit einer Pipette zwischen zwei Glasplatten des Mini-Protean® Systems gegeben, so dass noch ausreichend Platz für das Sammelgel blieb. Um eine gerade Oberfläche zu gewährleisten, wurde das Trenngel mit 1 ml Isopropanol überschichtet und das Gel auspolymerisieren gelassen. Der Isopropanol wurde nach Aushärtung des Gels entfernt und mit dem zuvor gemischten Sammelgel aufgefüllt. Zur Ausbildung der Probenaschen wurde ein Kamm eingesetzt und das Gel zur vollständigen Polymerisation über Nacht bei 2-8°C im Kühlschrank gelagert.

Zur Durchführung der Elektrophorese wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit SDS-Laufpuffer 1x gefüllt. Nach Entfernung des Kammes wurden die Probenaschen mit den Proben gefüllt. Mindestens eine Probenasche wurde mit 15 µl der Proteinleiter gefüllt, um eine Größenordnung nach der Proteintrennung durchführen zu können. Es wurde eine Spannung von 80 V angelegt, um die Proteine im Sammelgel zu konzentrieren und ins Trenngel zu überführen. Wenn die Proteine das Trenngel erreicht hatten wurde die Spannung auf 160 V hochgesetzt. Die Elektrophorese wurde bis zur vollständigen Auftrennung der Proteine durchgeführt und das Trenngel anschließend für den Western Blot verwendet.

5.8.10 Western Blot

Zunächst wurden die Proteine aus dem Trenngel auf eine Polyvinylidenfluorid(PVDF)-Membran überführt. Dafür wurde die PVDF-Membran 10 Sekunden in Methanol aktiviert und anschließend für mindestens 15 Minuten in Semi-Dry Puffer äquilibriert. Drei zurechtgeschnittene und in Semi-Dry Puffer getränkte Filterpapiere wurden auf die Anodenplatte der Blotting-Apparatur gelegt. Die PVDF-Membran mit dem Trenngel wurden darüber gelegt und mit weiteren drei in Semi-Dry Puffer getränkten Filterpapieren bedeckt. Alle Luftblasen wurden ausgestrichen. Die Blotting-Apparatur wurde mit dem Kathoden-Deckel verschlossen und es wurde für 1 Stunde eine Stromstärke von 40 mA pro Membran angelegt. Durch die senkrecht zur Laufrichtung der Elektrophorese verlaufende Spannung werden die Proteine aus dem Trenngel auf die PVDF-Membran übertragen. Nach Ablauf der Blottingzeit wurde die Membran für eine Stunde in 3% Milchpulver in TBST (Blocking Puffer) bei Raumtemperatur geschwenkt. So wurden nicht besetzte Bindungsstellen der Membran blockiert und können im weiteren Verlauf zu keiner unspezifischen Adsorption der Antikörper führen. Zur gleichzeitigen Detektion des Zielproteins und des Housekeeping-Proteins, wurde die Membran mit Hilfe der Proteinleiter in entsprechende Zuschnitte unterteilt. Durch diese Auftrennung konnten mehrere Proteine zur selben Zeit aus denselben Proben detektiert werden. Die Membranen wurden dafür über Nacht bei 4°C in der entsprechenden Primärantikörper-Lösung geschwenkt. Die Primärantikörper wurden in Blocking Puffer verdünnt, durch Zusatz von 0,01% Natriumazid konserviert und bei -20°C gelagert.

Am nächsten Tag wurde die Primärantikörper-Lösung entfernt und die Membran zweimal mit TBST 1X und einmal mit TBS 1X für jeweils 30 Minuten gewaschen. Die Membran wurde anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur in der frisch hergestellten Sekundärantikörper-Lösung (Verdünnung 1:3000 in Blocking Puffer) geschwenkt. Der Sekundärantikörper ist mit der lichtempfindlichen Meerrettichperoxidase gekoppelt und wird daher im Dunkeln bei 2-8°C gelagert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Membran erneut zweimal mit TBST 1X und einmal mit TBS 1X für jeweils 30 Minuten gewaschen. Die Membranteile wurden in einem ultraklaren PP-Entsorgungsbeutel zusammengesetzt und überschüssiges TBS durch Ausstreichen entfernt. Nach Mischung der beiden Western Blot Luminol Reagenzien im Verhältnis 1:1, wurde jeweils 1 ml pro Membran aufgegeben und für 2 Minuten inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde durch Ausstreichen entfernt. Die Meerrettichperoxidase vom Sekundärantikörper ist in der Lage

das Luminol aus dem Reagenz zu einem Phthalat im angeregten Tripletzustand umzuwandeln. Im Intas Imager wird der Übergang aus dem Tripletzustand in den Singulettzustand, bei dem Photonen freiwerden, sichtbar gemacht. Je nach Intensität der untersuchten Banden wurde eine Belichtungszeit zwischen 8 und 45 Minuten gewählt. Die vorgefärbte Proteinleiter wurde bei eingeschaltetem Licht fotografisch aufgenommen und zur Identifizierung der Proteine verwendet. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Proben wurde das Housekeeper Protein β -Aktin verwendet. Bei der Detektion von Tubulin und α -Tubulin diente HSP90 als Housekeeper-Protein.

5.8.11 HSP90-Dimerisierungsassay

Zur Untersuchung der Fähigkeit des HSP90-Proteins Dimere zu bilden wurde der Dimerisierungsassay analog zu [Yin et al., 2009] durchgeführt. Kyse510 Zellen wurden für 48 Stunden mit HSP90i inkubiert und anschließend die hypotone Zelllyse analog zum Luciferase-Rückfaltungs-Assay durchgeführt. Alternativ wurde Kyse510 Zelllysate mit dem HSP90i inkubiert, gefolgt von einer Crosslinker-Zugabe. Bei einem Crosslinker handelt es sich um eine Substanz, die in der Lage ist zwei oder mehr Moleküle durch eine kovalente Bindung zu verknüpfen. Der Crosslinker enthält dazu zwei oder mehr reaktive Gruppen, um mit funktionellen Gruppen der Proteine zu reagieren. Dabei handelt es sich meistens um primäre Amine, Sulfhydryl- oder Carbonylgruppen. Als Crosslinker wurde EGS (Ethylenglycolbis(succinimidylsuccinate)) eingesetzt. Es handelt sich um ein homobifunktionelles, aminreaktives N-Hydroxysuccinimid. Zum Crosslinken wurde das Zelllysate für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 1,5 mM EGS inkubiert. Anschließend wurden die Proben wie beim Immunoblotting verarbeitet, d.h. in Laemmlipuffer 2x aufgeköcht und danach zur Detektion der Proteine ein Western Blot durchgeführt. Zur Detektion der HSP90-Monomere und -Oligomere wurde ein C-Terminus spezifischer Antikörper verwendet.

5.8.12 Apoptose Assay

Zur Bestimmung der Apoptoseinduktion wurden apoptotische Zellkerne mittels Propidiumiodid angefärbt und analog zu [Nicoletti et al., 1991] analysiert. Die Zellen wurden dafür zunächst in 24-Well Platten ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium erneuert und die Testsubstanzen zu den Zellen gegeben. Als Positivkontrolle für die Apoptoseinduktion wurden 10% DMSO für 24 Stunden auf den Zellen belassen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die 24-Well Platte bei 1.200 rpm und 4°C für 5 Minuten

zentrifugiert. Um die abgesetzten Zellen nicht wieder aufzuwirbeln, wurde die Bremse der Zentrifuge auf die kleinstmögliche Einstellung gesetzt. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit 500 μ l pro Well des hypotonen Lysispuffer versetzt und über Nacht bei 2-4°C lysiert. Durch die erhöhte Membranpermeabilität, die vom Triton X-100 im Puffer verursacht wird, können die Zellkerne durch das Propidiumiodid angefärbt werden. Die gemessene Fluoreszenzintensität korreliert dabei mit dem DNA-Gehalt der Zellkerne, da das Propidiumiodid in die DNA der Zellkerne interkaliert und somit das Emissionsmaximum in den längerwelligen Bereich verschiebt. Durch die während der Apoptose aktiven DNasen wird die DNA im Zellkern gespalten, die degradierte DNA wird im Folgenden aus dem Zellkern ausgeschleust und somit der DNA-Gehalt im Zellkern verringert [Riccardi and Nicoletti, 2006].

Die lysierten Zellen wurden zur Vermessung am Durchflusszytometer je nach Bedarf mit *sheath fluid* verdünnt. Da nur die gefärbten Zellkerne vermessen werden sollten, wurde der Trigger auf den FL2 Kanal gesetzt, der dem Absorptionsmaximum von Propidiumiodid entspricht. Somit wurden nur die Signale erfasst, die in diesem Kanal eine Mindestfluoreszenz aufweisen. Zusätzlich wurden die Zelltrümmer nicht für die Analyse verwendet. Um diese auszuschließen, wurde der Bereich mit den Zelltrümmern, der im Forwardscatter (FSC) und im Sidewardscatter (SSC) dem Bereich ungefähr kleiner 10 entspricht, von der Analyse ausgeschlossen (siehe Abbildung 5.2).

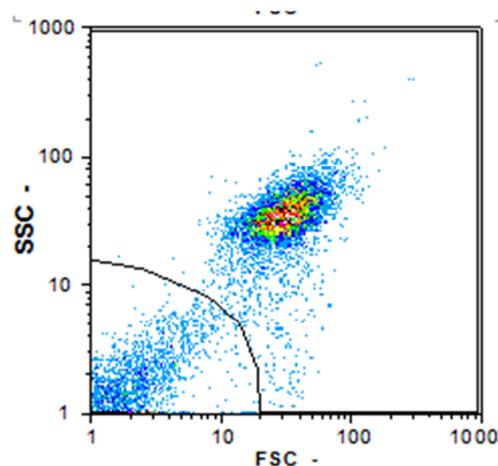


Abbildung 5.2 Kennzeichnung der vermessenen Zellkerne.

Unbehandelte A2780CisR Zellen wurden lysiert und am Durchflusszytometer vermessen. Die Signale unterhalb von 10 im FSC und SSC entsprechen Zelltrümmern und wurden für die Analyse nicht berücksichtigt.

Es wurden pro Probe eine genau festgelegte Anzahl an Signalen innerhalb dieser Region gezählt, mindestens 11.000 Signale. Die Signale der Zellkerne wurden außerdem in einem Histogramm angezeigt. Hier werden die Signale gegen die Fluoreszenzintensität im FL2 Kanal gegeneinander aufgetragen. Anhand der unbehandelten Probe und der Positivkontrolle wurden die Regionen RN1 und RN2 festgelegt. RN1 entspricht dabei den Zellkernen mit einem geringen DNA-Gehalt und somit den apoptotischen Zellkernen und RN2 entspricht den Zellkernen, die einen normalen DNA Gehalt aufweisen (siehe Abbildung 5.3). Für die Analyse wurde der Anteil an apoptotischen Zellen in der Positivkontrolle als 100% Apoptose definiert und die restlichen Ergebnisse darauf bezogen.

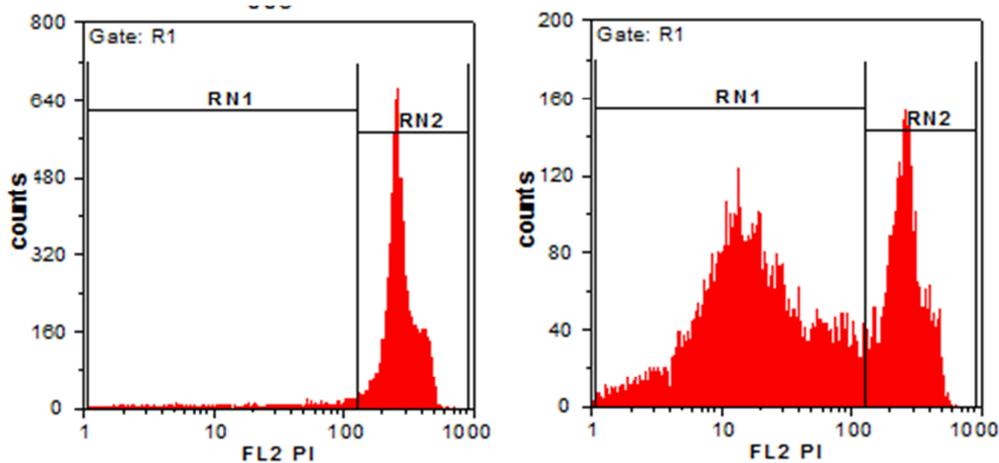


Abbildung 5.3 Analyse der Apoptoseinduktion am Beispiel der unbehandelten A2780CisR Zellen (links) und der Positivkontrolle mit DMSO behandelt (rechts).

Gezeigt ist die Fluoreszenzintensität im FL2 Kanal. Im Bereich RN1 sind die apoptotischen Zellkerne, mit einem geringen DNA Gehalt, in RN2 die nicht-apoptotischen Zellen.

5.8.13 Zellzyklusanalyse

Zur Analyse der Zellzyklusverteilung wurde analog zu [Darzynkiewicz and Juan, 2001] vorgegangen. Die Zellen wurden dafür zunächst in 6-Well Platten ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium erneuert und die Zellen mit den zu testenden Substanzen behandelt. Zur Kontrolle des normalen Verhaltens der Zellen wurde bei jedem Assay für 24 Stunden 50 nM Paclitaxel zum G₂/M-Phasenarrest verwendet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet, wobei der Überstand immer in einem PP-Röhrchen gesammelt wurde. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert und zum Fixieren in 70%igen, -20°C kaltem Ethanol getropft. Dabei wurden nie mehr als 2 Millionen Zellen verwendet. Die fixierten Zellen wurden für mindestens 24 Stunden bei -20°C gelagert. Zum Vermessen der Zellen wurden diese

zunächst 30 Minuten bei 1137 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, wobei noch ca. 1,5 ml im PP-Röhrchen gelassen wurde und mit ca. 8 ml PBS gemischt. Anschließend wurden die Zellen erneut für 30 Minuten bei den gleichen Einstellungen zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt, um das Ethanol vollständig zu entfernen. Abschließend wurden die Zellen in 500 µl Färbelösung resuspendiert und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden auf Eis im Dunkeln gelagert, bis sie am Durchflusszytometer vermessen wurden. Beim Bestimmen der Zellzyklusphasen wurden die Zellen ebenfalls mit Propidiumiodid angefärbt, wobei es sich hier um intakte Zellen handelt. Die in den Zellen vorhandene RNA kann ebenfalls das Propidiumiodid interkalieren, weshalb in der Färbelösung DNase freie RNase enthalten ist. Während des Zellzyklus kommt es zur charakteristischen Verteilung der DNA. Die DNA-Replikation findet während der S-Phase statt, so dass in der G₂/M Phase ein doppelter Chromosomensatz vorliegt, der an einem hohen DNA Gehalt erkennbar ist. Zellen, die weniger DNA als in der G₁-Phase aufweisen, befinden sich in der sub-G₁-Phase, liegen also schon als apoptotische Zellen vor. Diese Phasen lassen sich durch die Propidiumiodidfärbung der DNA im Durchflusszytometer sichtbar machen (siehe Abbildung 5.4). Durch den Einsatz von Paclitaxel kommt es zum Arrest in der G₂/M-Phase, wodurch die G₁-Phase und die G₂/M-Phase deutlich definiert werden können.

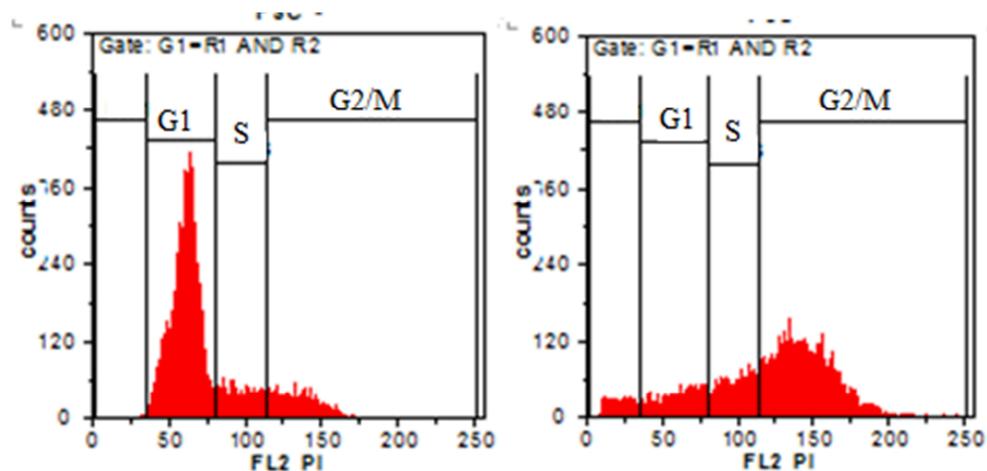


Abbildung 5.4 Analyse der Zellzyklusphasen am Beispiel der unbehandelten A2780CisR Zellen (links) und einer mit Paclitaxel behandelten Probe (rechts).

Einteilung der Zellzyklusphasen mit RN1 für subG₁-Phase, RN2 für G₁-Phase, RN3 für S-Phase und RN4 für G₂/M-Phase.

Die analysierten Zellen enthielten analog zum Apoptoseassay keine Zelltrümmer, da diese über das oben beschriebene Verfahren (siehe Abbildung 5.2) ausgeschlossen wurden. Weiter wurden in diesem Assay Zelldubletten ausgeschlossen. Zelldubletten entsprechen

zwei Zellen der G₁-Phase, die aneinanderheften und daher ein Fluoreszenzsignal in derselben Höhe aufweisen, wie eine Zelle, die sich in der G₂/M-Phase befindet. Zum Ausschließen der Zelldubletten wurde im Dotplot die Signalthöhe der Fluoreszenz (FL2 PI) gegen die Signalfäche (FL2-A PI) aufgetragen. Es wurden die Zellen ausgeschlossen, die sich nicht im linearen Bereich befinden. Dies liegt daran, dass die Signalfäche zwei aneinandergehefteter Zellen größer ist, als diejenige von Zellen mit doppeltem DNA Gehalt (siehe Abbildung 5.5).

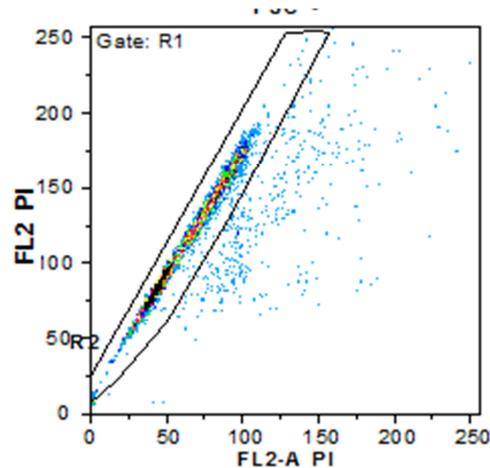


Abbildung 5.5 Polygon zum Ausschluss der Zelldubletten am Beispiel der A2780CisR Zellen.

Bei der Auftragung der Intensität im FL2-Kanal gegen die Fläche im FL2-Kanal, können Dubletten ausgeschlossen werden, da diese sich nicht im linearen Bereich befinden, sondern eine höhere Fläche aufweisen.

Zur Analyse wurden nur die Zellen verwendet, die weder den Zelltrümmern, noch den Zelldubletten zuzuordnen waren. Auch bei der Analyse des Zellzyklus wurden jeweils mindestens 11.000 Signale innerhalb der beiden definierten Polygone vermessen. Die anhand der Kontrolle und der Paclitaxel-Probe gelegten Regionen wurden für die weiteren vermessenen Proben verwendet. Zur Analyse der Proben wurden die apoptotischen Zellen vom Anteil der restlichen Zellen abgezogen, so dass die Zellen in der G₁-, S- und G₂/M-Phase zusammenaddiert 100% ergeben.

5.8.14 Bestimmung der Membranintegrität

Manche Substanzen können die Zellmembran schädigen und beeinflussen somit die Zellintegrität. Um dies zu untersuchen, wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt. Da Propidiumiodid nicht in der Lage ist, die Zellmembran zu passieren, kann es nur durch geschädigte Zellmembranen in die Zellen gelangen. Das Propidiumiodid wurde in diesem Fall in *sheath fluid* gelöst und enthielt keine zusätzlichen Tenside, die die Zellmembran für

das Propidiumiodid durchgängig machten. Zellen, dessen DNA in diesem Assay durch Propidiumiodid angefärbt wurde, weisen also keine intakte Zellmembran auf.

Nach 24 Stunden des Anwachsens der Zellen in einer 6-Well Platte wurden die Zellen mit den entsprechenden Substanzen behandelt. Als Positivkontrolle wurde 0,2% Triton X-100 für 20 Minuten verwendet. Das Tensid schädigt in der Zeit die Zellmembran so massiv, dass das PI die DNA im Zellkern anfärben kann. Nach dem Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und der Überstand gesammelt. Nach dem Zentrifugieren für 4 Minuten bei 4°C und 1137 rpm wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und in 500 µl *sheath fluid* mit 20 µg/ml PI resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend für 15 Minuten bei 37°C inkubiert, auf Eis gelagert und am Durchflusszytometer vermessen.

Bei der Analyse wurden ebenfalls die Zelltrümmer im Dotplot FSC gegen SSC ausgeschlossen (siehe Abbildung 5.2) und mindestens 11.000 Signale pro Probe vermessen. Nach dem Vermessen der unbehandelten Kontrolle und der Kontrolle mit Triton X-100 wurde eine Fluoreszenzintensität definiert, bei der eine Schädigung der Zellmembran definitiv vorliegt und die Zellen mit Propidiumiodid angefärbt sind. Zur Analyse wurde der Anteil der Zellen, die bei der Positivkontrolle gefärbt sind, als 100 % gesetzt und die restlichen Proben auf diesen Anteil bezogen.

5.8.15 Bestimmung des Mitochondrienpotentials

Apoptose kann durch unterschiedliche Mechanismen ausgelöst werden, unter anderem durch eine Schädigung der Zellmembran der Mitochondrien und folgend durch eine Verminderung des mitochondrialen Potentials. Mitochondrien sind von einer äußeren und inneren Membran umgeben, wobei die innere Membran durch starke Faltung der Membranen die Cristae bildet. Die Atmungskette und die ATP-Synthese sind an der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert. Durch einen Protonen- und Spannungsgradienten, der zwischen der Matrix und dem Intermembranraum besteht, wird die ATP-Bildung angetrieben. Dies führt zu einer negativen Ladung der inneren Membran. Bereits 1988 beschrieben Ehrenberg et al. die Verwendung von kationischen Farbstoffen zur Bestimmung des mitochondrialen Potentials [Ehrenberg et al., 1988]. Zur Anwendung kam der rot-fluoreszierende kationische Farbstoff Tetramethylrhodaminethylester (TMRE). TMRE ist zelldurchgängig und akkumuliert auf Grund der negativen Ladung in den aktiven Mitochondrien. Beschädigte oder depolarisierte Mitochondrien weisen ein verringertes Membranpotential auf und sind nicht mehr in der Lage, TMRE zu

akkumulieren. Um dies zu überprüfen wurde in diesem Assay Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP), ein Entkoppler, eingesetzt. Bei CCCP handelt es sich um eine lipophile schwache Säure, die die Mitochondrienmembran im geladenen und neutralen Zustand passieren kann. Dies führt zu einem Protonentransport über die innere Mitochondrienmembran und damit zur Aufhebung des Protonengradienten.

Zur Untersuchung des mitochondrialen Potentials wurden die Zellen in 24-Well Platten anwachsen gelassen. Nach 24 Stunden wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und das Medium durch FKS-freies Medium ausgetauscht, da eine Esterspaltung des Farbstoffes vermieden werden sollte. Die Substanzen wurden in dieser Arbeit für 6 Stunden inkubiert. 50 Minuten vor Ablauf der Zeit wurde in die Positivkontrolle 10 μM CCCP gegeben. 20 Minuten vor Ablauf der Inkubationszeit wurde der Farbstoff TMRE in einer Konzentration von 200 nM zu den Zellen gegeben. Nur die ungefärbte Kontrolle zur Bestimmung der zellulären Eigenfluoreszenz, enthielt kein TMRE. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und die Zellsuspension in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Nach einer Zentrifugation bei 4°C und 8000 rpm für 4 Minuten, wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet bis zum Vermessen auf Eis und im Dunkeln gelagert. Vor dem Vermessen wurden die Zellen entsprechend in *sheath fluid* verdünnt und am Durchflusszytometer vermessen.

Die Auswertung erfolgte zunächst wie bei den anderen Assays am Durchflusszytometer mit der Markierung der Zellpopulation im Dotplot SSC gegen FSC (siehe Abbildung 5.2). Die mit TMRE angefärbten Zellen ohne weitere Behandlungen legten in dem Versuch das Maximum des Messfensters fest (siehe Abbildung 5.6B), wohingegen die nicht gefärbten Zellen das Minimum festlegten (siehe Abbildung 5.6A). Durch den Einsatz des Entkopplers CCCP kam es zur deutlichen Veränderung der Fluoreszenzintensität in den geringeren Bereich (siehe Abbildung 5.6C). Dies zeigt, dass das Membranpotential nicht aufrechterhalten werden konnte und somit das TMRE nicht in den Zellen verbleiben konnte. Für die Auswertung wurde die mittlere Fluoreszenzintensität aller Zellen der Zellpopulation verwendet. Die nur mit TMRE behandelten Proben wurden als 100%-Wert definiert, auf den die Proben bezogen wurden.

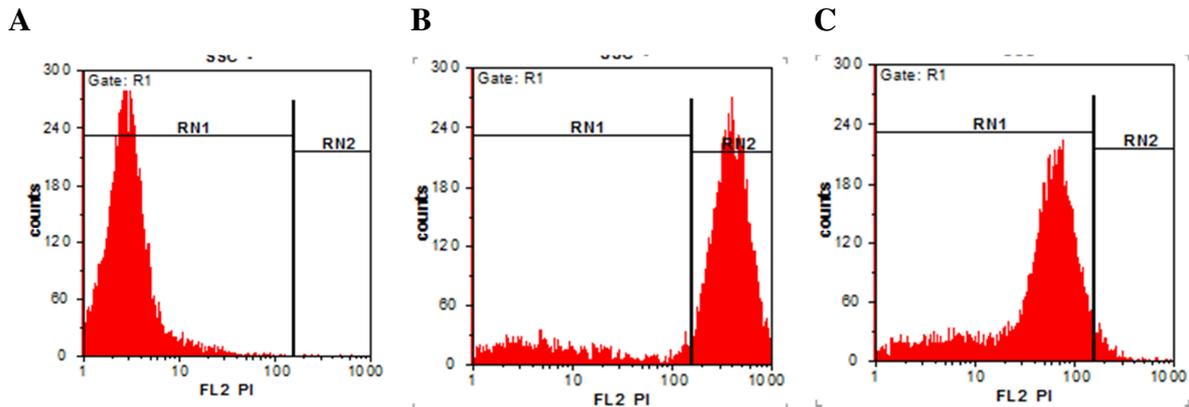


Abbildung 5.6 Auswertung des Mitochondrienassays am Beispiel der A2780 Zellen.

A Ungefärbte Zellen zeigen kaum eine Fluoreszenzintensität und befinden sich im unteren Skalabereich. **B** Mit TMRE angefärbte Zellen weisen eine hohe Fluoreszenzintensität auf und befinden sich am oberen Ende der Skala. Diese beiden Proben legen das Messfenster fest. **C** Mit 10 μM CCCP behandelte Zellen zeigen eine deutliche Verschiebung des Signals in den niedrigen Messbereich. Dies zeigt, dass das Mitochondrienpotential nicht mehr aufrechterhalten werden kann. Anhand von Probe B und Probe C wird der Bereich definiert, der Zellen mit intaktem Mitochondrienpotential enthält (RN2) und Zellen, in denen das Mitochondrienpotential zusammengebrochen ist (RN1).

5.8.16 Statistik

Für die Auswertung der MTT-Assays wurden die auf den Mittelwert der Kontrolle prozentualisierten Absorptionswerte der einzelnen Experimente zur Mittelung gepoolt und daraus eine nicht-lineare Regression mit Hilfe der 4-Parameter-Hill-Gleichung mit variabler Steigung erstellt. Für die statistische Auswertung wurden die als normalverteilt geltenden pIC_{50} -Werte und deren Standardfehler herangezogen. Dabei kennzeichnet * einen Signifikanzwert kleiner 0,05, ** kleiner 0,01 und *** kleiner 0,001. Diese Kennzeichnung, gerechnet mit den pIC_{50} -Werten, wurde auch bei den gezeigten Balkendiagrammen, die die IC_{50} -Werte \pm SEM abbilden verwendet.

Falls nicht anders angegeben, sind die Ergebnisse in Form von Mittelwerten und Standardfehlern von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Die statistische Signifikanz wurde mittels des *two-tailed student's t-test* mittels Graph Pad Prism berechnet. Die Kennzeichnung der Signifikanzwerte entspricht der obigen Beschreibung.

Um eine Aussage über die Bedeutung der gefundenen signifikanten Unterschiede treffen zu können wurden die Effektstärken d nach Cohen (siehe Formel 5) berechnet [Cohen, 1988].

Formel 5

$$d = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2 + s_2^2}{2}}}$$

Anhand der Effektstärke kann unterschieden werden, ob es sich bei den gesehenen signifikanten Unterschieden um einen kleinen Effekt ($d = 0,2, - 0,5$), einen mittleren Effekt ($d = 0,5 - 0,8$) oder um einen starken Effekt handelt ($d > 0,8$).

6 Ergebnisse

6.1 Cisplatin sensitivität von Ovarialkarzinomen

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Ovarialkarzinomzelllinien mit Cisplatin-resistentem Subklon verwendet. Tabelle 6.1 fasst die ermittelten IC₅₀-Werte gegenüber Cisplatin an diesen Zelllinien zusammen.

Tabelle 6.1 Zytotoxizität von Cisplatin. Die IC₅₀-Werte sowie pIC₅₀ ± SEM wurden mittels MTT-Assay nach 72-stündiger Cisplatin-Inkubation bestimmt. Der Resistenzfaktor wurde als Quotient aus dem IC₅₀-Wert der Cisplatin-resistenten Zelllinien und der sensitiven Zelllinie berechnet.

Dargestellt sind der Mittelwert und pIC₅₀ ± SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten vermessen in Triplikaten.

Zelllinie	IC ₅₀ -Wert [µM]	pIC ₅₀ ± SEM	Resistenzfaktor
A2780	1,88	5,73 ± 0,02	7,7
A2780CisR	14,5	4,84 ± 0,02	
CaOV3	1,83	5,86 ± 0,02	3,4
CaOV3CisR	6,31	5,20 ± 0,03	
OVCAR3	4,54	5,34 ± 0,01	5,3
OVCAR3CisR	24,0	4,62 ± 0,07	

Das Testsystem der A2780 und A2780CisR Zellen wurde als valides und repräsentatives Testsystem für die Ovarialkarzinome gewählt. Es ergab sich ein stabiler und klinisch relevanter Resistenzfaktor gegenüber Cisplatin von 7,7 zwischen dem sensitiven und resistenten Subklon. Bei CaOV3 Zellen ergab sich ein Resistenzfaktor von 3,4. Der Cisplatin-resistente Subklon zeigte eine weniger ausgeprägte Resistenz im Vergleich zu den A2780CisR Zellen. OVCAR3 Zellen wiesen bereits eine leichte intrinsische Resistenz gegenüber Cisplatin auf, die bei den Cisplatin-resistenten OVCAR3CisR noch gesteigert wurde. Die Zytotoxizität von Substanzen und Beeinflussung der Cisplatin sensitivität wurde an den drei genannten Zelllinien untersucht, während weiterführende Experimente im Hinblick auf die Zellproliferation, Apoptose oder Untersuchungen des Proteinstatus nur an A2780 und deren Cisplatin-resistentem Subklon A2780CisR durchgeführt wurden. Dies lag zum einen am stabilen und validen System der Cisplatinresistenz. Zum anderen zeigten sowohl HDACi als auch HSP90i an den A2780 und A2780CisR Zellen eine Beeinflussung der Cisplatin sensitivität, die repräsentativ an diesem Testsystem genauer untersucht wurde.

6.2 HDAC Inhibitoren

Der Einsatz von HDACi in der Therapie des Ovarialkarzinoms führt zur Hemmung der Zellproliferation, beeinflusst den Zellzyklus und steigert die Apoptoseinduktion [Khabele et al., 2007]. In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass durch den Einsatz von HDACi bei Kopf-Hals-Tumoren, Brust- und Ovarialkarzinomen die Sensitivität gegenüber Cisplatin signifikant erhöht werden kann [Marek et al., 2013]. HDACi lassen sich strukturell in 7 Klassen unterteilen: Hydroxamsäurederivate, zyklische Peptide, kurzkettige Fettsäuren, Benzamide, Ketone, Thiole und von Naturstoffen abgeleitete Verbindungen [Heinke and Sippl, 2010]. Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten HDACi Panobinostat, Vorinostat und LMK235 gehören alle der Gruppe der Hydroxamsäurederivate an. Bei LMK235 handelt es sich um einen präferentiellen Inhibitor der HDAC 4 und 5 [Marek et al., 2013], während die anderen beiden HDACi als pan-Inhibitoren alle Isoformen hemmen [Khan et al., 2008]. Zunächst wurden die Effekte der HDACi auf die Zellviabilität an Ovarialkarzinomzelllinien untersucht. Panobinostat wies die höchste Potenz auf und wurde zusammen mit dem HDAC 4 und 5 präferentiellen Inhibitor LMK235 für weiterführende Untersuchungen zur Beeinflussung der Cisplatinsensitivität sowie zum Einfluss auf die Ausbildung von einer Cisplatinresistenz verwendet.

6.2.1 Zytotoxische Effekte der HDACi

Die HDACi wurden an A2780, CaOV3 und OVCAR3 und ihren resistenten Subklonen sowie an HEK293 Zellen als Nicht-Karzinomzellen auf ihre Zytotoxizität mittels MTT Assay untersucht. Tabelle 6.2 zeigt die IC_{50} -Werte nach 72-stündiger Inkubation.

Tabelle 6.2 Zytotoxizität der HDACi Vorinostat, Panobinostat und LMK235. Die IC₅₀-Werte (pIC₅₀ ± SEM) wurden mittels MTT-Assay nach 72-stündiger HDACi-Inkubation bestimmt.

Dargestellt sind der Mittelwert und pIC₅₀ ± SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten vermessen in Triplikaten. – bedeutet nicht bestimmt an dieser Zelllinie.

Zelllinie	Vorinostat [nM]	Panobinostat [nM]	LMK235 [nM]
A2780	1156 (5,94 ± 0,03)	28,0 (7,55 ± 0,02)	847,4 (6,07 ± 0,03)
A2780CisR	1767 (5,75 ± 0,04)	28,2 (7,55 ± 0,03)	643,5 (6,19 ± 0,02)
CaOV3	1002 (6,00 ± 0,02)	15,9 (7,80 ± 0,02)	-
CaOV3CisR	1258 (5,90 ± 0,02)	16,9 (7,77 ± 0,02)	-
OVCAR3	1075 (5,97 ± 0,01)	41,3 (7,38 ± 0,02)	-
OVCAR3CisR	1277 (5,89 ± 0,03)	30,5 (7,52 ± 0,01)	-
HEK293	1335 (5,87 ± 0,06)	32,9 (7,48 ± 0,06)	855,8 (6,07 ± 0,05)

Wie in Tabelle 6.2 zu sehen, ergaben sich an den jeweiligen sensitiven und resistenten Zellpaaren vergleichbare IC₅₀-Werte. Panobinostat wies generell die höchste Zytotoxizität auf und Vorinostat die geringste. Die getesteten HDACi zeigten gegenüber den HEK293 Zellen ähnliche Zytotoxizitäten wie gegenüber den Tumorzelllinien auf. Eine selektive Toxizität gegen Karzinomzelllinien konnte nicht festgestellt werden.

Für die Testung der HDACi auf die Beeinflussung der Cisplatinsensitivität mittels MTT-Assay wurden die Zellen zunächst 48 Stunden mit dem HDACi präinkubiert, gefolgt von einer 72-stündigen Inkubation zusammen mit Cisplatin. Daher wurde die Zytotoxizität der HDACi über die insgesamt 120 Stunden an A2780 und A2780CisR Zellen bestimmt.

Tabelle 6.3 Zytotoxizität der HDACi Panobinostat und LMK235. Die IC₅₀-Werte (pIC₅₀ ± SEM) wurden mittels MTT-Assay nach 120-stündiger HDACi-Inkubation bestimmt.

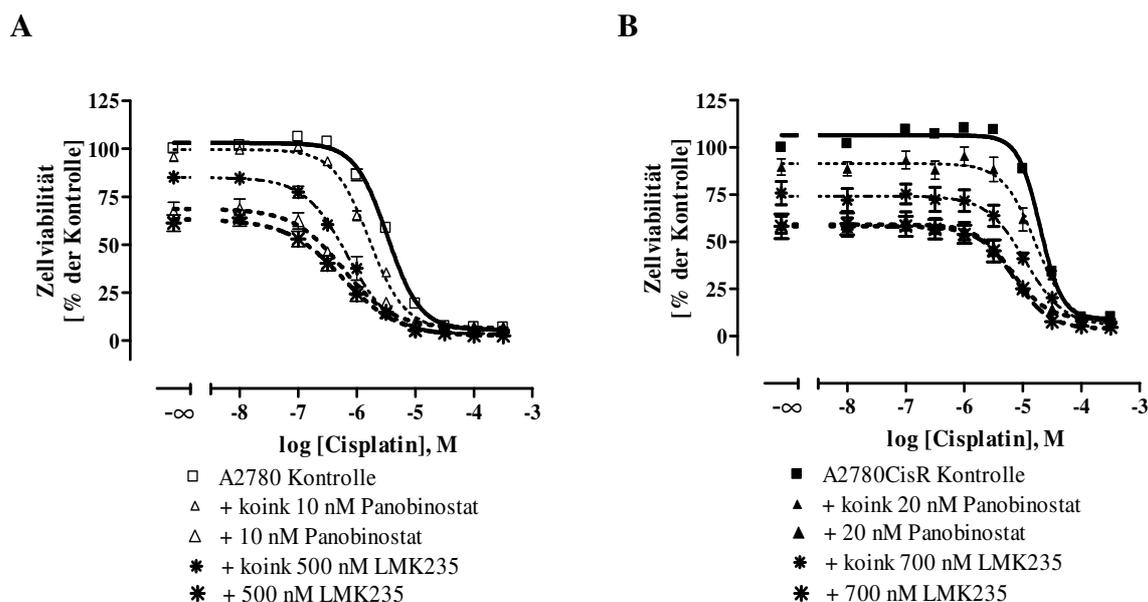
Dargestellt sind der Mittelwert und pIC₅₀ ± SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten vermessen in Triplikaten.

Zelllinie	Panobinostat [nM]	LMK235 [nM]
A2780	23,7 (7,63 ± 0,08)	650,2 (6,19 ± 0,03)
A2780CisR	22,4 (7,65 ± 0,02)	624,8 (6,20 ± 0,05)
HEK293	8,65 (8,06 ± 0,03)	379,9 (6,42 ± 0,04)

Wie in Tabelle 6.3 zu sehen, ergab sich durch die Verlängerung der Inkubationszeit an den A2780 und A2780CisR Zellen keine signifikante Steigerung der Zytotoxizität. Bei den HEK293 war eine signifikant stärkere Toxizität im Vergleich zu der kürzeren Inkubationszeit zu sehen.

6.2.2 Beeinflussung der Cisplatinsensitivität durch HDACi

Panobinostat und LMK235 wurden in Kombination mit Cisplatin eingesetzt, um deren Einfluss auf die Cisplatinsensitivität zu analysieren. Dafür wurden beide HDACi an A2780 und A2780CisR entweder zeitgleich mit Cisplatin oder 48 Stunden vor der 72-stündigen Cisplatininkubation präinkubiert (siehe Abbildung 6.1).



C

Bedingung	A2780				A2780CisR			
	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig
Kontrolle	3,34	5,48 ± 0,02	-	-	19,7	4,71 ± 0,02	-	-
Koink Pano	1,63	5,79 ± 0,03	2,0	***	16,6	4,78 ± 0,06	1,2	n.s.
Pano	0,57	6,24 ± 0,07	5,9	***	6,53	5,19 ± 0,09	3,0	***
Koink LMK235	0,69	6,16 ± 0,04	4,8	***	11,0	4,96 ± 0,09	1,8	*
LMK235	0,57	6,25 ± 0,08	5,9	***	7,05	5,15 ± 0,09	2,8	***

Abbildung 6.1 Beeinflussung der Cisplatinempfindlichkeit von A2780 und A2780CisR durch HDACi.

Panobinostat oder LMK235 wurden entweder mit Cisplatin für 72h koinkubiert (koink) oder 48h vor der 72-stündigen Cisplatinbehandlung in A2780 (A) oder den A2780CisR (B) präinkubiert. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert ± SEM von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten in Triplikaten dar. C IC₅₀-Werte sowie pIC₅₀ ± SEM von den in A und B gezeigten Kurven. Sf ist der Shiftfaktor berechnet als Quotient aus dem Kontroll-IC₅₀-Wert der unbehandelten Zelllinie und der behandelte Zelllinie, sowie Signifikanzen gekennzeichnet mit * für p<0,05 und *** für p<0,001. Nicht signifikante Unterschiede sind mit n.s. gekennzeichnet.

Da an den A2780 Zellen bei höheren Konzentrationen morphologische Veränderungen mikroskopisch sichtbar wurden, konnten nur an den A2780CisR Zellen höhere Konzentrationen der HDACi eingesetzt werden. Bei den A2780 ergab sich für beide HDACi eine signifikante Verringerung des IC₅₀-Wertes von Cisplatin, was auch schon an anderen Zellen in unserem Arbeitskreis gezeigt werden konnte. Ebenso wurde bereits Vorinostat an den A2780 und A2780CisR auf die Beeinflussung der Cisplatinempfindlichkeit untersucht [Marek et al., 2013]. Den größten Effekt im Hinblick auf die Cisplatinempfindlichkeit ergab eine 48-stündige Präinkubation mit dem HDACi (siehe Abbildung 6.1C). Dies ergab einen Shiftfaktor der Erhöhung der Cisplatinempfindlichkeit von

5,9 an A2780. Bei den A2780CisR Zellen kam es ebenfalls durch die 48-stündige Präinkubation zu einer signifikanten Senkung des IC₅₀-Wertes von Cisplatin. Bei der Koinkubation mit Panobinostat konnte hingegen keine signifikante Veränderung des IC₅₀-Wertes für Cisplatin beobachtet werden. Der beste Effekt wurde mit 48h 20 nM Panobinostat erzielt mit einem Shiftfaktor von 3. Auffällig war, dass LMK235 auch bei einer Koinkubation in beiden Zelllinien in der Lage war, die IC₅₀-Werte signifikant zu senken und im Vergleich zu Panobinostat bei einer Koinkubation auch stärkere Effekte aufwies. Dennoch war keiner der beiden getesteten HDACi unter den hier gewählten Bedingungen in der Lage, die Resistenz der A2780CisR gegenüber Cisplatin vollständig zu revertieren.

Um die heterogene Gruppe der Ovarialkarzinome zu berücksichtigen wurden die HDACi auch an anderen Ovarialkarzinomzellen getestet. Hier wurden sowohl Koinkubationen, als auch 6- oder 48-stündige Präinkubationen getestet. Da der IC₅₀-Wert in allen Zelllinien in derselben Größenordnung lag (vergleiche Tabelle 6.2), wurde überall eine Konzentration von 10 nM Panobinostat oder 1 µM Vorinostat eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.4 aufgeführt.

Tabelle 6.4 Einfluss der HDACi auf die Cisplatinsensitivität von CaOV3, CaOV3CisR, OVCAR3 und OVCAR3CisR Zellen.

Die HDACi wurden 6 oder 48 Stunden präinkubiert oder gleichzeitig (Koink) mit Cisplatin für 72h inkubiert. Die Tabelle zeigt IC₅₀-Werte (pIC₅₀ ± SEM) von mindestens 2 unabhängigen Experimenten in Triplikaten vermessen und den Shiftfaktor (Sf) berechnet als Quotient der unbehandelten Kontrolle und der Probe mit dem HDACi.

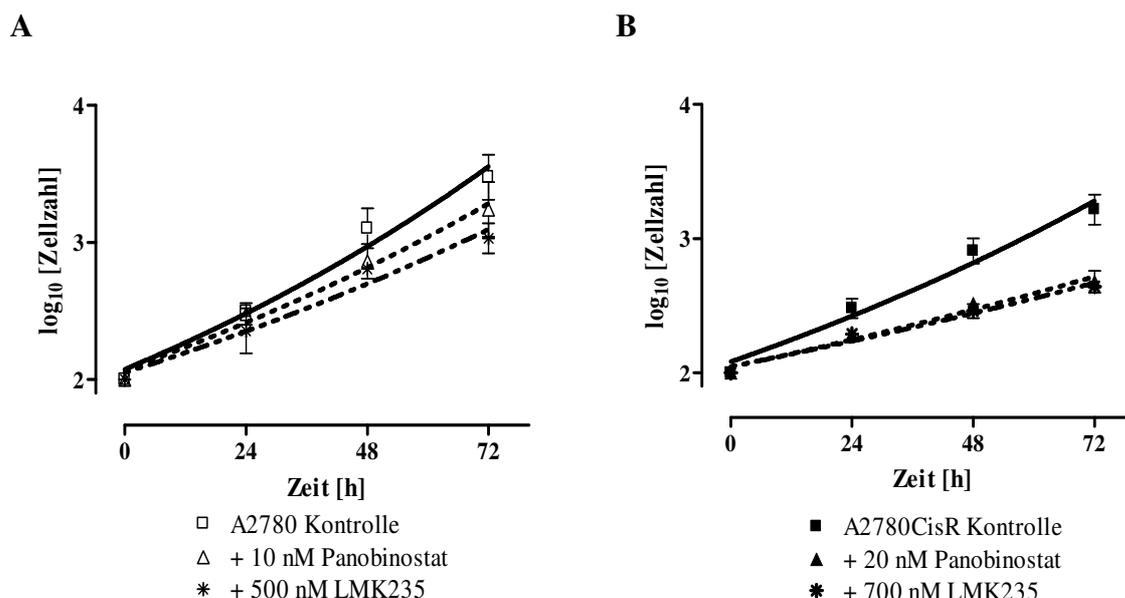
Zelllinie	Inkubationsbedingung	IC ₅₀ Kontrolle [μM]	IC ₅₀ + Inhib [μM]	Sf	Sig
CaOV3	Koink 10 nM Panobinostat	1,92 (5,72 ± 0,01)	1,20 (5,92 ± 0,01)	1,6	***
	48h 10 nM Panobinostat	1,92 (5,72 ± 0,01)	1,04 (5,98 ± 0,05)	1,8	***
	Koink 1 μM Vorinostat	1,92 (5,72 ± 0,01)	1,43 (5,85 ± 0,04)	1,3	***
	48h 1 μM Vorinostat	1,92 (5,72 ± 0,01)	1,18 (5,93 ± 0,06)	1,6	***
CaOV3CisR	Koink 10 nM Panobinostat	4,80 (5,32 ± 0,02)	2,34 (5,63 ± 0,08)	2,1	***
	48h 10 nM Panobinostat	4,80 (5,32 ± 0,02)	1,38 (5,86 ± 0,15)	3,5	***
	Koink 1 μM Vorinostat	4,80 (5,32 ± 0,02)	2,31 (5,64 ± 0,04)	2,1	***
	48h 1 μM Vorinostat	4,80 (5,32 ± 0,02)	1,08 (5,97 ± 0,15)	4,4	***
OVCAR3	6h 10 nM Panobinostat	3,94 (5,40 ± 0,02)	3,83 (5,42 ± 0,04)	1,0	n.s.
	48h 10 nM Panobinostat	3,94 (5,40 ± 0,02)	1,50 (5,82 ± 0,09)	2,6	**
	6h 1 μM Vorinostat	3,94 (5,40 ± 0,02)	4,46 (5,35 ± 0,04)	0,9	n.s.
	48h 1 μM Vorinostat	3,94 (5,40 ± 0,02)	2,42 (5,62 ± 0,06)	1,6	**
OVCAR3CisR	6h 10 nM Panobinostat	37,7 (4,42 ± 0,02)	10,3 (4,99 ± 0,08)	3,7	***
	48h 10 nM Panobinostat	37,7 (4,42 ± 0,02)	8,03 (5,10 ± 0,10)	4,7	***
	6h 1 μM Vorinostat	37,7 (4,42 ± 0,02)	14,3 (4,85 ± 0,08)	2,6	***
	48h 1 μM Vorinostat	37,7 (4,42 ± 0,02)	7,13 (5,15 ± 0,08)	5,3	***

** für p < 0,01; *** für p < 0,001 gegen unbehandelte Kontrolle. Nicht signifikante Unterschiede sind mit n.s. gekennzeichnet.

Wie aus Tabelle 6.4 zu ersehen ist, zeigte sich auch an diesen Zelllinien durch eine 48-stündige Präinkubation eine Steigerung der Cisplatinsensitivität im Vergleich zur Koinkubation. Auffällig war bei diesen Ovarialkarzinomzelllinien, dass der Shiftfaktor bei den resistenten Zellen höher war als bei den sensitiven Subklonen. An den sensitiven Zellen lag der höchste Shiftfaktor bei 2,6, während bei den Cisplatin-resistenten Zellen Shiftfaktoren bis zu 5,2 erzielt wurden. Eine vollständige Revertierung der Resistenz konnte im Gegensatz zu den anderen Zelllinien an CaOV3CisR Zellen durch eine 48-stündige Präinkubation mit den HDACi erreicht werden (siehe Tabelle 6.4). Der Einsatz von 1 μ M Vorinostat führte an CaOV3CisR sogar zu einem signifikant geringeren IC_{50} -Wert im Vergleich zum Kontroll-Wert der CaOV3.

6.2.3 Untersuchungen zum cisplatinsensitivierenden Effekt der HDACi

Für die weiteren Untersuchungen zur Zellproliferation und zur Apoptoseinduktion wurde hauptsächlich das Testsystem der A2780 Zellen verwendet, da diese Zelllinien ein stabiles und valides System der Cisplatinresistenz aufweisen. Zunächst wurde der Einfluss auf die Zellproliferation von Panobinostat und LMK235 untersucht. Von den A2780 Zelllinien wurde die Verdopplungszeit (VZ) bestimmt und über Formel 3 die Geschwindigkeitskonstante berechnet. Das Ergebnis ist in Abbildung 6.2 gezeigt.



C

Bedingung	A2780			A2780CisR		
	VZ [h]	K	Sig	VZ [h]	K	Sig
Kontrolle	14,4	0,048 ± 0,001	-	17,5	0,040 ± 0,001	-
Panobinostat	17,1	0,041 ± 0,002	n.s.	31,0	0,022 ± 0,001	***
LMK235	20,5	0,034 ± 0,001	*	33,0	0,021 ± 0,001	***

Abbildung 6.2 Einfluss der HDACi Panobinostat und LMK235 auf die Zellproliferation von A2780 und A2780CisR.

Die Analyse des HDACi-Einflusses auf die Zellproliferation erfolgte über die Bestimmung der Verdopplungszeit. Nach Vermessen des Zeitpunktes 0h wurden die HDACi zu den A2780 (A) und A2780CisR (B) gegeben und nach einer Inkubationszeit von 24, 48 und 72h die Zellzahl mittels Durchflusszytometer bestimmt. Die dargestellten Daten zeigen den Mittelwert ± SEM von 2 voneinander unabhängigen Experimenten. C Die Verdopplungszeit (VZ) sowie die Geschwindigkeitskonstante K sind in der Tabelle zusammengefasst und Signifikanzen (Sig) entsprechend markiert mit * für $p < 0,05$ und *** für $p < 0,001$. Nicht signifikante Unterschiede sind mit n.s. gekennzeichnet.

Der Vergleich der beiden Subklone zeigte, dass sich die Verdopplungszeit nicht signifikant voneinander unterschied. An den A2780 Zellen kam es durch den HDACi Einsatz zu einer geringen, aber nur durch LMK235 signifikanten Hemmung der Zellproliferation. An den A2780CisR Zellen hingegen wurde ein deutlicher Einfluss beider HDACi mit einer Hemmung der Zellproliferation sichtbar (siehe Abbildung 6.2C).

Aufgrund der Erhöhung der Cisplatinempfindlichkeit nach der 48-stündigen Präinkubation mit HDACi sollte die Fähigkeit zur Apoptoseinduktion analysiert werden. Dafür wurden die Zellen analog zum Vorgehen beim MTT-Assay für 48 Stunden mit dem HDACi präinkubiert. Es folgte eine 6-stündige Inkubation mit Cisplatin in einer dem IC_{50} -Wert entsprechenden Konzentration mit anschließender 24-stündiger Erholungsphase in

Anwesenheit des entsprechenden HDACi. Zur Kontrolle der alleinigen Beeinflussung der Apoptoseinduktion durch HDACi wurden diese für 78 Stunden mit den Zellen inkubiert. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 6.3 dargestellt.

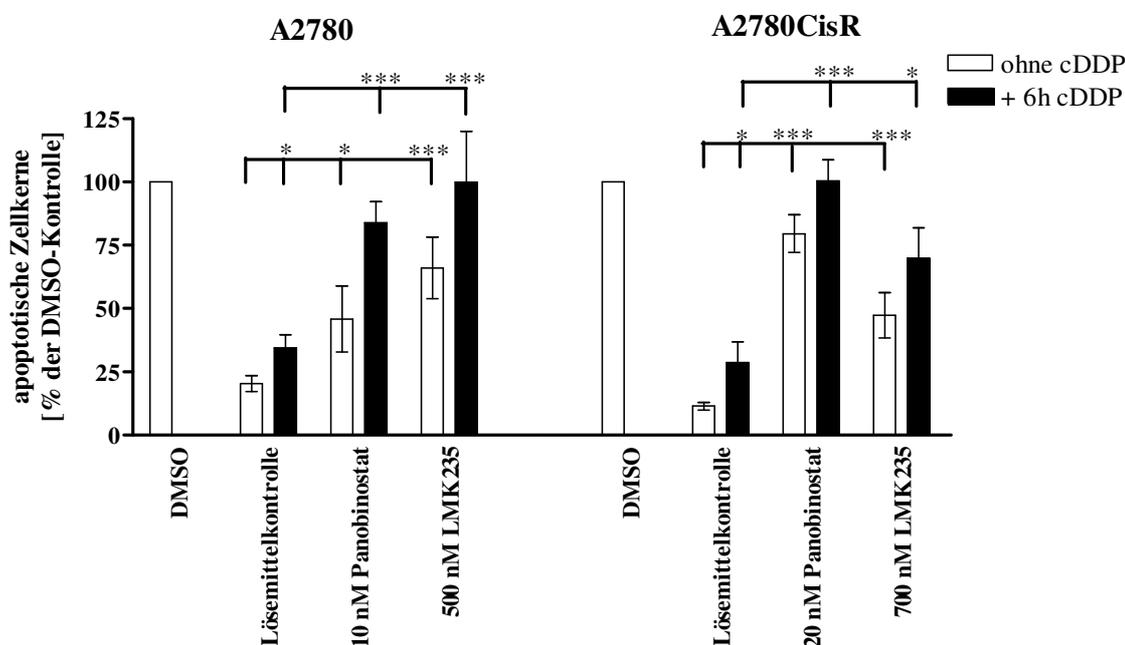


Abbildung 6.3 Apoptoseinduktion durch die HDACi an den A2780 und A2780CisR.

Die Zellen wurden entweder für insgesamt 78h mit dem HDACi inkubiert (ohne cDDP) oder 48h mit den HDACi präinkubiert, für 6h mit Cisplatin in einer dem IC₅₀-Wert entsprechenden Konzentration inkubiert und anschließend für 24h in Anwesenheit der HDACi weiterkultiviert (+6h cDDP). 10% DMSO für 24 Stunden wurde zum Auslösen von Apoptose verwendet und auf diese Apoptoseinduktion die restlichen Werte bezogen. Daten entsprechen dem Mittelwert ± SEM von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede sind mit * für p<0,05 und *** für p<0,001 gekennzeichnet.

Beide HDACi waren in der Lage, in beiden Zelllinien deutlich mehr Apoptose als die unbehandelte Kontrolle (Lösemittelkontrolle ohne cDDP) auszulösen. Bei der Kombination mit Cisplatin wurde ebenfalls eine signifikante Erhöhung der apoptotischen Zellkerne im Vergleich zur Inkubation mit Cisplatin alleine festgestellt (A2780 + 6h Cisplatin 34,6 ± 5,1% vs. A2780 + 48h 10 nM Panobinostat + 6h Cisplatin 83,9 ± 8,3%). Es wurde ein additiver, teilweise synergistischer Effekt sichtbar.

Im nächsten Schritt wurde die Interaktion der HDACi mit Cisplatin untersucht. Durch Synergismusstudien nach der Chou-Talalay-Methode wurde analysiert, ob es sich um einen synergistischen, additiven oder antagonistischen Effekt handelt [Chou, 2010]. Tabelle 6.5 fasst die Ergebnisse der Kombination von LMK235 und Cisplatin zusammen.

Tabelle 6.5 Synergismusstudien an A2780 und A2780CisR mit LMK235 und Cisplatin.

Die A2780 und A2780CisR Zellen wurden mit den entsprechenden Konzentrationen an LMK235 und Cisplatin behandelt. Die gezeigten Kombinationsindices (CI) wurden mit Hilfe des Programms CalcuSyn 2.1 nach der Chou-Talalay Methode berechnet. $CI > 1$ bedeutet Antagonismus, $CI = 1$ zeigt einen additiven Effekt und $CI < 0,9$ zeigt eine synergistische Wirkung beider Substanzen (in der Tabelle **fett** markiert). ° kennzeichnet ein Einfluss von weniger als 20% auf die Zellproliferation durch den Einsatz der Substanzen. Daten zeigen den Mittelwert eines repräsentativen Experiment von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten in Triplikaten vermessen.

A2780	LMK235 [nM]				A2780CisR	LMK235 [nM]				
Cisplatin [µM]	200	350	500	700	Cisplatin [µM]	350	500	700	1000	
0.5	11	8,6	2,1	1,9	5	°	°	1,21	0,46	
1	°	4,9	1,4	0,65	10	1,41	0,94	0,80	0,37	
2	°	2,4	0,8	0,43	15	0,56	0,40	0,41	0,32	
3	35	1,2	0,28	0,29	20	0,19	0,18	0,23	0,24	
5	10	0,21	0,16	0,18	25	0,11	0,11	0,15	0,34	

Bei höheren Konzentrationen konnten in beiden Zelllinien Kombinationsindices kleiner als 0,9 und damit synergistische Effekte festgestellt werden. Die synergistischen Effekte waren an den A2780CisR ausgeprägter als an den A2780 Zellen. Dies zeigt, dass selbst bei einer Cisplatinkonzentration unterhalb des IC_{50} -Wertes von A2780CisR der synergistische Effekt mit LMK235 auftritt. Diese Daten sind in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten, dass LMK235 und auch Vorinostat an den A2780CisR Zellen eine synergistische Wirkung aufzeigen [Marek et al., 2013].

Zur weiteren Charakterisierung der HDACi-induzierten Effekte wurde untersucht, ob der Einsatz der HDACi in A2780 und A2780CisR zu einer Änderung in der Zellzyklusverteilung führt. Dafür wurden die Zellen für 48 Stunden mit 20 nM Panobinostat oder 500 nM LMK235 inkubiert, bevor die Zellzyklusverteilung gemessen wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.4 dargestellt.

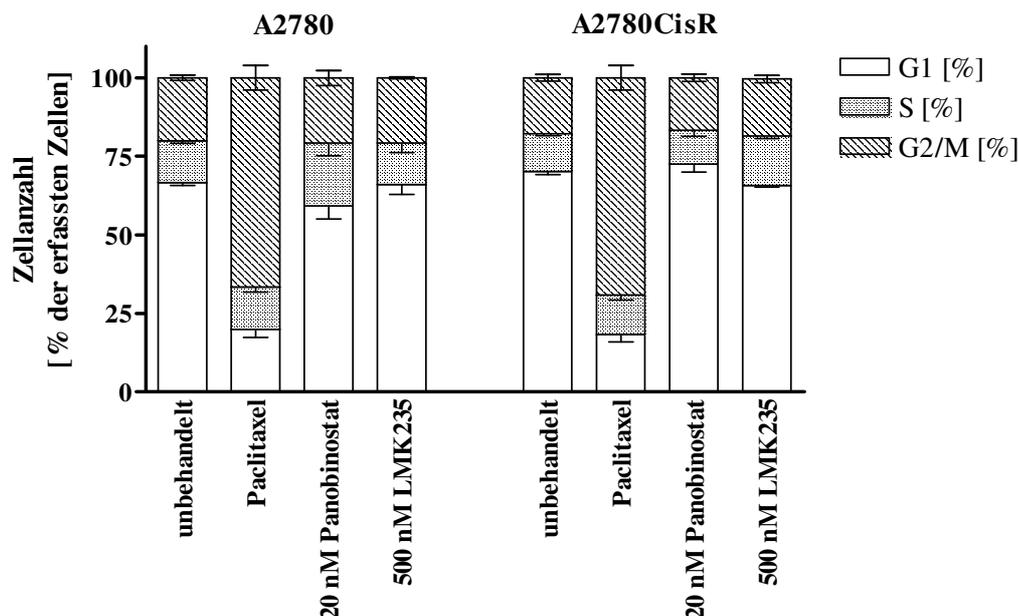


Abbildung 6.4 Einfluss der HDACi Panobinostat und LMK235 auf den Zellzyklus von A2780 und A2780CisR.

A2780 und A2780CisR wurden für 48h mit Panobinostat oder LMK235 inkubiert. Paclitaxel wurde als G₂/M-Kontrolle für 24h in einer Konzentration von 50 nM eingesetzt. Die dargestellten Daten zeigen den Mittelwert ± SEM von 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

Paclitaxel führte in der eingesetzten Konzentration wie erwartet zu einem G₂/M-Zyklusarrest. Es konnte keine signifikante Veränderung des Zellzyklus durch eine 48-stündige Inkubation mit Panobinostat oder LMK235 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden. Daher konnte die Arretierung in einer Zellzyklusphase nicht für die erhöhte Cisplatinempfindlichkeit an den A2780 und den A2780CisR Zellen verantwortlich sein.

HDACi können zu Veränderungen der Genexpression führen und den Acetylierungsstatus von Nicht-Histonproteinen verändern. Um den Effekt von Panobinostat und LMK235 auf die Acetylierung nachzuweisen, wurden A2780 und A2780CisR für 24 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen beider HDACi inkubiert und die Acetylierung von α -Tubulin untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 6.5 gezeigt.

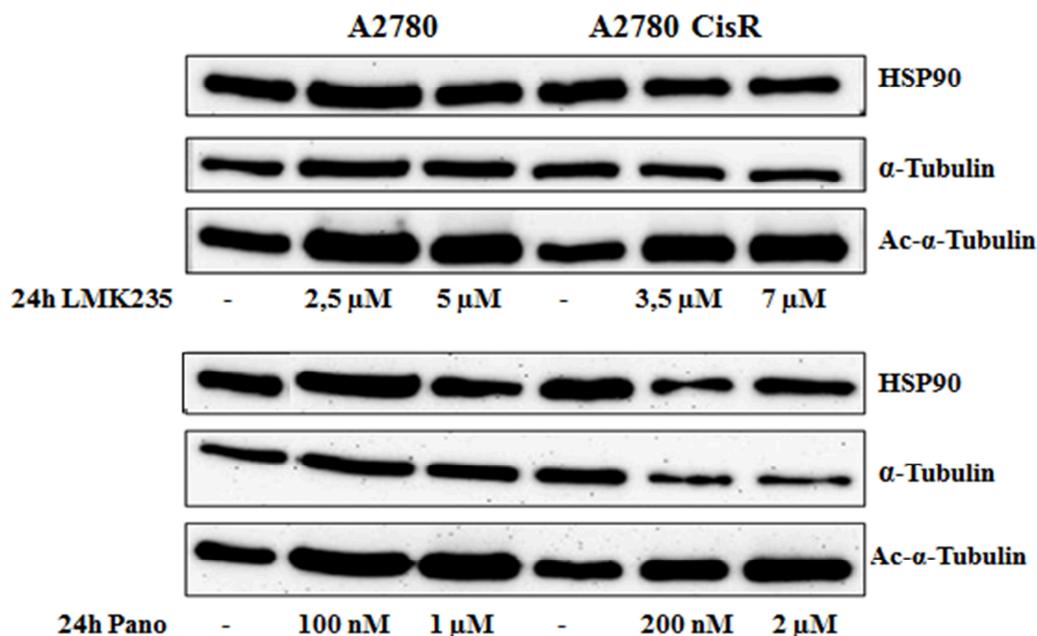


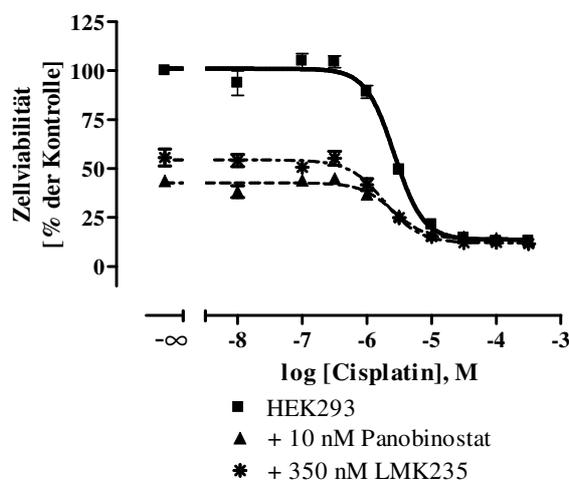
Abbildung 6.5 Beeinflussung der Acetylierung von α -Tubulin durch HDACi.

Die A2780 und A2780CisR Zellen wurden für 24h mit unterschiedlichen Konzentrationen LMK235 und Panobinostat inkubiert. – kennzeichnet die Kontrolle ohne HDACi-Zusatz. Detektiert wurden α -Tubulin und das acetylierte α -Tubulin (Ac- α -Tubulin). HSP90 wurde als Ladekontrolle verwendet. Es wurden 25 μ g Protein pro Bande eingesetzt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

Wie in Abbildung 6.5 gezeigt, kam es durch den Einsatz der beiden HDACi zur stärkeren Acetylierung von α -Tubulin. Sowohl der pan-Inhibitor Panobinostat als auch der HDAC 4 und 5 präferentielle Inhibitor LMK235 zeigten ein gleich hohes Maß an Hyperacetylierung des α -Tubulin. Somit zeigten beide Inhibitoren an beiden Zelllinien eine Inhibition der HDAC.

Um die Selektivität des cisplatin sensitivierenden Effekts von HDACi für Tumorzellen zu untersuchen, wurde der Einfluss auf die Cisplatin sensitivität an Nicht-Tumor Zellen, den humanen embryonalen Nierenzellen HEK293, getestet. Es wurden dieselben Konzentrationen der HDACi wie für die A2780 Zellen eingesetzt und für 48 Stunden vor der Cisplatingabe präinkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.6 dargestellt.

A



B

Bedingung	HEK293		
	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf
Kontrolle	3,17	5,50 ± 0,02	-
Panobinostat	2,54	5,60 ± 0,07	1,2
LMK235	1,85	5,73 ± 0,07	1,7

Abbildung 6.6 Einfluss der HDACi auf die Cisplatinsensitivität von HEK293.

A Die HDACi wurden 48h vor einer 72-stündigen Cisplatinbehandlung zu HEK293 gegeben. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert ± SEM von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten in Triplikaten vermessen dar. B IC₅₀-Werte sowie pIC₅₀ ± SEM der gezeigten Kurve. Sf ist der Shiftfaktor berechnet als Quotient aus dem Kontroll-IC₅₀-Wert der unbehandelten Zelllinie und der behandelten Zelllinie.

Es kam zu keiner signifikanten Verringerung der IC₅₀-Werte. Allerdings wurde die Zellproliferation im Vergleich zu A2780 stärker inhibiert. Dies war am verringerten TOP-Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve zu erkennen. Die HDACi konnten aber an den HEK293 im Gegensatz zu den Karzinomzellen keine Erhöhung der Cisplatinsensitivität induzieren.

6.2.4 Beeinflussung der Resistenzentwicklung

6.2.4.1 Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin

Ein Problem bei der Therapie von Ovarialkarzinomen mit Cisplatin stellt die Resistenzentwicklung dar. Sowohl durch Marek et al. als auch im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine Präinkubation mit HDACi zu einer Erhöhung der Cisplatinsensitivität in den resistenten Zelllinien führte und die Ursprungszelllinie gegenüber Cisplatin hypersensitiviert wurde. Dies führte dazu, dass die

Resistenzentwicklung in permanenter Anwesenheit eines HDACi analysiert werden sollte. Dafür wurden A2780 dauerhaft mit 5 nM Panobinostat (graue Linie in Abbildung 6.7) oder 200 nM LMK235 (blaue Linie in Abbildung 6.7) kultiviert. Die Zellen wurden einmal wöchentlich mit 3,5 μM Cisplatin für 6 Stunden inkubiert. A2780 ohne den Zusatz von HDACi wurden zeitgleich derselben Behandlung unterzogen, um einen direkten Vergleich der Resistenzentwicklung zu haben (in Abbildung 6.7 als A2780CisR_{neu} gekennzeichnet). Parallel dazu wurden von den unbehandelten A2780 alle 2 Wochen der IC₅₀-Wert bestimmt, um stets den aktuellen Wert der Ursprungszelllinie zur Verfügung zu haben (gekennzeichnet als A2780 in Abbildung 6.7). Der Mittelwert dieser Werte wurde als Kontrollwert für die unbehandelte Zelllinie verwendet, um den Resistenzfaktor zu berechnen. Dieser ist in Abbildung 6.7 gegen die Zeit aufgetragen. Da sich durch den Einsatz von LMK235 eine Sensitivierung gegenüber Cisplatin ausbildete, musste die Cisplatinkonzentration anfänglich verringert werden. So erfolgte zunächst eine wöchentliche Inkubation mit 1 μM Cisplatin über 6 Stunden. Die Cisplatinkonzentration wurde entsprechend dem gemessenen IC₅₀-Wert schrittweise erhöht und lag ab der 20. Woche bei 3,5 μM . Nach 32 Wochen wurde die Behandlung mit Cisplatin beendet und der IC₅₀-Wert ohne weitere Cisplatinbehandlung vermessen. Die Resistenzentwicklung für beide HDACi ist in Abbildung 6.7 dargestellt.

A

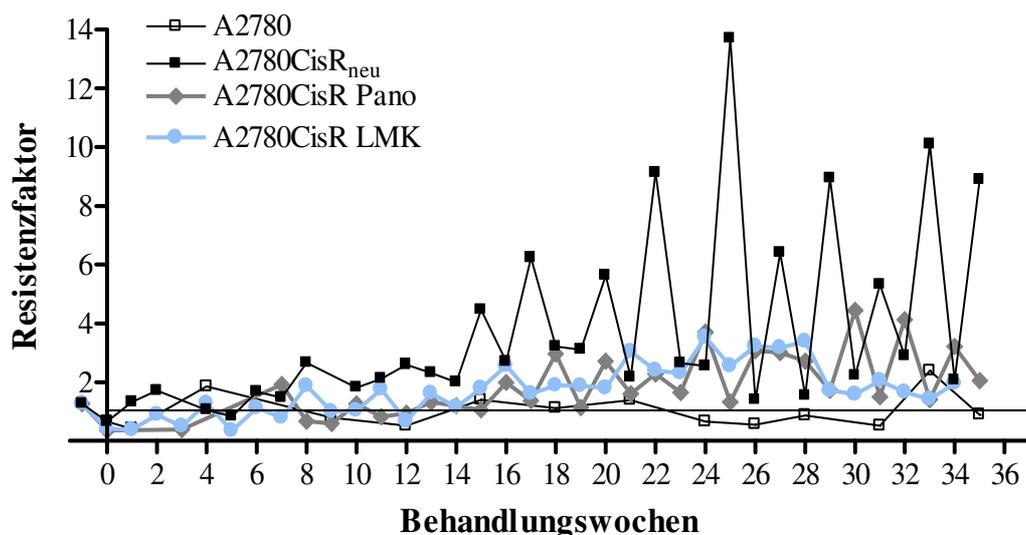


Abbildung 6.7 Resistenzentwicklung von A2780 Zellen unter dem Einfluss von Panobinostat oder LMK235.

Legende s. S. 83

B

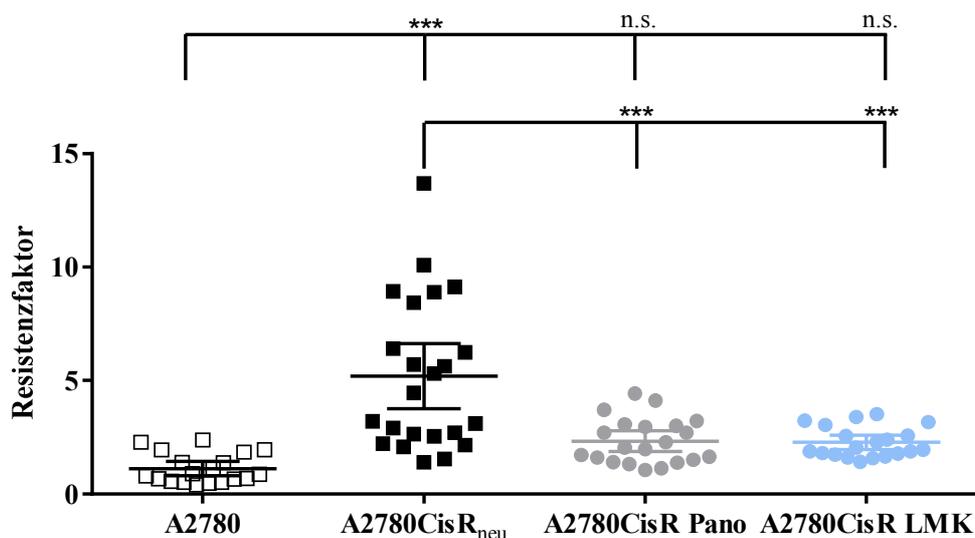


Abbildung 6.7 Resistenzentwicklung von A2780 Zellen unter dem Einfluss von Panobinostat oder LMK235.

A A2780 Zellen wurden einmal wöchentlich mit Cisplatin in einer IC_{50} -Konzentration behandelt, entweder ohne weiteren Zusatz (A2780CisR_{neu}) oder unter permanenter Anwesenheit von 5 nM Panobinostat (A2780CisR Pano) oder 200 nM LMK235 (A2780CisR LMK). Nach 32 Wochen wurde die wöchentliche Behandlung mit Cisplatin beendet. Parallel wurden IC_{50} -Werte der unbehandelten A2780 Zellen zur Verlaufskontrolle bestimmt (A2780). Der Mittelwert der Verlaufskontrolle wurde verwendet, um den Resistenzfaktor als Quotient der IC_{50} -Werte aus behandelter Zelllinie und un behandelter Kontrolle zu berechnen. Dieser ist im Graphen gegen die Zeit aufgetragen. Die Gerade kennzeichnet einen Resistenzfaktor von 1, d.h. keine Änderung im IC_{50} -Wert. **B** Gruppierung der Resistenzfaktoren ab der 22. Behandlungswoche der unterschiedlich behandelten Kinetiken. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM der Resistenzfaktoren. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit *** für $p < 0,001$, nicht signifikante Unterschiede mit n.s.. Alle Datensätze sind normalverteilt (D'Agostino & Pearson normality test, Graph Pad Prism).

Die Resistenzentwicklung unter wöchentlicher Cisplatinbehandlung ohne einen weiteren Zusatz erfolgte langsam. Erst ab der 12. Woche war ein Resistenzfaktor konstant über 2 zu beobachten. Es wurde deutlich, dass der Resistenzfaktor nicht konstant hoch war, sondern zwischen 2-13 schwankte. Diese Schwankungen konnte im Laufe der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Der finale IC_{50} -Wert wurde als Mittelwert ab der 14. Behandlungswoche berechnet und lag bei A2780CisR_{neu} bei 11,4 μ M ($pIC_{50} = 4,94 \pm 0,09$). Es ergab sich ein Resistenzfaktor von 5,2. Die berechnete Effektstärke nach Cohen [Cohen, 1988] im Vergleich zu den A2780 betrug 1,7 und kennzeichnet somit einen starken Effekt. Durch den Einsatz von Panobinostat wurde in den ersten 4 Wochen eine Hypersensitivierung gegenüber Cisplatin detektiert. Dies wurde an einem Resistenzfaktor kleiner 1 deutlich. Es kam in den folgenden Wochen zu einem leichten Anstieg des Resistenzfaktors. Am Ende der Resistenzentwicklung unter permanenter Anwesenheit von 3 nM Panobinostat ergab sich ein IC_{50} -Wert von 5,05 μ M ($pIC_{50} = 5,30 \pm 0,04$), berechnet über die letzten 22 Wochen. Dadurch ergab sich ein finaler Resistenzfaktor für A2780CisR Pano von 2,3, der signifikant niedriger war als der Resistenzfaktor von A2780CisR_{neu}. Die berechnete Effektstärke nach Cohen im Vergleich zur A2780CisR_{neu}

betrug 1,17 und lässt daher auch auf einen starken Effekt schließen. Durch den Einsatz von LMK235 ergab sich anfänglich ebenfalls eine Hypersensitivierung gegenüber Cisplatin, die bis zu 7 Wochen anhielt. Ein deutlich und anhaltend erhöhter Resistenzfaktor war erst ab der 16. Woche sichtbar. Der finale IC_{50} -Wert unter permanenter Anwesenheit von 200 nM LMK235 wurde über die letzten 22 Wochen berechnet und betrug 4,92 μ M ($pIC_{50} = 5,31 \pm 0,03$). Damit lag der Resistenzfaktor für A2780CisR LMK bei 2,3, der ebenfalls signifikant niedriger war als der Resistenzfaktor von A2780CisR_{neu}. Die Effektstärke nach Cohen im Vergleich zur A2780CisR_{neu} lag bei 1,22 und ließ ebenfalls auf einen starken Effekt schließen. Beide eingesetzten HDACi waren in der Lage das Ausmaß der Resistenzentwicklung zu verringern. Es kam zwar zum leichten Anstieg des IC_{50} -Wertes durch die Cisplatinbehandlung, jedoch wurde der ohne HDACi-Zusatz erhaltene Resistenzfaktor von 5,3 nicht erreicht. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Resistenzfaktoren der unbehandelten A2780 und den A2780CisR Pano und A2780CisR LMK feststellen. Abbildung 6.7B zeigt, dass die Resistenzfaktoren über die letzten 22 Wochen einen deutlichen Unterschied in der Resistenzentwicklung in Abwesenheit oder Anwesenheit eines HDACi aufwiesen.

6.2.4.2 Resistenzentwicklung gegenüber HDACi

Bei der Analyse der Resistenzentwicklung in Anwesenheit eines HDACi wurde zunächst versucht, mit einer HDACi-Konzentration anzufangen, bei der eine Erhöhung der Cisplatinsensitivität zu sehen war (siehe Abbildung 6.1). Dies hätte 10 nM Panobinostat und 350 nM LMK235 entsprochen. Jedoch wurde die Zellproliferation durch die Langzeitinkubation mit den HDACi in dieser Konzentration zu stark gehemmt. Daher wurden geringere Konzentrationen von 5 nM Panobinostat und 200 nM LMK235 für die Verhinderung der Resistenzentwicklung verwendet. Im Laufe der Kinetik fiel auf, dass die Zellen, die bereits mit HDACi inkubiert waren, mit einer höheren Konzentration des HDACi ohne starke Hemmung der Zellproliferation inkubiert werden konnten. Da bereits andere Arbeitsgruppen von Resistenzen gegenüber HDACi berichtet haben [Fantin and Richon, 2007, Lee et al., 2012], wurde untersucht, ob dies an den A2780 Zellen ebenfalls der Fall war. Um diesen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber Cisplatin zu untersuchen, wurde parallel zur in Abbildung 6.7 gezeigten Kinetik, eine weitere Kinetik mit steigender Konzentration an Panobinostat bzw. LMK235 gestartet. Abbildung 6.8 zeigt die Resistenzentwicklung bei steigender Konzentration an Panobinostat. Die A2780CisR Pano wurden dafür ab der 21. Woche steigenden Konzentrationen an Panobinostat ausgesetzt. In

Abbildung 6.8 werden die 20. bis 35. Behandlungswoche gezeigt. Die Panobinostat Konzentration konnte bis 20 nM zur permanenten Kultivierung erhöht werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.8 dargestellt.

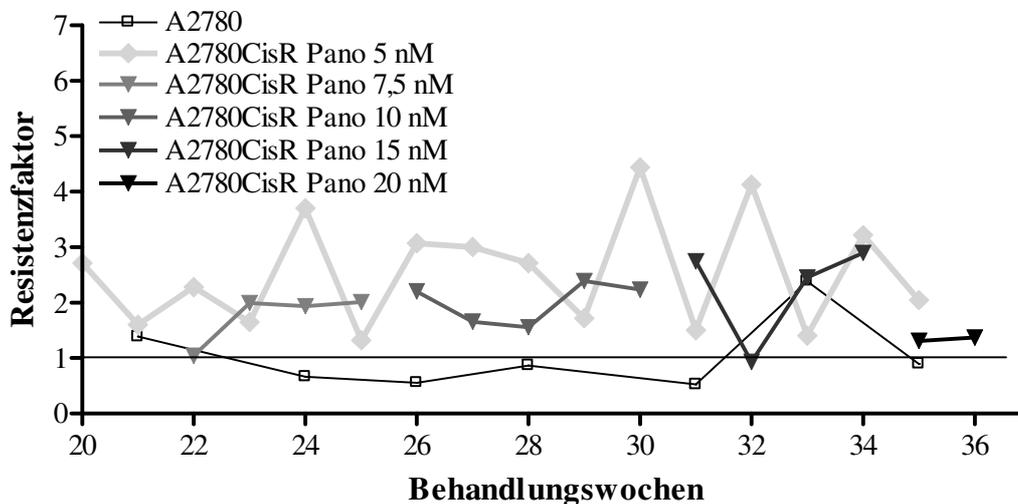
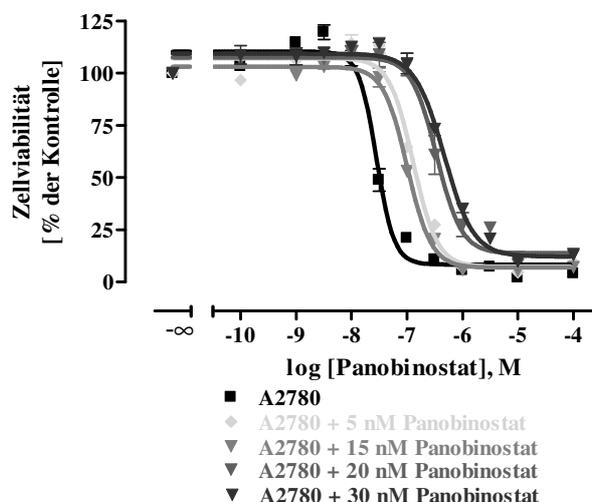


Abbildung 6.8 Resistenzentwicklung der A2780 mit steigender Konzentration an Panobinostat.

A2780CisR Pano wurden 21 Wochen permanent mit 5 nM Panobinostat kultiviert. Anschließend wurden die Zellen steigenden Konzentrationen an Panobinostat ausgesetzt und weiterhin einmal wöchentlich mit Cisplatin in einer IC_{50} -Konzentration behandelt. Die hellgraue Linie zeigt den Verlauf der Resistenzentwicklung in permanenter Anwesenheit von 5 nM Panobinostat (A2780CisR Pano 5 nM). Je dunkler die Linie gefärbt ist, desto höher war die eingesetzte Konzentration an Panobinostat. Die Gerade kennzeichnet einen Resistenzfaktor von 1 bezogen auf die unbehandelten A2780 Zellen (A2780).

Es wurde deutlich, dass durch die Erhöhung der Konzentration an Panobinostat zunächst eine geringe Abnahme des Resistenzfaktors gegenüber Cisplatin erfolgte. Jedoch stieg dieser im Folgenden erneut auf das Niveau der A2780CisR Pano mit 5 nM Panobinostat an. Obwohl bei den unbehandelten A2780 Zellen eine Konzentration von 10 nM Panobinostat für die Dauer von einer Woche zu einem Absterben der Zellen führte, hatten sich die Zellen mit 5 nM Panobinostat im Medium bereits an das Panobinostat gewöhnt und somit konnte die Konzentration gesteigert werden. Diese Beobachtungen legten nahe, dass die Zellen eine gewisse Resistenz gegen Panobinostat ausbildeten. Daher wurde der IC_{50} -Wert von Panobinostat über 72 Stunden an den Zellen mit steigender Konzentration an Panobinostat bestimmt. Die Zellen befanden sich bei der Bestimmung des IC_{50} -wertes mindestens eine Woche mit der gekennzeichneten Konzentration in Kultur. Abbildung 6.9 zeigt die Konzentrations-Effekt-Kurve von Panobinostat und fasst die IC_{50} -Werte zusammen.

A



B

Zellen	IC ₅₀ -Wert [nM]	pIC ₅₀ ± SEM
A2780	28,1	7,55 ± 0,02
A2780 + 5 nM Panobinostat	130	6,89 ± 0,03
A2780 + 15 nM Panobinostat	102	6,99 ± 0,02
A2780 + 20 nM Panobinostat	339	6,47 ± 0,05
A2780 + 30 nM Panobinostat	466	6,33 ± 0,03

Abbildung 6.9 Ausbildung einer Resistenz gegenüber Panobinostat an den A2780 Zellen.

A Zytotoxizität von Panobinostat nach 72-stündiger Inkubation an A2780 Zellen und A2780 Zellen mit steigenden Konzentrationen an Panobinostat kultiviert. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert ± SEM von mindestens 3 voneinander unabhängigen Versuchen in Triplikaten vermessen.

B IC₅₀-Werte sowie pIC₅₀ ± SEM von den in A gezeigten Kurven.

Die dauerhafte Inkubation mit Panobinostat resultierte in einer eindeutigen Steigerung des IC₅₀-Wertes von Panobinostat. Der größte Unterschied durch eine Erhöhung der eingesetzten Panobinostatkonzentration war zwischen den unbehandelten A2780 und den mit 5 nM Panobinostat inkubierten Zellen sichtbar. Dies könnte daran liegen, dass die Zellen hier 22 Wochen mit Panobinostat in Kultur gehalten wurden. Hier erfolgte eine Steigerung des IC₅₀-Wertes um das 4,6-fache. Final ergab sich nach insgesamt 53 Wochen mit permanenter Inkubationen mit steigenden Konzentrationen an Panobinostat ein IC₅₀-Wert von Panobinostat in Höhe von 465,8 nM. Dieser Wert war ungefähr 16-fach erhöht im Vergleich zu den unbehandelten A2780 Zellen. Dieses Ergebnis war im Einklang mit den gezeigten Daten von Dedes et al. beim Einsatz von Vorinostat an den Kolonkarzinomzelllinien HCT116 [Dedes et al., 2009]. Der dauerhafte Einsatz von

Panobinostat an den A2780 Zellen führte zu einer gewissen Resistenz gegenüber dem HDACi. Dennoch konnte die Sensitivität gegenüber Cisplatin mit einer geringen Konzentration an Panobinostat aufrechterhalten werden. Die Resistenz gegenüber dem HDACi korrelierte folglich nicht mit der Cisplatinsensitivität.

Beim Einsatz von LMK235 zur Verhinderung der Resistenzausbildung wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet. Die Zellen, die dauerhaft mit 200 nM LMK235 inkubiert wurden, wurden ab der 26. Woche mit steigenden Konzentrationen an LMK235 in Kultur gehalten. Die Konzentration konnte bis auf 1 μ M LMK235 schrittweise erhöht werden, ohne dass die Zellen starben. Die Zellen wurden analog zur Steigerung der Panobinostatkonzentration (siehe Abbildung 6.8) jeweils wöchentlich für 6 Stunden mit Cisplatin inkubiert und der IC_{50} -Wert von Cisplatin bestimmt. Abbildung 6.10 zeigt die Resistenzkinetik.

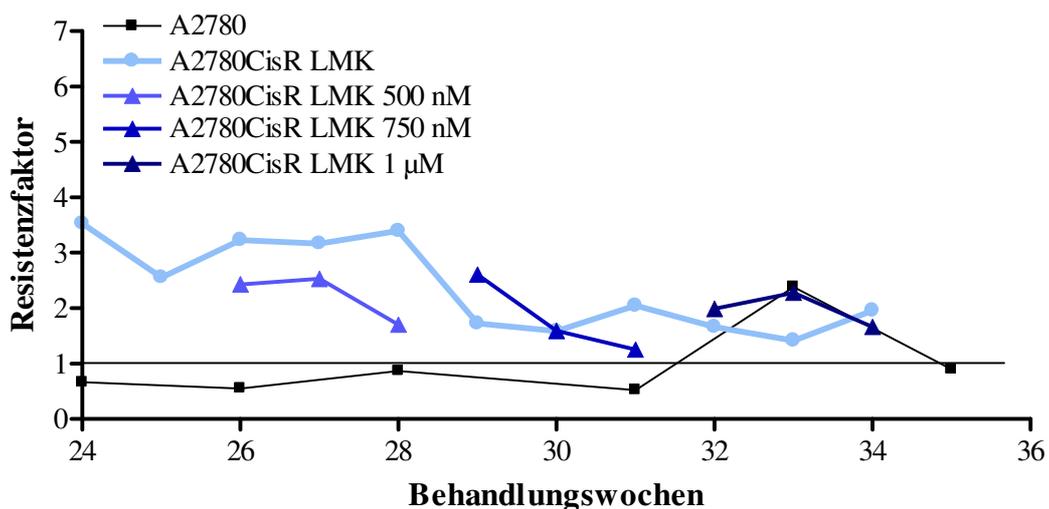


Abbildung 6.10 Resistenzentwicklung der A2780 mit steigenden Konzentrationen an LMK235.

A2780CisR LMK wurden 26 Wochen lang permanent mit 200 nM LMK235 kultiviert. Anschließend wurden diese Zellen steigenden Konzentrationen LMK235 ausgesetzt und weiterhin einmal wöchentlich mit Cisplatin in einer IC_{50} -Konzentration behandelt. Die hellblaue Linie zeigt den Verlauf der A2780CisR LMK Kinetik, die 200 nM LMK235 enthält (A2780CisR LMK). Je dunkler die Linie gefärbt ist, desto höher war die eingesetzte Konzentration an LMK235. Die Gerade kennzeichnet einen Resistenzfaktor von 1 bezogen auf die unbehandelten A2780 Zellen.

Es wurde deutlich, dass die Erhöhung der LMK235 Konzentration, wie auch mit Panobinostat beobachtet, zu einem verringerten Resistenzfaktor gegenüber Cisplatin führte. Anders als beim Einsatz von Panobinostat kam es aber über die Dauer von 3 Wochen nicht zu einem erneuten Anstieg des Resistenzfaktors. Die Erhöhung der LMK235-Konzentration führte zu einer Senkung des Resistenzfaktors gegenüber Cisplatin. Dennoch war der erzielte Effekt mit höheren Konzentrationen an LMK235 nicht viel ausgeprägter als beim Einsatz von 200 nM LMK235.

Durch den Einsatz der HDACi kam es zu einer verzögerten und deutlich verringerten Resistenzausbildung. Es wurde deutlich, dass die Zellen durch den permanenten Einsatz der HDACi eine gewisse Resistenz gegenüber dem HDACi ausbildeten. Daher konnten die Zellen einer höheren Konzentration an HDACi ausgesetzt werden. Trotz der gezeigten Resistenzausbildung gegenüber den HDACi, war eine niedrige Konzentration der HDACi immer noch in der Lage, die Cisplatinempfindlichkeit aufrecht zu erhalten.

6.2.5 Charakterisierung des potentiellen HDACi DDK137

Neben den etablierten HDACi sollte ebenfalls ein neuer HDACi aus dem Arbeitskreis von Prof. Kurz, DDK137, im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert werden. Die Struktur von DDK137 ist in Abbildung 6.11 gezeigt.

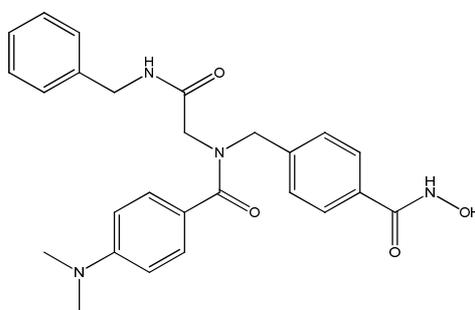
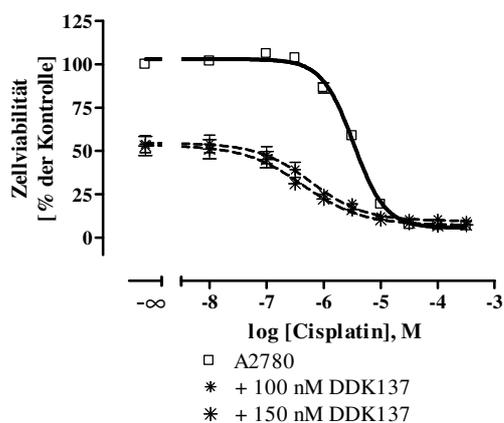


Abbildung 6.11 Strukturformel der getesteten Verbindung DDK137.

Zunächst wurde der IC_{50} -Wert von DDK137 über 120 Stunden an A2780, A2780CisR und HEK293 Zellen bestimmt. Der geringste IC_{50} -Wert wurde an HEK293 Zellen ($IC_{50} = 99$ nM, $pIC_{50} = 7,0 \pm 0,05$), gefolgt vom IC_{50} -Wert an A2780 ($IC_{50} = 175,7$ nM, $pIC_{50} = 6,76 \pm 0,03$) und A2780CisR ($IC_{50} = 514,3$ nM, $pIC_{50} = 6,29 \pm 0,02$) ermittelt. Die Substanz zeigte eine höhere Zytotoxizität am sensitiven Subklon im Vergleich zu den A2780CisR und keine Selektivität für Karzinomzellen.

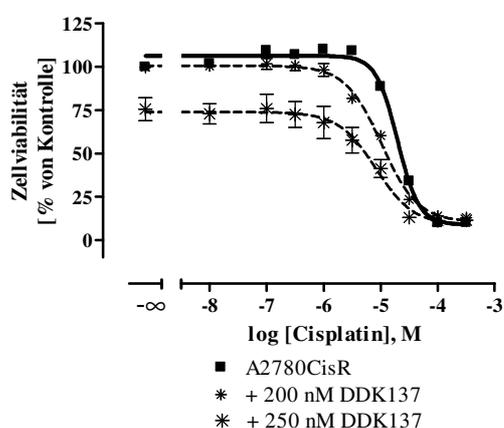
Da Panobinostat und LMK235 zu einer Sensitivierung gegenüber Cisplatin führten, wurde auch DDK137 unter diesem Gesichtspunkt an den A2780 und A2780CisR Zellen getestet. Dafür wurden zunächst unterschiedliche Konzentrationen an DDK137 an den A2780 und A2780CisR Zellen für 48 Stunden präinkubiert und anschließend der IC_{50} -Wert von Cisplatin über 72 Stunden bestimmt. Diese Versuche wurden parallel auch an den HEK293 Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.12 dargestellt.

A



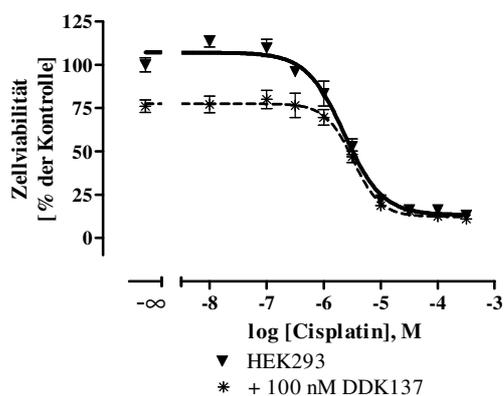
A2780				
Bedingungen	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig
Kontrolle	3,34	5,48 ± 0,02	-	-
100 nM DDK137	0,60	6,22 ± 0,12	5,6	***
150 nM DDK137	0,44	6,36 ± 0,13	7,6	***

B



A2780CisR				
Bedingungen	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig
Kontrolle	19,7	4,71 ± 0,02	-	-
200 nM DDK137	10,3	4,99 ± 0,04	1,9	***
250 nM DDK137	8,20	5,09 ± 0,12	2,4	***

C



HEK293				
Bedingungen	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	
Kontrolle	3,17	5,50 ± 0,02	-	
100 nM DDK137	3,29	5,48 ± 0,06	1,0	

Abbildung 6.12 Erhöhung der Cisplatinempfindlichkeit durch den Einsatz von DDK137.

DDK137 wurde für 48h vor der 72-stündigen Cisplatinbehandlung an A2780 (A), A2780CisR (B) oder HEK293 (C) präinkubiert. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte ± SEM von mindestens 3 unabhängigen Versuchen in Triplikaten dar. Die Tabellen zeigen IC₅₀-Werte sowie pIC₅₀ ± SEM der entsprechenden Kurven. Sf ist der Shiftfaktor berechnet als Quotient aus dem Kontroll-IC₅₀-Wert der unbehandelten Zelllinie und der behandelten Zelllinie, sowie Signifikanzen gekennzeichnet mit *** für p<0,001.

Durch den Einsatz von DDK137 kam es bei beiden Ovarialkarzinomzelllinien zu einer Sensitivierung gegenüber Cisplatin. Bei den A2780CisR Zellen wurde der IC₅₀-Wert mehr als halbiert, dies ergab einen Shiftfaktor von 2,4. Für die Zelllinie A2780 war der Effekt deutlich ausgeprägter. Schon beim Einsatz von 100 nM DDK137 ergab sich ein Shiftfaktor von 6,8, dieser stieg noch auf 9,3 bei einer Erhöhung der Konzentration auf 150 nM DDK137. Bei den A2780 Zellen kam es folglich beim Einsatz von DDK137 zu einer Hypersensitivierung gegenüber Cisplatin, jedoch wurde an A2780CisR Zellen keine vollständige Revertierung der Resistenz erreicht. Im Gegensatz zum Effekt an A2780 oder A2780CisR, kam es bei HEK293 durch den Einsatz von DDK137 zu keiner Veränderung des IC₅₀-Wertes gegenüber Cisplatin (siehe Abbildung 6.12C).

DDK137 zeigte eine Steigerung der Cisplatinempfindlichkeit an A2780 Zellen. Daher wurde untersucht, ob DDK137 in der Lage war, Apoptose auszulösen. Dafür wurde DDK137 zunächst für 48 Stunden präinkubiert und anschließend für 6 Stunden mit dem IC₅₀ von Cisplatin behandelt. Nach einer 24-stündigen Ruhephase in Anwesenheit von DDK137 wurden die apoptotischen Zellen vermessen. Abbildung 6.13 zeigt die Ergebnisse.

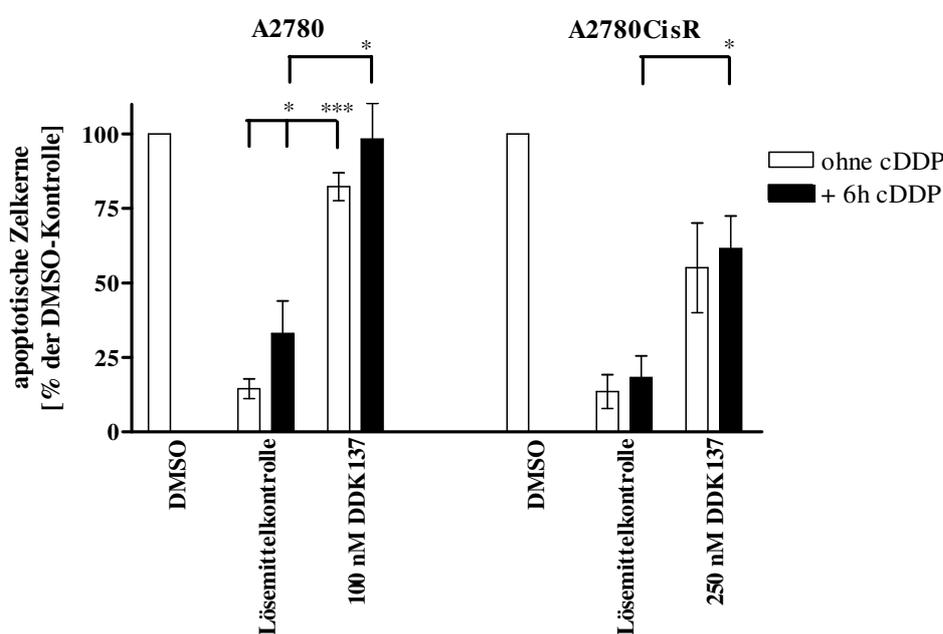


Abbildung 6.13 Apoptoseinduktion durch DDK137 an den A2780 und A2780CisR Zellen.

Die Zellen wurden entweder für insgesamt 78h mit DDK137 inkubiert (ohne cDDP) oder 48h mit DDK137 präinkubiert, für 6h mit Cisplatin in einer dem IC₅₀-Wert entsprechenden Konzentration inkubiert und anschließend für 24h in Anwesenheit von DDK137 weiterkultiviert (+6h cDDP). 10% DMSO für 24 Stunden wurde zum Auslösen von Apoptose verwendet und auf diese Apoptoseinduktion die restlichen Werte bezogen. Daten entsprechen dem Mittelwert ± SEM von mindestens 2 voneinander unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede sind mit * für p<0,05 oder *** für p<0,001 gekennzeichnet.

Es kam durch die Kombination von DDK137 mit Cisplatin in beiden Zelllinien zu keiner signifikanten Steigerung der Apoptose im Vergleich zur Inkubation mit DDK137 alleine (A2780 + 78h 100 nM DDK137 $82,3 \pm 4,7\%$ vs. A2780 + 48h 100 nM DDK137 + 6h cDDP $98,4 \pm 11,9\%$; A2780CisR + 78h 250 nM DDK137 $55,1 \pm 15,0\%$ vs. A2780CisR + 48h 250 nM DDK137 + 6h cDDP $61,6 \pm 10,9$).

Es wurde weiter untersucht, ob die Substanz an den A2780 und A2780CisR Zellen zu einem Zellzyklusarrest führte. Wie Abbildung 6.14 zeigt, kam es im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu keiner signifikanten Änderung in der Zellzyklusverteilung.

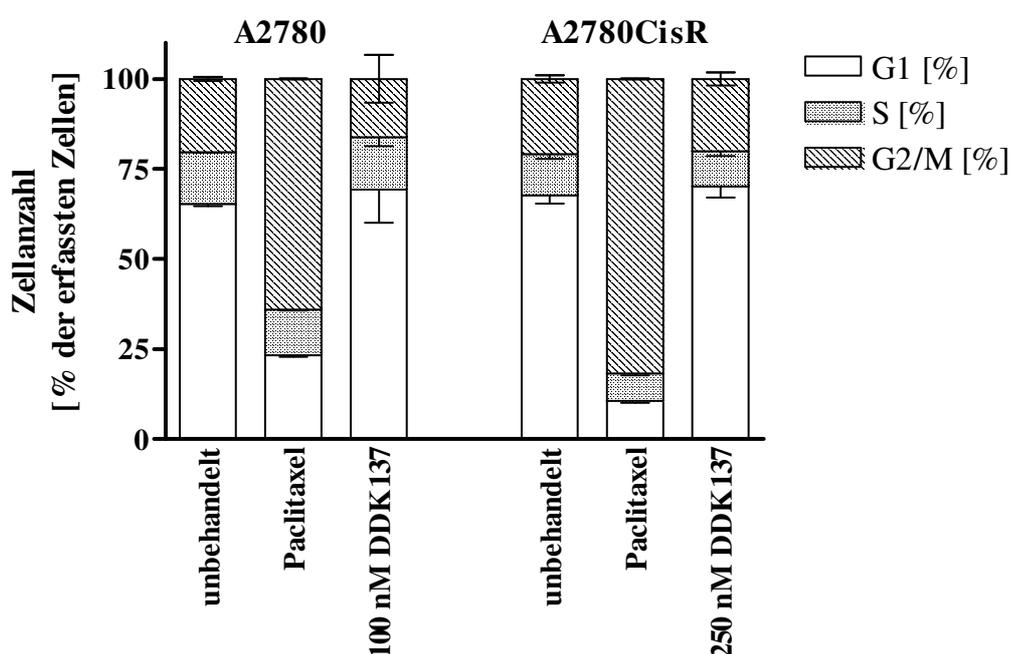


Abbildung 6.14 Einfluss von DDK137 auf den Zellzyklus von A2780 und A2780CisR.

A2780 und A2780CisR wurden für 48h mit DDK137 inkubiert und anschließend über Propidiumiodidfärbung der Zellzyklus bestimmt. Paclitaxel wurde als G₂/M-Kontrolle für 24h in einer Konzentration von 50 nM eingesetzt. Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM von 2 voneinander unabhängigen Versuchen.

DDK137 war im Stande die Sensitivität gegenüber Cisplatin zu erhöhen, dabei kam es jedoch nicht zu einer Revertierung der bereits vorhandenen Cisplatinresistenz. Eine Beeinflussung des Zellzyklus sowie ein Synergismus beim Auslösen von Apoptose konnte aber nicht beobachtet werden. In 6.4.3.4 ist der Effekt der Kombinationen von DDK137 mit HSP90i gezeigt.

6.3 HSP90-Inhibitoren

HSP90i können zu Veränderungen in vielen unterschiedlichen Signaltransduktionswegen führen, da das HSP90-Protein mehr als 280 identifizierte Klientproteine besitzt, die bei einer Inhibition über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut werden [Maloney et al., 2007]. Die überwiegende Anzahl der Klientproteine von HSP90 sind essentielle Proteine des Zellwachstums, Zellüberlebens und von Entwicklungsprozessen. Zusätzlich findet sich in vielen Karzinomzellen eine Überexpression des HSP90-Proteins, das einen gewissen zellprotektiven Effekt aufweist [Richter et al., 2007]. Da das HSP90-Protein in epithelialen Ovarialtumoren als ein vielversprechendes Target identifiziert wurde [Liu et al., 2013], wurden HSP90i zur Auslösung der Apoptose und zur Verbesserung der Cisplatineffektivität eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher die Effekte der N-terminalen HSP90i NVP-AUY922 und NVP-HSP990 auf die Zellproliferation, Cisplatinsensitivität, Zellzyklus sowie Apoptoseinduktion von Ovarialkarzinomzelllinien analysiert werden. Neu entwickelte, im Arbeitskreis von Prof. Kurz synthetisierte potentielle HSP90i wurden unter denselben Aspekten untersucht. Zusätzlich wurde geprüft, ob eine Hemmung des HSP90-Proteins über eine Inhibition der Protein-Protein-Interaktion am C-Terminus erfolgt. Dafür wurde ebenfalls der C-terminale HSP90i Novobiocin eingesetzt. Da die Ösophaguskarzinomzelllinie Kyse510 in vorangegangenen Versuchen eine hohe Expression des HSP90-Proteins auf genetischer sowie auf Proteinebene aufwies, wurde diese Zelllinie für die funktionelle Untersuchung des HSP90-Proteins verwendet.

6.3.1 Zytotoxische Effekte der HSP90i

Zunächst wurde die Zytotoxizität von NVP-AUY922, NVP-HSP990 und Novobiocin an den Ovarialkarzinomzelllinien A2780, CaOV3 und OVCAR3 und an den Kopf-Hals-Karzinomen Cal27 und Kyse510 sowie den Cisplatin-resistenten Sublinien bestimmt. Dazu wurden die HSP90i für 72 Stunden mit den Zelllinien inkubiert und die Zellviabilität mit Hilfe eines MTT-Assays ermittelt. Zusätzlich wurde die HSP90i-Zytotoxizität an der Nicht-Tumor-Zelllinie HEK293 bestimmt. Tabelle 6.6 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 6.6 Zytotoxizität der HSP90i NVP-AUY922, NVP-HSP990 und Novobiocin. Die IC₅₀-Werte (pIC₅₀ ± SEM) wurden mittels MTT-Assay nach 72-stündiger HSP90i-Inkubation bestimmt.

Gezeigte Daten sind der Mittelwert (pIC₅₀ ± SEM) von drei unabhängigen Experimenten vermessen in Triplikaten. – bedeutet nicht bestimmt an dieser Zelllinie. † kennzeichnet eine Hemmung der Zellviabilität größer als 25% bei einer eingesetzten Konzentration von 100 µM.

Zelllinie	NVP-AUY922 [nM]	NVP-HSP990 [nM]	Novobiocin [µM]
A2780	11,2 (7,95 ± 0,06)	20,1 (7,70 ± 0,06)	> 100 (< 4)
A2780CisR	16,4 (7,78 ± 0,04)	29,8 (7,53 ± 0,02)	> 100 †
CaOV3	74,1 (7,13 ± 0,05)	40,9 (7,39 ± 0,03)	-
CaOV3CisR	108,5 (6,96 ± 0,01)	55,6 (7,26 ± 0,02)	-
OVCAR3	33,5 (7,48 ± 0,01)	27,6 (7,56 ± 0,03)	-
OVCAR3CisR	31,1 (7,51 ± 0,02)	25,0 (7,60 ± 0,02)	-
Cal27	17,8 (7,75 ± 0,02)	22,5 (7,65 ± 0,03)	> 100 (< 4)
Cal27CisR	22,2 (7,65 ± 0,10)	33,3 (7,48 ± 0,02)	> 100 (< 4)
Kyse510	35,7 (7,45 ± 0,09)	29,9 (7,52 ± 0,02)	24,6 (4,61 ± 0,04)
HEK293	23,7 (7,63 ± 0,04)	17,0 (7,77 ± 0,02)	> 100 (< 4)

Die N-terminalen Inhibitoren NVP-AUY922 und NVP-HSP990 wiesen in den Zelllinien IC₅₀-Werte im zweistelligen nanomolaren Bereich auf, außer mit NVP-AUY922 bei CaOV3. Beide N-terminale Inhibitoren wiesen fast dieselben IC₅₀-Werte an den sensitiven und resistenten Zelllinien auf. Ähnlich wie bei den HDACi, konnte kein Unterschied in der Zytotoxizität zwischen der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 und den Tumorzelllinien festgestellt werden, so dass keine Tumorselektivität der HSP90i bestand. Der C-terminale Inhibitor Novobiocin zeigte IC₅₀-Werte größer als 100 µM außer bei der Zelllinien Kyse510. Nur an den Kyse510 Zellen konnte ein geringerer IC₅₀-Wert von 24,6 µM ermittelt werden. Novobiocin wurde jedoch nicht an den zwei Ovarialkarzinomzelllinien CaOV3 und OVCAR3 getestet.

Ebenfalls wurden die N-terminalen Inhibitoren für 48 plus 72 Stunden inkubiert und der IC₅₀-Wert bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.7 dargestellt.

Tabelle 6.7 Zytotoxizität der N-terminalen HSP90i NVP-AUY922 und NVP-HSP990 an HEK293 im Vergleich zu A2780 und A2780CisR.

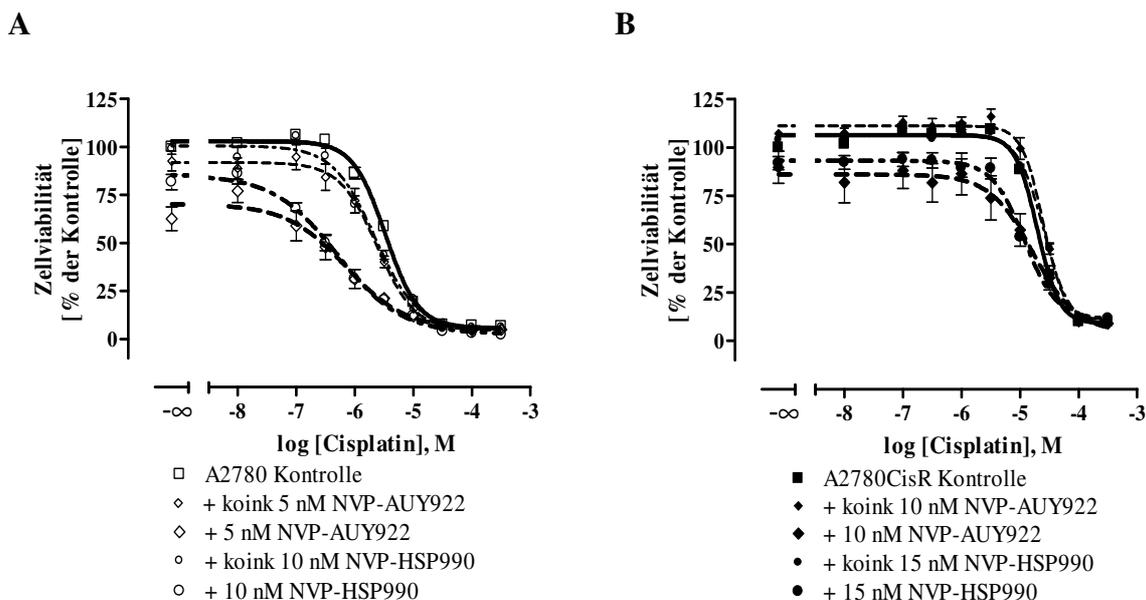
Die IC_{50} -Werte ($pIC_{50} \pm SEM$) wurden mittels MTT-Assay nach 120-stündiger HSP90i-Inkubation in 3 voneinander unabhängigen Experimenten in Triplikaten bestimmt.

Zelllinie	NVP-AUY922 [nM]	NVP-HSP990 [nM]
A2780	11,1 (7,96 \pm 0,03)	20,3 (7,69 \pm 0,03)
A2780CisR	12,3 (7,91 \pm 0,03)	23,4 (7,63 \pm 0,02)
HEK293	3,64 (8,44 \pm 0,02)	8,59 (8,07 \pm 0,04)

Analog zu den HDACi wurde auch bei dem HSP90i nur an den HEK293 Zellen eine deutliche Senkung des IC_{50} -Wertes durch eine Verlängerung der Inkubationszeit sichtbar. An A2780 und A2780CisR blieb der IC_{50} -Wert in derselben Größenordnung wie bei einer 72-stündigen Inkubationszeit.

6.3.2 Beeinflussung der Cisplatin sensitivität durch HSP90i

Die N-terminalen HSP90i wurden eingesetzt, um den Einfluss auf die Cisplatin sensitivität zu analysieren. Dafür wurden die HSP90i zum einen zeitgleich mit Cisplatin auf die A2780 und A2780CisR Zellen gegeben und zum anderen zunächst 48 Stunden präinkubiert und die Zellen anschließend für 72 Stunden mit Cisplatin behandelt. Die mit Hilfe eines MTT-Assays erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 6.15 dargestellt.



C

Bedingung	A2780				A2780CisR			
	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig
Kontrolle	3,34	5,48 ± 0,02	-	-	19,7	4,71 ± 0,02	-	-
Koink AUY922	2,41	5,62 ± 0,06	1,4	*	24,9	4,60 ± 0,03	0,8	*
NVP-AUY922	0,71	6,15 ± 0,13	4,7	***	16,8	4,77 ± 0,17	1,2	n.s.
Koink HSP990	2,22	5,65 ± 0,05	1,5	**	25,7	4,59 ± 0,02	0,8	**
NVP-HSP990	0,50	6,30 ± 0,06	6,7	***	11,8	4,93 ± 0,05	1,7	***

Abbildung 6.15 Beeinflussung der Cisplatinsensitivität von A2780 und A2780CisR durch HSP90i.

NVP-AUY922 oder NVP-HSP990 wurden entweder mit Cisplatin für 72h koinkubiert (koink) oder 48h vor der 72-stündigen Cisplatinbehandlung an A2780 (A) oder A2780CisR (B) präinkubiert. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert ± SEM von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten in Triplikaten dar. C IC₅₀-Werte sowie pIC₅₀ ± SEM von den in A und B gezeigten Kurven. Sf ist der Shiftfaktor berechnet als Quotient aus dem Kontroll-IC₅₀-Wert der unbehandelten Zelllinie und der behandelte Zelllinie, sowie Signifikanzen gekennzeichnet mit * für p<0,05, ** für p<0,01 und *** für p<0,001. Nicht signifikante Unterschiede sind mit n.s. gekennzeichnet.

Bei A2780 kam es zu einer signifikanten Verringerung des IC₅₀-Wertes von Cisplatin durch die HSP90i-Inkubation. Die Präinkubation führte zu einer weitaus stärkeren Beeinflussung der Cisplatinsensitivität als die Koinkubation. Der größte Effekt an den A2780 Zellen wurde mit einer 48-stündigen Präinkubation mit 10 nM NVP-HSP990 erzielt. Dies ergab einen Shiftfaktor von 6,7. Im Vergleich zum Einsatz der HDACi war der Effekt ähnlich. An den resistenten A2780CisR ergab sich maximal ein Shiftfaktor von 1,7 (siehe Abbildung 6.15C). An A2780CisR wurde durch den Einsatz der HDACi eine deutlich höhere Steigerung der Cisplatinsensitivität erzielt.

Die Sensitivierung der Zellen gegenüber Cisplatin durch den Einsatz von HSP90i, der an den A2780 gesehen wurde, sollte auch bei anderen Ovarialkarzinomzelllinien untersucht werden. Da die 48-stündige Präinkubation zu einer stärkeren Erhöhung der Cisplatinsensitivität führte als die Koinkubation mit Cisplatin, wurde nur diese Bedingung an den Ovarialkarzinomzelllinien CaOV3 und CaOV3CisR getestet (siehe Tabelle 6.8).

Tabelle 6.8 Einfluss von NVP-HSP990 auf die Cisplatinsensitivität von CAO3, CAO3CisR, OVCAR3 und OVCAR3CisR Zellen.

NVP-HSP990 wurde 48h vor der 72-stündigen Inkubation mit Cisplatin zu den Zellen gegeben. Die Tabelle zeigt IC₅₀-Werte (pIC₅₀ ± SEM) von insgesamt 3 unabhängigen Experimenten in Triplikaten durchgeführt und den Shiftfaktor (Sf), berechnet als Quotient aus der unbehandelten Kontrolle und der Probe mit dem HSP90i.

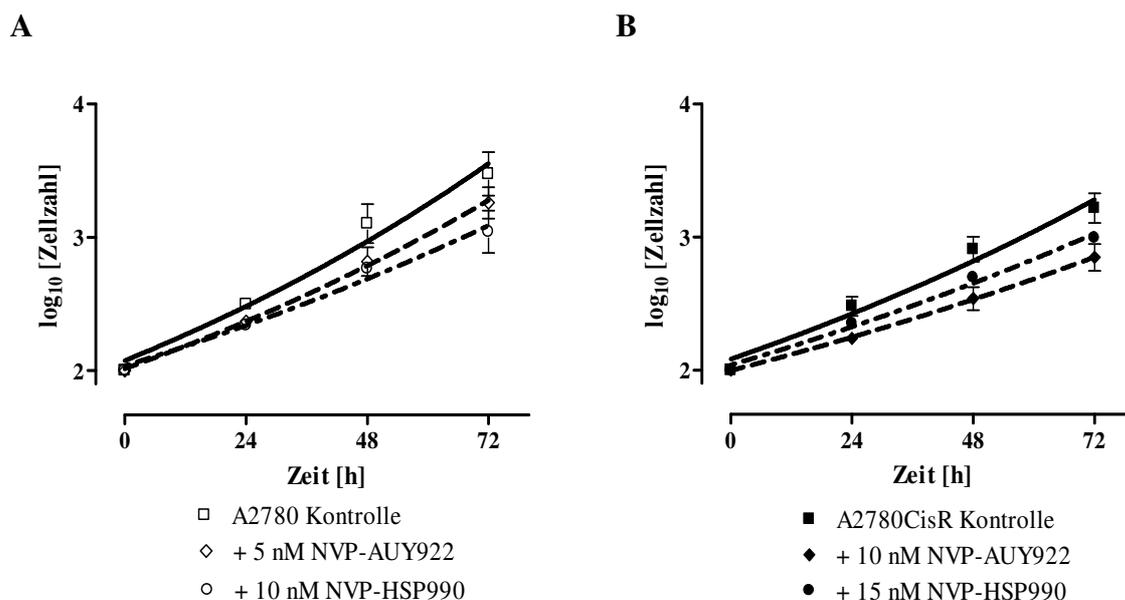
Zelllinie	Konzentration [nM]	IC ₅₀ Kontrolle [µM]	IC ₅₀ mit NVP-HPS990 [µM]	Sf	Sig
CaOV3	10	1,92 (5,72 ± 0,01)	0,79 (6,10 ± 0,02)	2,4	***
CaOV3CisR	10	4,80 (5,32 ± 0,02)	3,20 (5,50 ± 0,03)	1,5	**
OVCAR3	10	3,94 (5,40 ± 0,02)	2,77 (5,56 ± 0,12)	1,4	n.s.
OVCAR3CisR	10	37,7 (4,42 ± 0,02)	12,6 (4,90 ± 0,24)	3,0	*

* = p < 0,05; *** = p < 0,001 gegen unbehandelte Kontrolle. Nicht signifikante Unterschiede sind mit n.s. gekennzeichnet.

Durch den Einsatz von NVP-HSP990 ergab sich auch an diesen Zelllinien eine Erhöhung der Sensitivität gegenüber Cisplatin, diese war jedoch weniger ausgeprägt als an den A2780 Zellen. Der Einsatz von NVP-AUY922 führte zu keinen signifikanten Veränderungen in der Cisplatinsensitivität mit Shiftfaktoren von höchstens 1,3. Diese Ovarialkarzinomzelllinien wurden nicht für weiterführende Analysen verwendet.

6.3.3 Untersuchungen zum cisplatinsensitivierenden Effekt der HSP90i

Der Einfluss der beiden N-terminalen HSP90i auf die Verdopplungszeit wurde an A2780 und A2780CisR Zellen untersucht. Trotz der ähnlichen IC₅₀-Werte der HSP90i im MTT-Assay (siehe Tabelle 6.6) wurden für A2780 und A2780CisR Zellen unterschiedliche Konzentrationen eingesetzt. Es sollten dieselben Konzentrationen verwendet werden wie bei der Untersuchung auf die Cisplatinsensitivität (siehe Abbildung 6.15). Abbildung 6.15 zeigt zusätzlich, dass die Vorinkubation mit HSP90i bei A2780 bereits zu einer stärkeren Verringerung des TOP-Plateaus führte als bei A2780CisR. Abbildung 6.16 zeigt die Ergebnisse zur Untersuchung der Verdopplungszeit.



C

Bedingung	A2780			A2780CisR		
	VZ [h]	K	Sig	VZ [h]	K	Sig
Kontrolle	14,4	0,048 ± 0,001	-	17,5	0,040 ± 0,001	-
NVP-AUY922	16,6	0,042 ± 0,001	n.s.	26,6	0,026 ± 0,001	***
NVP-HSP990	19,7	0,035 ± 0,001	*	21,6	0,032 ± 0,001	*

Abbildung 6.16 Einfluss der HSP90i NVP-AUY922 und NVP-HSP990 auf die Zellproliferation von A2780 und A2780CisR.

Die Analyse des HSP90i-Einflusses auf die Zellproliferation erfolgte über die Bestimmung der Verdopplungszeit. Nach Vermessen des Zeitpunktes 0h wurden die HSP90i zu den A2780 (A) und A2780CisR (B) gegeben und nach einer Inkubationszeit von 24, 48 und 72h die Zellzahl mittels Durchflusszytometer bestimmt. Daten zeigen den Mittelwert ± SEM von 2 voneinander unabhängigen Experimenten. C Die Verdopplungszeit (VZ) sowie die Geschwindigkeitskonstante K sind in der Tabelle zusammengefasst. Signifikanzen sind mit * für $p < 0,05$ und *** für $p < 0,001$ gekennzeichnet. Nicht signifikante Unterschiede sind mit n.s. gekennzeichnet.

NVP-HSP990 führte in beiden Zelllinien zu einer signifikanten Erhöhung der Verdopplungszeit. NVP-AUY922 führte nur an A2780CisR zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation, die im Vergleich zum Einsatz von NVP-HSP990 ausgeprägter war.

Beide HSP90i induzierten durch eine 48-stündige Präinkubation eine Erhöhung der Cisplatinempfindlichkeit in A2780. Die Fähigkeit der HSP90i zur Apoptoseinduktion wurde daher ebenfalls analysiert. Die gewählte Konzentration an HSP90i entsprach der Konzentration, bei der eine Cisplatinempfindlichmachung gesehen wurde. Es sollte analysiert werden, ob bei der 48-stündigen Präinkubation, die bei der Beeinflussung der Cisplatinempfindlichkeit verwendet wird, bereits eine Apoptoseinduktion erfolgte. Zum anderen wurden A2780 und A2780CisR nach der 48-stündigen Präinkubation mit den HSP90i für 6 Stunden mit dem korrespondierenden IC_{50} -Wert von Cisplatin behandelt und nach einer

24-stündigen Ruhephase in Anwesenheit der HSP90i die Apoptoseinduktion vermessen. Dies entspricht einer Inkubationszeit von insgesamt 78 Stunden. Das Ergebnis zeigt Abbildung 6.17.

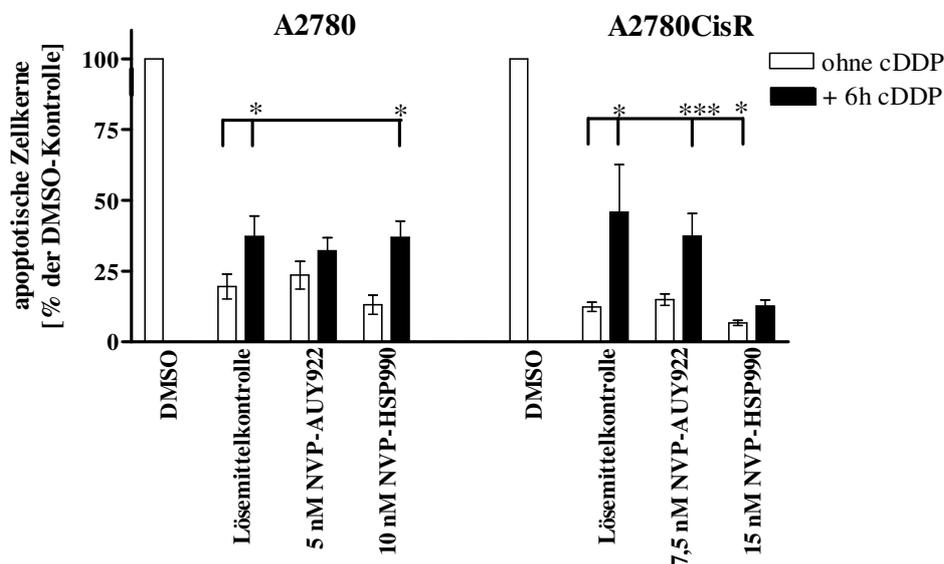


Abbildung 6.17 Apoptoseinduktion durch die HSP90i NVP-AUY922 und NVP-HSP990 in A2780 und A2780CisR.

A2780 und A2780CisR wurden entweder für insgesamt 78h mit den HSP90i inkubiert (ohne cDDP) oder 48h mit den HSP90i präinkubiert, für 6h mit dem IC_{50} -Wert von Cisplatin inkubiert und anschließend für 24h in Anwesenheit der HSP90i weiterkultiviert (+6h cDDP). 10% DMSO für 24 Stunden wurde zum Auslösen von Apoptose verwendet und auf diese Apoptoseinduktion die restlichen Werte bezogen. Daten entsprechen dem Mittelwert \pm SEM von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede sind mit * für $p < 0,05$ und *** für $p < 0,001$ gekennzeichnet.

Die HSP90i NVP-AUY922 und NVP-HSP990 lösten in den gewählten Konzentrationen keine Apoptose aus. Cisplatin induzierte nach einer 6-stündigen Inkubation in einer dem IC_{50} -Wert entsprechenden Konzentration in beiden Zelllinien Apoptose. Durch die zusätzliche Präinkubation mit den HSP90i konnte die Apoptoserate von Cisplatin jedoch nicht verstärkt werden. Eccles et al. berichten von einer Zelllinien-abhängigen Apoptoseinduktion von NVP-AUY922, da in der Brusttumorzelllinie MDA-MB-231 sowie in der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 ebenfalls keine stärkere Apoptoseinduktion gezeigt werden konnte [Eccles et al., 2008].

Als weitere Untersuchung, wurden Synergismusstudien mit den HSP90i und Cisplatin nach der Chou-Talalay-Methode durchgeführt [Chou, 2010]. Die Ergebnisse der Kombination von NVP-AUY922 mit Cisplatin sind in Tabelle 6.9 gezeigt.

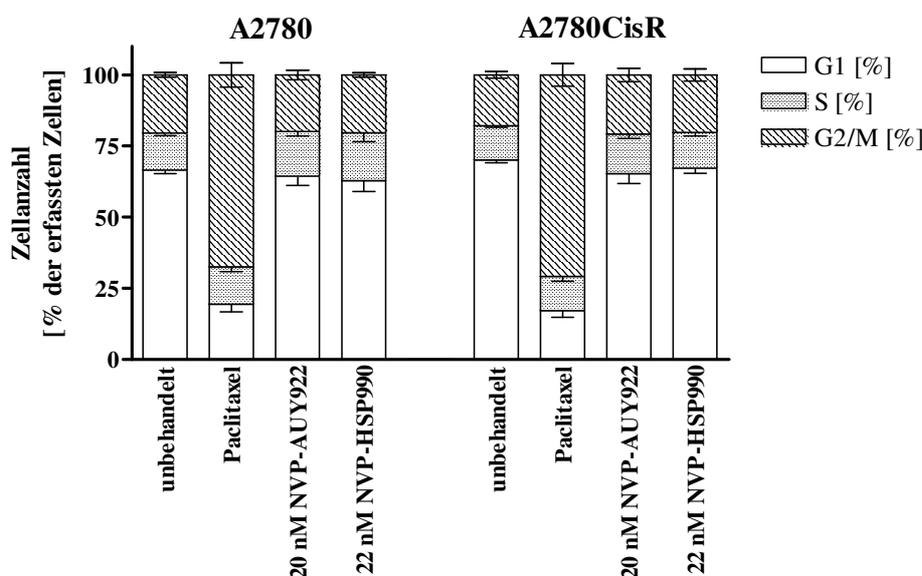
Tabelle 6.9 Synergismusstudien an A2780 und A2780CisR mit NVP-AUY922 und Cisplatin.

A2780 und A2780CisR wurden mit den entsprechenden Konzentrationen an NVP-AUY922 und Cisplatin behandelt. Die gezeigten Kombinationsindices (CI) wurden mit Hilfe des Programms CalcuSyn 2.1 nach der Chou-Talalay Methode berechnet. $CI > 1$ bedeutet Antagonismus, $CI = 1$ zeigt einen additiven Effekt und $CI < 0,9$ zeigt eine synergistische Wirkung beider Substanzen (in der Tabelle **fett** markiert). ° kennzeichnet ein Einfluss von weniger als 20% auf die Zellproliferation durch den Einsatz der Substanzen. Daten zeigen den Mittelwert eines repräsentativen Experiment von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten in Triplikaten vermessen.

A2780 Cisplatin [μ M]	NVP-AUY922 [nM]				A2780CisR Cisplatin [μ M]	NVP-AUY922 [nM]			
	3	5	7.5	10		5	7.5	10	15
0.5	°	°	°	0,50	5	°	°	°	1,79
1	°	°	°	0,20	10	°	°	°	1,41
2	°	°	°	0,35	15	°	°	°	1,24
3	°	°	0,84	0,34	20	2,37	5,13	4,42	1,01
5	°	1,88	1,42	0,39	25	0,82	1,39	1,76	0,93

Wie Tabelle 6.9 zeigt, wurden an den A2780 nur mit der höchsten Konzentration NVP-AUY922 Synergien mit Cisplatin festgestellt. Bei A2780CisR zeigten sich eher antagonistische Wirkungen bei der Kombination von Cisplatin mit NVP-AUY922. Die Daten aus der Bestimmung der Apoptoseinduktion wurden somit bestätigt.

Anschließend erfolgte die Analyse der Beeinflussung des Zellzyklus durch die HSP90i. Dazu wurden die Zellen für 48 Stunden mit den HSP90i inkubiert und nach der PI-Färbung die Zellzyklusphasen bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 6.18 gezeigt.

**Abbildung 6.18 Einfluss der HSP90i NVP-AUY922 und NVP-HSP990 auf den Zellzyklus von A2780 und A2780CisR.**

A2780 und A2780CisR wurden für 48h mit NVP-AUY922 oder NVP-HSP990 inkubiert und anschließend über Propidiumiodidfärbung der Zellzyklus bestimmt. Paclitaxel wurde als G₂/M-Kontrolle für 24h in der Konzentration von 50 nM eingesetzt. Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM von 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

Da sich nach einem 48-stündigen Einsatz in den Konzentrationen, die die Cisplatinempfindlichkeit erhöhen, keine signifikante Apoptoseinduktion detektieren ließ (siehe Abbildung 6.17), wurden die verwendeten Konzentrationen erhöht. Die Zellen wurden daher mit 20 nM NVP-AUY922 und 22 nM NVP-HSP990 inkubiert. Durch den Einsatz der HSP90i kam es in beiden Zelllinien zu keiner Änderung der Zellzyklusverteilung.

Das HSP90-Protein hat mehr als 280 Klientproteine. Unter [Picard, 2016] ist eine aktuelle Liste der betreffenden Proteine zu finden, die stetig ansteigt. Der Effekt der bekannten HSP90i sollte auf prominente Klientproteine in den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Zelllinien analysiert werden. Zur Charakterisierung der Zelllinien A2780, A2780CisR und Kyse510 wurde die Expression der Klientproteine EGFR, ErbB2 sowie die Phosphorylierung der Proteine ERK und Akt mit Hilfe des Western Blots analysiert. Da die Funktionalität des HSP90-Proteins an dem Zelllysate der Kyse510 Zellen durchgeführt wurde (siehe Kapitel 6.3.5.1), wurden die Klientproteine von HSP90 anfänglich auch an den Kyse510 Zellen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.19 dargestellt.

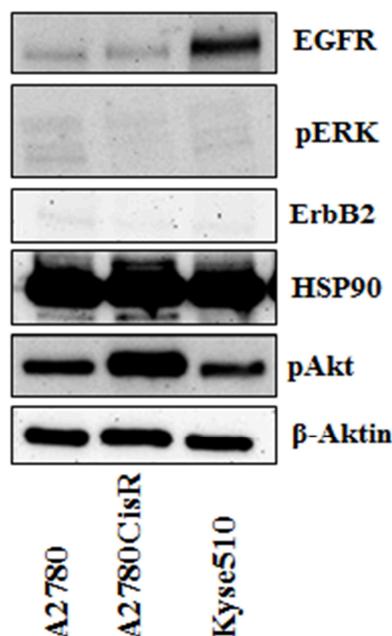


Abbildung 6.19 Charakterisierung von Klientproteinen in A2780, A2780CisR und Kyse510 Zellen.

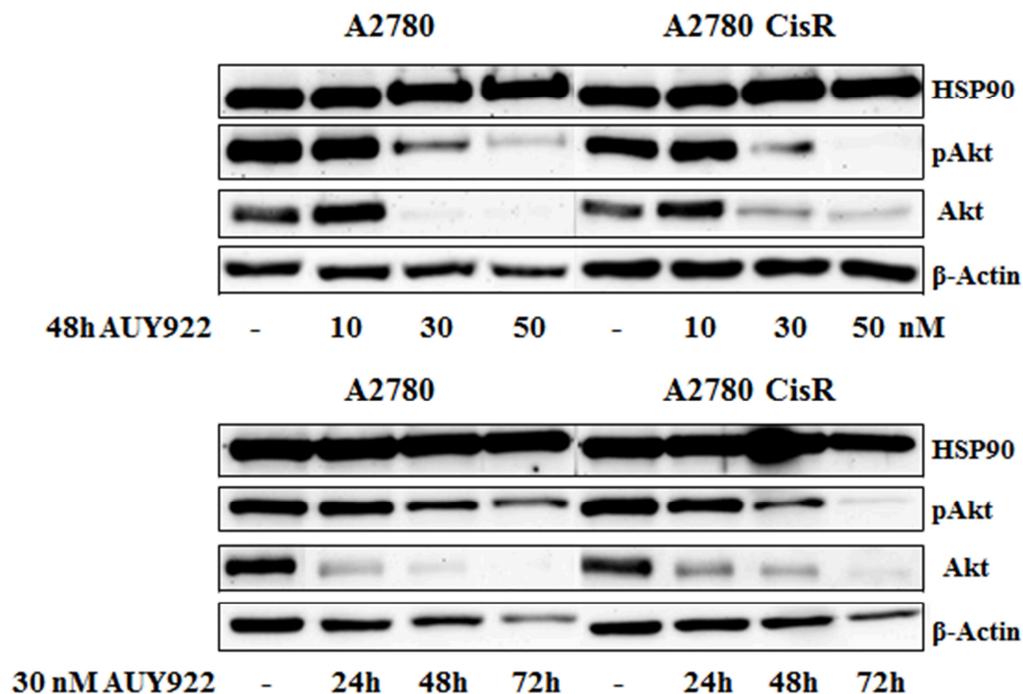
Der Nachweis der Klientproteine EGFR, pERK, ErbB2, HSP90 und pAkt erfolgte mit Hilfe des Western Blots. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Es wurden 25 μ g Protein/Bande eingesetzt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

Die Expression von EGFR, pERK und ErbB2 waren für die Analyse potentieller HSP90i-Effekte zu gering. In Kyse510 war die Expression an EGFR ausreichend hoch, allerdings sollten die nachfolgenden Analysen hauptsächlich an den Ovarialkarzinomzelllinien

A2780 und deren Cisplatin-resistentem Subklon A2780CisR durchgeführt werden. Daher wurde als Klientprotein Akt und das phosphorylierte Akt ausgewählt, um den Einfluss der HSP90i auf diese HSP90-Klientproteine detektieren zu können. In allen drei Zelllinien war das HSP90-Protein ebenfalls stark exprimiert und konnte somit neben β -Aktin als Ladekontrolle dienen.

Da die zytotoxischen IC_{50} -Werte über 72 Stunden an den A2780 und A2780CisR Zellen in derselben Größenordnung lagen, wurden für die Beeinflussung der Proteinexpression in beiden Zelllinien dieselben Konzentrationen der HSP90i eingesetzt. Das waren 10 nM für NVP-AUY922 und 22 nM für NVP-HSP990. Die Abnahme der Expression von Akt und dessen Phosphorylierung wurde auf eine konzentrations- und zeitabhängige Weise durch den Einsatz der beiden HSP90i analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.20 dargestellt.

A



B

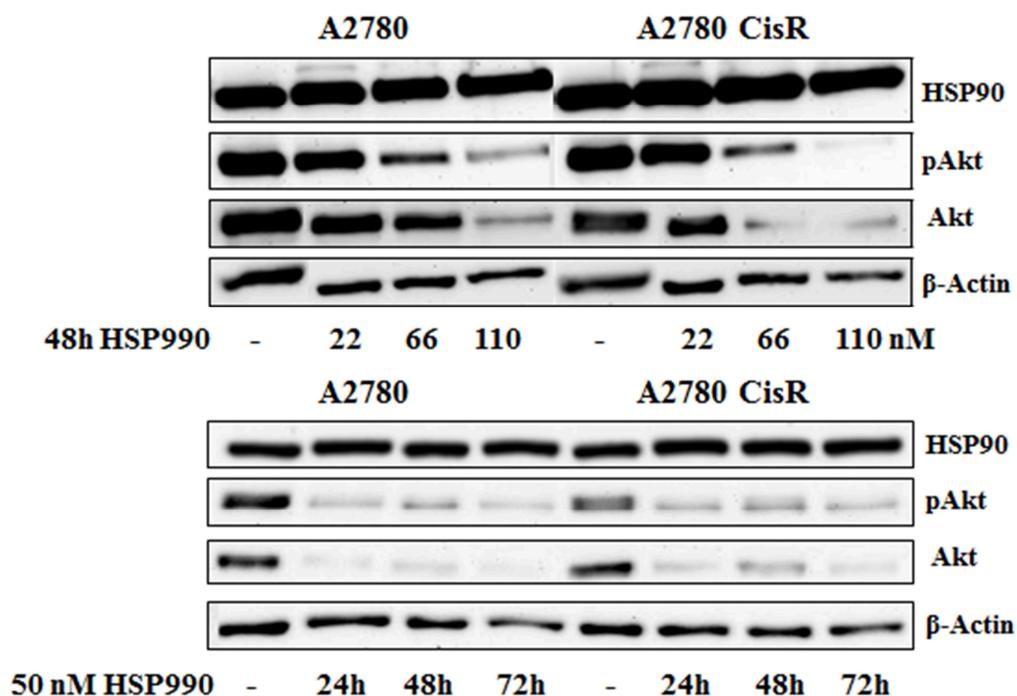


Abbildung 6.20 Beeinflussung der Akt-Expression und Phosphorylierung durch die HSP90i NVP-AUY922 bzw. NVP-HSP990.

A2780 und A2780CisR wurden mit den HSP90i NVP-AUY922 (A) und NVP-HSP990 (B) inkubiert. Die Zellen wurden zum einen für 48h mit dem IC_{50} -Wert, dem 3-fachen oder 5-fachen IC_{50} -Wert inkubiert. Zum anderen erfolgte die Inkubation mit dem 3-fachen IC_{50} -Wert für 24, 48 und 72 Stunden. Die IC_{50} -Werte wurden mittels eines MTT-Assays ermittelt (siehe Tabelle 6.6). β -Aktin wurde als Ladekontrolle eingesetzt. Es wurden 25 μ g Protein/Bande eingesetzt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

Eine 48-stündige Inkubation in einer dem IC_{50} -Wert entsprechenden Konzentration bzw. dem 3-fachen oder dem 5-fachen des IC_{50} -Wertes zeigte, dass eine verminderte Expression auf das Klientprotein Akt erst ab dem 3-fachen IC_{50} -Wert erzielt wurde. Die Inkubation mit den HSP90i zeigte dabei keinen Einfluss auf die HSP90-Expression. Dies zeigte sich sowohl bei NVP-AUY922 als auch bei NVP-HSP990. Zur Analyse einer Zeitabhängigkeit des beobachteten Effektes wurden daher beide HSP90i in einer Konzentration eingesetzt, die dem 3-fachen IC_{50} -Wert entsprach. Hier zeigte sich durch beide Inhibitoren bereits nach 24 Stunden eine verminderte Akt-Expression, was jedoch nicht mit der Abnahme des Phosphorylierungsstatus korrelierte. Durch den Einsatz von NVP-AUY922 wurde erst nach 48 Stunden eine verminderte Phosphorylierung von Akt sichtbar. Beim Einsatz von NVP-HSP990 war die verminderte Expression in beiden Proteinen bereits nach 24 Stunden detektierbar. Es wurden ebenfalls A2780 und A2780CisR mit dem 3-fachen IC_{50} -Wert der HSP90i für 6 und 12 Stunden inkubiert und anschließend analysiert. Hier war bei beiden Inhibitoren kein Einfluss auf die Proteinexpression bzw. die Phosphorylierung zu erkennen.

Da der Cisplatin-sensitivierende Effekt der HSP90i hauptsächlich an den A2780 Zellen sichtbar war, wurden diese Zellen verwendet, um den Einfluss auf die Klientproteine von HSP90 unter den sensitivierenden Bedingungen zu untersuchen. An den A2780 wurde eine erhöhte Cisplatinsensitivität mit 5 nM NVP-AUY922 gesehen (siehe Abbildung 6.15). Dafür wurden die Zellen über einen Zeitraum von 120 Stunden mit 3, 5 oder 10 nM NVP-AUY922 inkubiert und die Proteine anschließend mittels Western Blot untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 6.21 dargestellt.

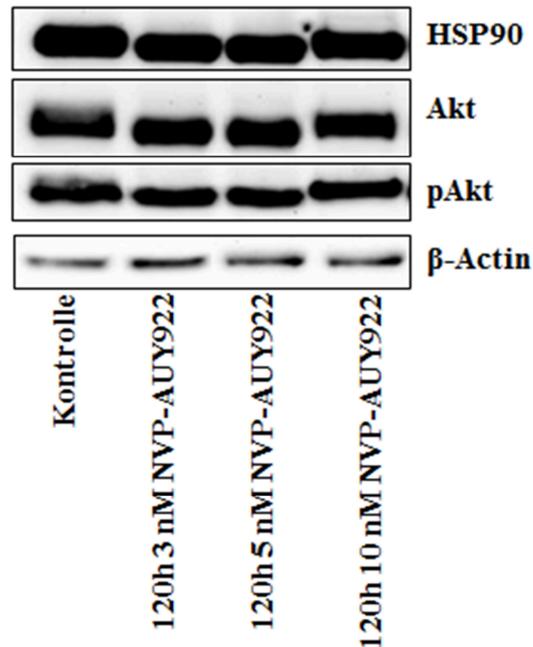


Abbildung 6.21 Beeinflussung der Akt-Expression und dessen Phosphorylierung durch eine Inkubation von A2780 mit NVP-AUY92 über 120h.

A2780 wurden für insgesamt 120h mit 3, 5 oder 10 nM NVP-AUY922 inkubiert und anschließend die Expression von HSP90, AKT und dessen Phosphorylierung bestimmt. β-Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Es wurden 20 µg Protein/Bande eingesetzt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

Es kam zu keiner veränderten Expression oder Phosphorylierung von Akt. Dies bedeutet, dass die Erhöhung der Cisplatinempfindlichkeit vermutlich nicht alleine über Akt gesteuert wurde, da unter den gewählten Bedingungen eine Sensitivierung gegenüber Cisplatin zu beobachten war, Akt jedoch nicht beeinflusst wurde.

Die Kombination der geringen Konzentration von NVP-AUY922 mit Cisplatin wurde ebenfalls auf Proteinebene untersucht. Analog zum MTT-Assay wurden die Zellen zunächst 48 Stunden mit NVP-AUY922 präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 6 Stunden mit dem IC_{50} -Wert von Cisplatin behandelt und im Folgenden für 24 Stunden ohne Cisplatin weiterkultiviert, bevor die Proteine gewonnen wurden. Während der Erholungsphase befand sich NVP-AUY922 ebenfalls im Medium. Abbildung 6.22 zeigt das Ergebnis.

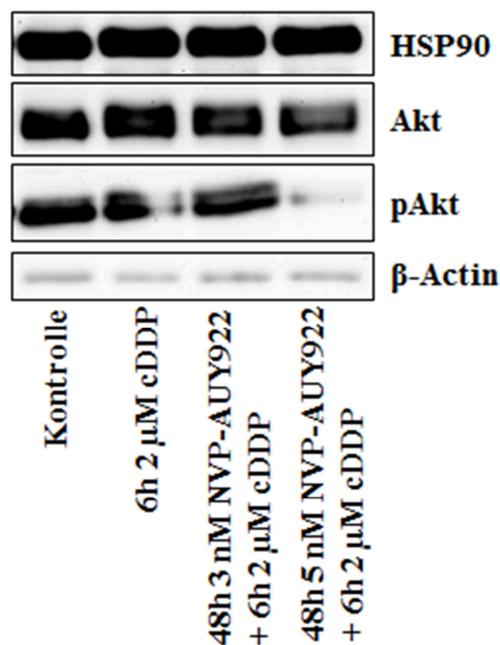


Abbildung 6.22 Beeinflussung der Akt-Expression und dessen Phosphorylierung durch eine Kombination von NVP-AUY922 und Cisplatin in A2780.

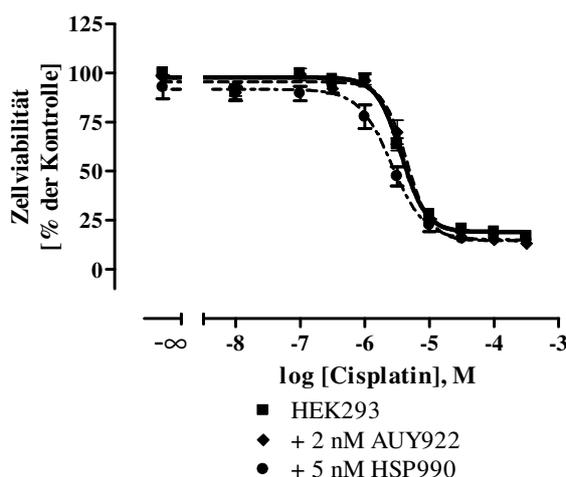
Die A2780 Zellen wurden für 48h ohne Inhibitor oder mit 3 bzw. 5 nM NVP-AUY922 präinkubiert und anschließend für 6h mit dem IC_{50} -Wert von Cisplatin behandelt. Nach einer 24-stündigen Ruhephase in Anwesenheit des Inhibitors wurden die Proteine zur Bestimmung der Expression von HSP90, Akt und dessen Phosphorylierung gewonnen. β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Es wurden 25 μ g Protein/Bande eingesetzt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

Durch eine 6-stündige Behandlung der A2780 Zellen mit der IC_{50} -Konzentration von Cisplatin wurde die Expression von Akt und dessen Phosphorylierung nicht beeinflusst. Eine 48-stündige Präinkubation mit 3 nM NVP-AUY922 vor der Cisplatinbehandlung führte ebenfalls zu keiner Änderung der Expression oder der Phosphorylierung. Durch den Einsatz von 5 nM NVP-AUY922 in Kombination mit Cisplatin wurde die Phosphorylierung von Akt vermindert, die Expression blieb dabei unverändert. Auch hier wurden die geringeren Konzentrationen von 3 und 5 nM NVP-AUY922 gewählt, mit denen eine Sensitivierung gegenüber Cisplatin erzielt wurde, um den Effekt auf die Cisplatinsensitivität zu imitieren. Dieses Ergebnis bestätigte ebenfalls, dass das Akt-Protein als Klientprotein von HSP90 nicht alleine für die Sensitivierung gegenüber Cisplatin verantwortlich sein kann.

Um eine Tumor-Selektivität der HSP90i zu analysieren, wurde der Einfluss auf die Cisplatinsensitivität an HEK293 geprüft. Da sich bei den Konzentrations-Effekt-Kurven der HSP90i steile Kurvenverläufe ergaben, konnten im Gegensatz zu den HDACi nicht dieselben Konzentrationen an den HEK293 wie an den A2780 Zellen verwendet werden. Die Konzentration musste vermindert werden. Daher konnten für die Untersuchung der

Sensitivitätsbeeinflussung an den HEK293 Zellen nur 2 nM NVP-AUY922 und 5 nM NVP-HSP990 eingesetzt werden (vergleiche Tabelle 6.7). Bei Steigerung der Konzentration starben die Zellen bereits in der Kontrolle ohne Cisplatin, so dass keine Konzentrations-Effekt-Kurve erstellt werden konnte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.23 dargestellt.

A



B

Bedingung	HEK293		
	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf
Kontrolle	3,17	5,50 ± 0,02	-
NVP-AUY922	4,47	5,35 ± 0,03	0,7
NVP-HSP990	2,60	5,59 ± 0,05	1,2

Abbildung 6.23 Einfluss der HSP90i auf die Cisplatinsensitivität von HEK293.

Die Substanzen wurden 48h vor einer 72-stündigen Cisplatinbehandlung zu den Zellen gegeben. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert ± SEM von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten in Triplikaten dar. **B** IC₅₀-Werte sowie pIC₅₀ ± SEM von der in **A** gezeigten Kurven. Sf ist der Shiftfaktor berechnet als Quotient aus dem Kontroll-IC₅₀-Wert der unbehandelten Zelllinie und der behandelte Zelllinie.

Durch den Einsatz von NVP-AUY922 kam es zu einem leichten Anstieg des IC₅₀-Wertes. Beim Einsatz von 5 nM NVP-HSP990 sank der IC₅₀-Wert auf 2,60 μM. Dies ergab lediglich einen Shiftfaktor von 1,2. Somit ergab sich auch durch den Einsatz der HSP90i, wie auch bei den HDACi gesehen, keine Beeinflussung der Cisplatinsensitivität an den Nicht-Karzinomzellen HEK293.

6.3.4 Beeinflussung der Resistenzentwicklung durch HSP90i

Bei der Zytostatikatherapie des Ovarialkarzinoms ist die Resistenzentwicklung ein häufig auftretendes Problem [Davis et al., 2014]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob durch den Einsatz eines HSP90i die Resistenzausbildung verhindert werden kann. Da NVP-HSP990 in klinischen Studien den erwarteten Effekt nicht erbracht hat [Sidera and Patsavoudi, 2014], wurde dafür nur NVP-AUY922 eingesetzt. Die A2780 Zellen wurden dauerhaft mit 3 nM NVP-AUY922 in Kultur gehalten und wöchentlich für 6 Stunden mit 3,5 μ M Cisplatin behandelt. Zum besseren Vergleich sind in Abbildung 6.24 ebenfalls A2780 und A2780CisR_{neu} analog zu Abbildung 6.7 abgebildet.

A

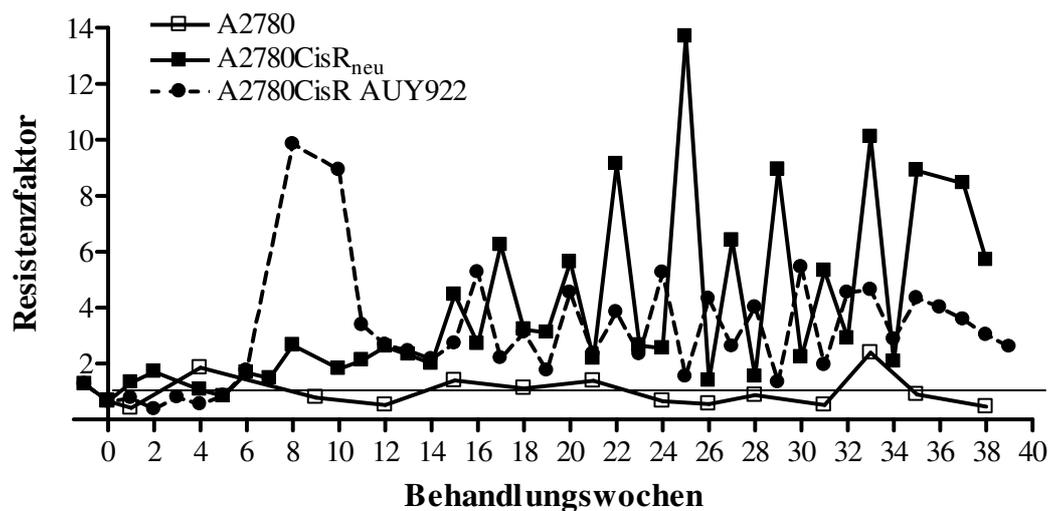


Abbildung 6.24 Resistenzentwicklung an den A2780 Zellen unter dem Einfluss von NVP-AUY922.

Legende s. S. 108

B

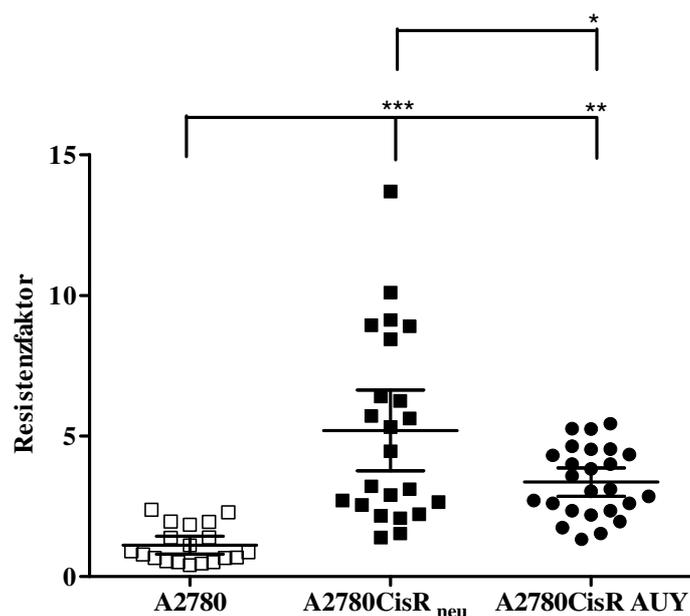


Abbildung 6.24 Resistenzentwicklung an den A2780 Zellen unter dem Einfluss von NVP-AUY922.

A A2780 wurden einmal wöchentlich mit Cisplatin in einer IC_{50} -Konzentration behandelt, entweder ohne weiteren Zusatz (A2780CisR_{neu}) oder unter permanenter Anwesenheit von 3 nM NVP-AUY922 (A2780CisR AUY922). Nach 36 Wochen wurde die wöchentliche Behandlung mit Cisplatin beendet. Parallel wurden IC_{50} -Werte der A2780 Zellen zur Verlaufskontrolle bestimmt. Der Mittelwert der Verlaufskontrolle wurde verwendet, um den Resistenzfaktor als Quotient der IC_{50} -Werte aus behandelter Zelllinie und un behandelter Kontrolle zu berechnen. Dieser ist im Graphen gegen die Zeit aufgetragen. Die Gerade kennzeichnet einen Resistenzfaktor von 1, d.h. keine Veränderung des IC_{50} -Wertes. **B** Gruppierung der Resistenzfaktoren ab der 22. Behandlungswoche der unterschiedlich behandelten Kinetiken. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM der Resistenzfaktoren. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$. Alle Datensätze sind normalverteilt (D'Agostino & Pearson normality test, Graph Pad Prism).

Die gestrichelte Linie (Abbildung 6.24A) zeigt den Verlauf der A2780CisR AUY922. Da die Zellen ständig mit NVP-AUY922 kultiviert wurden und dadurch der zytotoxische Effekt des HSP90i auf Dauer zu stark war, musste die Konzentration auf 3 nM gesenkt werden im Vergleich zur Konzentration für die Cisplatinsensitivierung (siehe Abbildung 6.15). In den ersten Wochen erfolgte eine Hypersensitivierung durch den Einsatz des HSP90i. Bis einschließlich der 5. Behandlungswoche blieb der IC_{50} -Wert unter dem der un behandelten Kontrolle, durch einen Resistenzfaktor kleiner als 1 in Abbildung 6.24A zu erkennen. Im weiteren Verlauf kam es zum Anstieg des Resistenzfaktors, der jedoch nicht konstant blieb, sondern zwischen 2 bis 5 schwankte. Nach 35 Behandlungen mit Cisplatin wurden die wöchentlichen Cisplatinbehandlungen ausgesetzt und der IC_{50} -Wert für weitere 3 Wochen bestimmt. Hier war ein stetiger Abfall des Resistenzfaktors zu beobachten, was ebenfalls an der A2780CisR_{neu} zu erkennen war. Der durchschnittliche Resistenzfaktor unter der dauerhaften NVP-AUY922 Behandlung betrug 3,4, berechnet über die letzten 22 Wochen. Dies ergab einen IC_{50} -Wert von $7,30 \mu M$ ($pIC_{50} = 5,14 \pm 0,03$). Die Effektstärke nach Cohen im Vergleich zur Resistenzentwicklung ohne einen Inhibitorzusatz berechnet,

ergab einen Wert von 0,73, das für einen mittleren Effekt sprach. Die Resistenzfaktoren über die letzten 22 Behandlungswochen zeigten, dass es zu einem Anstieg des Resistenzfaktors kam, der jedoch nicht so hoch war wie bei den A2780CisR_{neu}, aber höher lag als bei den unbehandelten A2780. Der Einsatz eines HSP90i konnte die Resistenzentwicklung nicht vollständig verhindern, jedoch im Vergleich zu der nur mit Cisplatin behandelten Zelllinie verringern.

6.3.5 Potentielle HSP90i

Im Arbeitskreis von Prof. Kurz, Heinrich Heine Universität Düsseldorf, wurden Substanzen synthetisiert, die das HSP90-Protein hemmen sollten. Bei dieser Art der Substanzen sollte es sich um eine Hemmung der Dimerisierung des HSP90-Proteins handeln, d.h. die Protein-Protein-Interaktion am C-Terminus des Proteins wurde adressiert [Ciglia et al., 2014, Spanier et al., 2014]. Zum einen waren dies Substanzen mit dem Kürzel LSK, die eine Trispyrimidonamid-Struktur aufwiesen. Zum anderen Substanzen mit dem Kürzel DDK, bei denen es sich um α -Aminoxyoligopeptide handelte. Zur genaueren Untersuchung der HSP90-Hemmung wurde ein HSP90-Assay etabliert, der als Grundlage die Hemmung der Luciferase-Rückfaltung untersucht. Dieser wurde zunächst mit Hilfe bekannter HSP90i validiert.

6.3.5.1 Etablierung des Luciferase-Rückfaltungs-Assays

Die HSP90-inhibierenden Effekte der HSP90i wurden mit Hilfe des Luciferase-Rückfaltungs-Assays bestimmt. Dazu wurde eine Hitze-inaktivierte Luciferase verwendet, die erst wieder nach einer Faltung durch die HSP90-Maschinerie das Substrat Luciferin umsetzen kann. In der Regel wird Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (*Rabbit Reticulocyte Lysate*, RRL) in diesem Assay als HSP90-Quelle verwendet, da alle benötigten Cochaperone des Multichaperonkomplexes bereits im Lysat enthalten sind. Das Vorgehen wurde analog zu Galam et al. [2007] durchgeführt. Als HSP90-Quelle wurde jedoch ein hypotones Zelllysate der Kyse510-Zellen eingesetzt. Diese Zelllinie wurde aufgrund der hohen HSP90-Expression verwendet. Der Vergleich der Fluoreszenzintensitäten aus Microarray-Analysen aus der Arraydatenbank des Arbeitskreis von Prof. Kassack zeigte, dass im Vergleich zu der Ovarialkarzinomzelllinie A2780, der Zungenkarzinomzelllinie Cal27 sowie der Brustkarzinomzelllinie T47D die Ösophaguszelllinie Kyse510 das induzierbare HSP90-Protein α am stärksten exprimiert. Im konstitutiv exprimierten HSP90 β waren nur geringe Unterschiede zu sehen (siehe Abbildung 6.25).

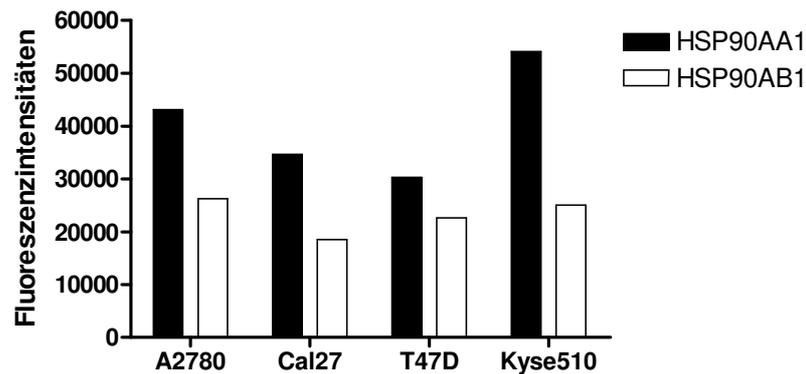


Abbildung 6.25 Expression von HSP90AA1 und HSP90AB1.

Mittels einer Microarray-Analyse wurde die Genexpression von HSP90AA1 und HSP90AB1 in A2780, Cal27, T47D und Kyse510 bestimmt. Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitäten in den genannten Zelllinien.

In Validierungsexperimenten wurde zunächst die Menge an zu verwendendem ATP, D-Luciferin sowie die Inkubationszeiten und -temperaturen ermittelt. Ein deutlicher Unterschied zu Galam et al. lag im Assaypuffer, der kein zusätzliches ATP enthielt. Das System aus Creatinphosphokinase und Creatinphosphat reichte aus, um die Konzentration an benötigtem ATP aufrecht zu erhalten. Bei einer erhöhten Konzentration an ATP kam es von Assay zu Assay zu größeren Schwankungen. Zum anderen wurde die Konzentration an D-Luciferin im Assaypuffer von 470 μM auf 50 μM gesenkt (siehe Abbildung 6.26).

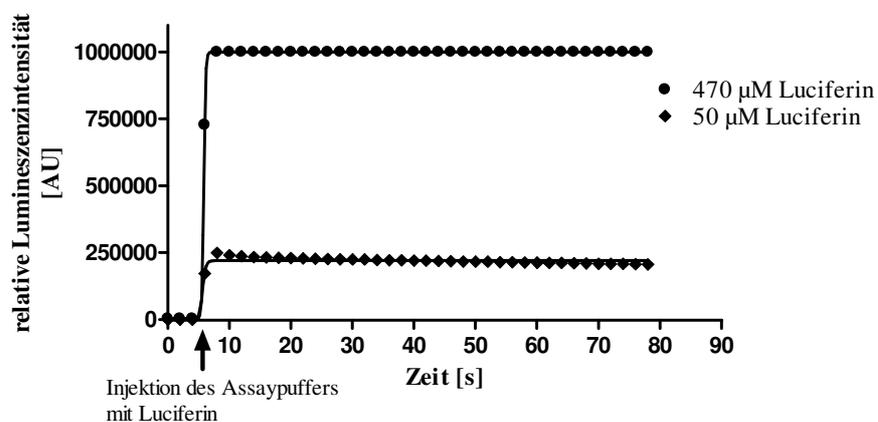


Abbildung 6.26 Lumineszenz-Zeit-Kurven des Luciferase-Rückfaltungs-Assays.

Dargestellt ist die sich ergebende Kurve der Lumineszenzintensität gegen die Zeit nach 2 Stunden Inkubation der denaturierten Luciferase mit dem Kyse510-Zellysate. Es wurde der Einsatz von 470 μM gegen 50 μM Luciferin im Assaypuffer verglichen.

Bei der höheren Konzentration an Luciferin, analog zu Galam et al., wurde das Maximum des messbaren Bereiches des Luminometers LUMIstar erreicht (1.000.000 AU), so dass keine Änderung in der Lumineszenzintensität detektiert werden konnte. Durch eine geringere Luciferin-Konzentration wurden die erreichten Lumineszenzintensitäten

vermindert, so dass Veränderungen der Lumineszenzintensität festgestellt werden konnten. Dies sollte im Folgenden durch den Einsatz von HSP90i erfolgen.

Als Inkubationszeit für eine signifikante HSP90-Inhibition wurde eine Zeit von 30 Minuten ermittelt, die Galam et al. entsprach. Zur Renaturierung der Luciferase waren 2 Stunden bei einem Temperaturoptimum von 25°C notwendig (Abbildung 6.27).

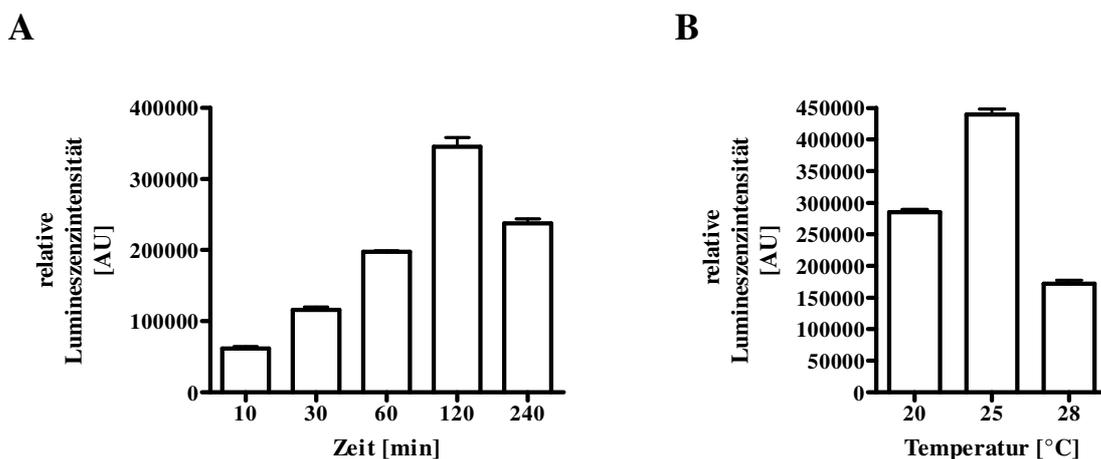


Abbildung 6.27 Festlegung des Optimums zur Messung des HSP90-Assays.

A Validierung der optimalen Inkubationszeit zur Rückfaltung der Luciferase. **B** Validierung der Temperatur zur Inkubation während der Luciferase-Rückfaltung. Balkendiagramme zeigen die maximal erreichten Lumineszenzintensitäten in einem Assay, vermessen in Duplikaten.

Die gemessene relative Lumineszenzintensität stieg bis zu 2 Stunden Inkubation an. Nach einer 4-stündigen Inkubation war bereits ein Abfall der gemessenen Lumineszenzintensität erkennbar. Bei weniger als 2 Stunden Inkubation konnte die in diesem Testsystem erreichbare maximale Lumineszenzintensität nicht erhalten werden. Bei 25°C handelt es sich um das Temperaturoptimum für die Luciferase [Ford and Leach, 1998]. Dies konnte anhand der gemessenen Lumineszenzintensitäten für dieses Testsystem bestätigt werden (siehe Abbildung 6.27B). Mit den optimierten Bedingungen für die Luciferase-Rückfaltung erfolgte die Aufnahme von Konzentrations-Effekt-Kurven der HSP90i. Der Assay wies trotz der Optimierungen einige Schwankungen auf. Dies könnte von den verwendeten Zelllysate-Chargen abhängig sein. Es wurden jeweils 5-10 Aliquots an Zelllysate auf einmal gewonnen und verwendet. Daher wurde bei jedem Assay eine verkürzte Konzentrations-Effekt-Kurve des HSP90i NVP-HSP990 in Duplikaten als Referenz vermessen. Aus mehreren Assays wurde der IC_{50} -Wert sowie das 95%-Konfidenzintervall der NVP-HSP990 Konzentrations-Effekt-Kurve ermittelt und als Normbereich definiert. Es wurden nur Ergebnisse der Assays verwendet, bei denen der

IC₅₀-Wert von NVP-HSP990 im vorgegebenen Normbereich lag. Abbildung 6.28 zeigt exemplarisch eine Konzentrations-Effekt-Kurve von NVP-HSP990.

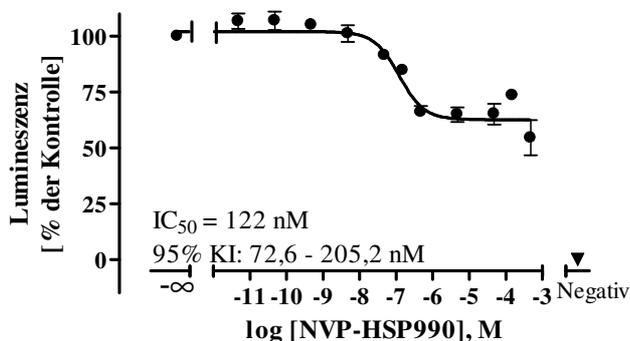


Abbildung 6.28 Exemplarische Konzentrations-Effekt-Kurve von NVP-HSP990 im Luciferase-Rückfaltungs-Assay.

Nach Validierung des Luciferase-Rückfaltungs-Assays ergeben sich durch den Einsatz von NVP-HSP990 oben gezeigte Kurvenverläufe. ∞ kennzeichnet die Lösemittelkontrolle, Negativ die Probe ohne HSP90-Quelle, d.h. ohne Kyse510-Zelllysate. Gezeigt sind der IC₅₀-Wert von NVP-HSP990 sowie das 95%-Konfidenzintervall, das zur Einordnung der Assays verwendet wurde.

Die Lösemittelkontrolle, gekennzeichnet mit ∞ , enthielt das verwendete Kyse510 Zelllysate mit 10% DMSO als Lösemittelkontrolle in Abwesenheit von Inhibitoren. Die Negativkontrolle enthielt hingegen nur Puffer mit der höchsten Konzentration des eingesetzten Inhibitors in Abwesenheit von Kyse510-Zelllysate, also in Abwesenheit des HSP90-Proteins. Somit wurde zum einen ausgeschlossen, dass die zu vermessende Substanz eine Eigenlumineszenz aufwies, zum anderen wurde so deutlich, dass die vermessene Lumineszenz durch die im Zelllysate enthaltene HSP90-Maschinerie verursacht wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass im Rahmen dieses Assays eine Umsetzung des Luciferins detektiert werden konnte, der eine Rückfaltung der Luciferase vorangegangen sein muss.

Zunächst wurde der Assay mit den bekannten HSP90i NVP-AUY922, NVP-HSP990 und Novobiocin durchgeführt. Um auszuschließen, dass die HSP90i die Luciferase selbst inhibierten und nicht das HSP90-Protein, wurden die HSP90i an der aktiven Luciferase getestet. Dazu wurde die Luciferase nicht hitzedeaktiviert, in einer Konzentration von 1,5 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt und die HSP90i analog zum normalen Vorgehen zunächst 30 Minuten mit dem Zelllysate auf Eis und anschließend für weitere 2 Stunden mit der Luciferase bei 25°C inkubiert. Die HSP90i wurden dabei mit einer maximalen Konzentration von 479 μM eingesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 6.29 dargestellt.

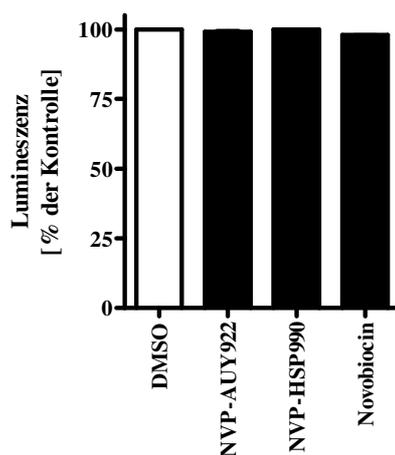


Abbildung 6.29 Die HSP90i NVP-AUY922, NVP-HSP990 und Novobiocin hemmen die aktive Luciferase nicht.

Die HSP90i wurden für 2 Stunden (analog zum Vorgehen beim Luciferase-Rückfaltungs-Assay) mit der aktiven Luciferase inkubiert und anschließend die Lumineszenzintensität vermessen. Die Substanzen wurden in einer maximalen Konzentration von 479 μM getestet. Daten entsprechen der gemessenen Lumineszenzintensität, prozentualisiert auf die Lösemittelkontrolle (DMSO). Dieser Versuch wurde einmalig in Duplikaten vermessen.

Es kam durch den Einsatz der HSP90i zu keiner Abnahme der erzielten Lumineszenzintensität. Das etablierte Testsystem konnte im Folgenden zur Ermittlung der inhibitorischen Aktivität der HSP90i an der HSP90 Maschinerie eingesetzt werden. Es ergaben sich die in Abbildung 6.30 dargestellten Kurvenverläufe für die bekannten HSP90i.

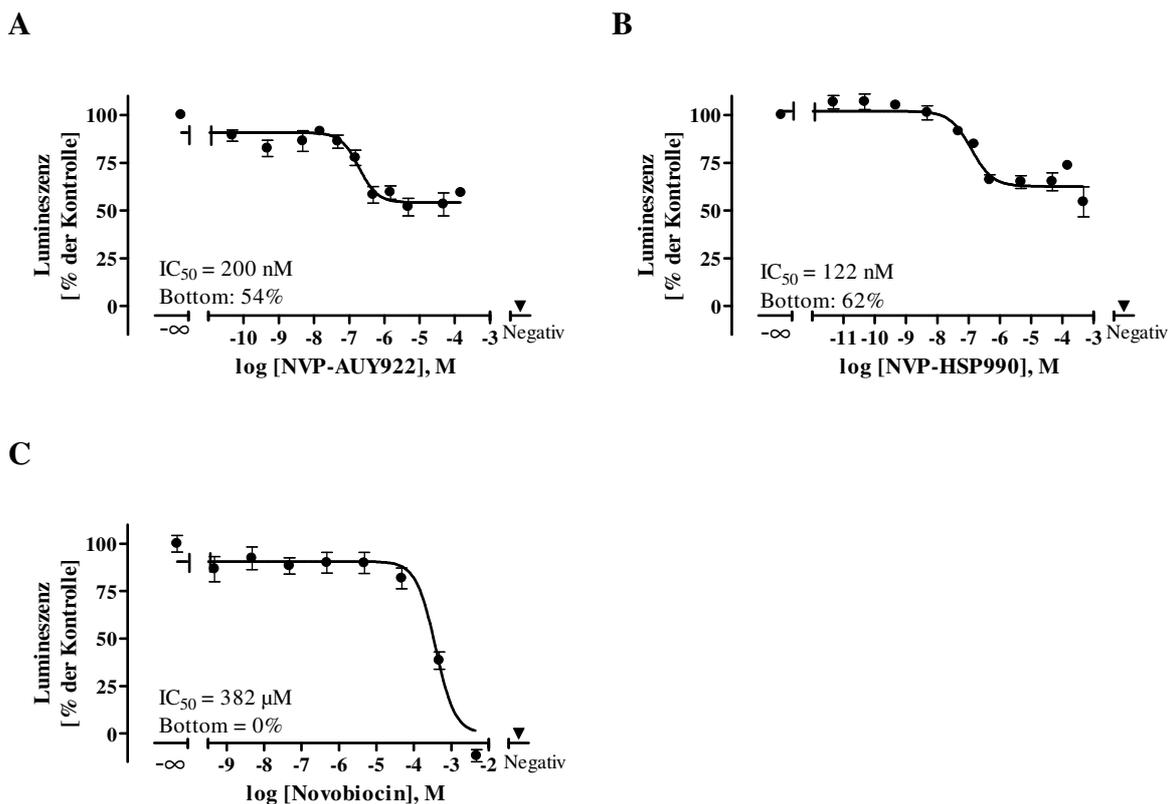


Abbildung 6.30 Ermittlung der inhibitorischen Aktivität gegenüber der HSP90-Maschinerie der HSP90i.

Die inhibitorische Aktivität der N-terminalen HSP90i NVP-AUY922 (A) und NVP-HSP990 (B) sowie des C-terminalen HSP90i Novobiocin (C) wurden mittels Luciferase-Rückfaltungs-Assay bestimmt. Als HSP90-Quelle diente Kyse510-Zelllysate. Negativ definiert die ablaufende Reaktion ohne HSP90-Quelle. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von mindestens 3 unabhängigen Versuchen in Triplikaten vermessen. Der IC_{50} -Wert ist im Graph angegeben, sowie das Bottomplateau als Maß für die Effektivität der Inhibition.

Auffällig waren die unterschiedlichen Kurvenverläufe, die sich durch den Einsatz von Novobiocin im Vergleich zu den beiden N-terminalen HSP90i ergaben. Bei NVP-AUY922 und NVP-HSP990 konnte durch höhere Konzentrationen keine Erhöhung der Wirkstärke erzielt werden. Es wurden ab einer Konzentration von ca. $1 \mu\text{M}$ maximal 50% der Reaktion gehemmt. Novobiocin zeigte hier ein anderes Verhalten. Es wurde bei der Steigerung der Konzentration auf $4,79 \text{ mM}$ eine Inhibition auf das Niveau der Negativkontrolle erzielt. Im Umkehrschluss bedeutete dies, dass keine Rückfaltung der Luciferase erfolgen und somit kein Luciferin umgesetzt werden konnte. Diese Beobachtung wurde auch von Sadikot et al. gemacht, die die unterschiedlichen Kurvenverläufe mit der Inhibitionsart der HSP90i korrelierten. Im zellbasierten System des Luciferase-Rückfaltungs-Assay zeigten Sadikot et al., dass N-terminale Inhibitoren nur eine Hemmung von maximal 50% verursachten, wohingegen C-terminale Inhibitoren in der Lage waren, die Reaktion vollständig zu hemmen [Sadikot et al., 2013]. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den in Abbildung 6.30 gezeigten Ergebnissen, da es sich bei NVP-AUY922 und NVP-HSP990 um N-terminale Inhibitoren handelt und bei

Novobiocin um einen C-terminalen Inhibitor [Allan et al., 2006]. Die N-terminalen Inhibitoren binden an die ATP-Bindestelle im N-Terminus des HSP90-Proteins und sorgen dafür, dass nicht genügend Energie für das Falten der Klientproteine zur Verfügung steht. Da sich am C-terminalen Terminus ebenfalls eine ATP-Bindestelle befindet [Soti et al., 2003], könnte diese für die Energieversorgung des Proteins verwendet werden. Dies ist eine mögliche Erklärung, warum die N-terminalen Inhibitoren nicht in der Lage sind, die Reaktion vollständig zu hemmen. Ein C-terminaler Inhibitor hingegen könnte die Dimerisierung oder die ATP-Bindestelle im C-Terminus hemmen. Ist das HSP90-Protein nicht in der Lage zu dimerisieren, kann es auch nicht die Faltung von Klientproteinen durchführen. Somit kann es hier zu einer vollständigen Hemmung der ablaufenden Reaktion kommen. Der Luciferase-Rückfaltungs-Assay konnte also nicht nur zur Charakterisierung potentieller HSP90i verwendet werden, sondern ließ sich auch zur Identifizierung des potentiellen Wirkmechanismus einsetzen.

Über die Konzentrations-Effekt Kurven ließen sich die IC_{50} -Werte der drei HSP90i als Maß für deren inhibitorische Aktivität gegenüber der HSP90-Maschinerie bestimmen. Bei der Dateninterpretation ist allerdings zu berücksichtigen, dass sich im Zelllysate nicht nur das isolierte HSP90-Protein befindet, sondern auch alle für die einwandfreie Aktivität des HSP90-Proteins nötigen Cochaperone. Für die Testung der möglichen HSP90i bedeutet dies, dass anhand des Assays keine Aussage getroffen werden kann, ob lediglich das HSP90-Protein oder eins der anderen Cochaperone, die für die Ausbildung des HSP90-Komplexes notwendig sind, inhibiert werden. Im durchgeführten Assay ergab sich für den N-terminalen Inhibitor NVP-AUY922 ein IC_{50} -Wert von 200 nM ($pIC_{50} = 6,70 \pm 0,12$) mit einem Bottomplateau, der der maximalen Hemmung entspricht, von 46% (siehe Abbildung 6.30A). Für den zweiten bekannten N-terminalen HSP90i NVP-HSP990 ergab sich ein IC_{50} -Wert von 122 nM ($pIC_{50} = 6,91 \pm 0,11$) mit einer maximalen Hemmung von 38% (siehe Abbildung 6.30B). Für den C-terminalen Inhibitor Novobiocin ergab sich ein IC_{50} -Wert von 382 μ M ($pIC_{50} = 3,42 \pm 0,08$) mit einer vollständigen Inhibition der ablaufenden Reaktion (siehe Abbildung 6.30C). So konnte der C-terminale Inhibitor das HSP90-Protein zwar effektiver hemmen als die N-terminalen Inhibitoren, wies dabei aber eine geringere Wirkstärke auf.

6.3.5.2 Trispyrimidonamide als HSP90i

Die im AK Kurz synthetisierten Trispyrimidonamide sind in der Lage eine α -Helix zu bilden und somit eine Konformation einzunehmen, die die Positionen i , $i + 4$ und $i + 8$ auf einer α -Helix abdecken [Spanier et al., 2014]. Damit sollten die LSK-Substanzen bei entsprechender Nachahmung der adressierten Aminosäuren in der Lage sein, sich an dem C-Terminus des HSP90-Proteins anzulagern und somit die Dimerisierung zweier Homomere zu verhindern, die für die Funktionalität des HSP90-Proteins essentiell ist [Taipale et al., 2010]. Abbildung 6.31 zeigt die Strukturen der verwendeten LSK-Substanzen [Spanier, 2014]. Da teilweise nicht ausreichend Substanz vorhanden war, wurden nicht alle LSK-Substanzen in allen Assays untersucht.

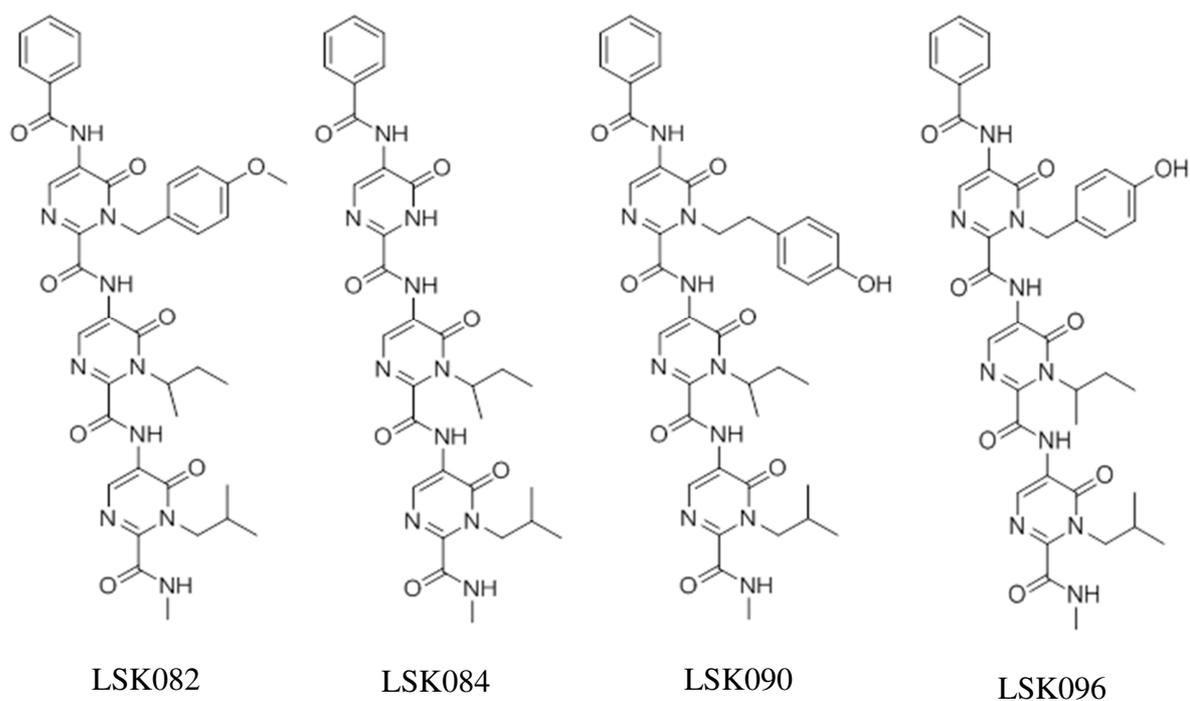


Abbildung 6.31 Strukturformeln der getesteten LSK-Substanzen, nach [Spanier, 2014].

Zytotoxische Effekte der Trispyrimidonamide

Die getesteten Substanzen LSK082, LSK090 und LSK096 sind Substanzen vom Phenoltyp. LSK090 weist bei einer sonst gleichen Struktur eine Methyleneneinheit mehr auf als LSK096. Bei der getesteten Substanz LSK084 handelt es sich um eine Substanz vom Alkyltyp, die auch als Vorstufe der anderen Substanzen gilt. Von diesen Substanzen wurden zunächst die Zytotoxizität über 72 Stunden an unterschiedlichen Zelllinien getestet (siehe Tabelle 6.10).

Tabelle 6.10 Zytotoxizität der LSK-Substanzen dargestellt als IC_{50} -Werte ($pIC_{50} \pm SEM$) bestimmt mittels MTT-Assay mit 72-stündiger Inkubation.

Gezeigte Daten sind der Mittelwert ($pIC_{50} \pm SEM$) von mindestens 2 unabhängigen Experimenten vermessen in Triplikaten. – bedeutet nicht bestimmt an dieser Zelllinie. † kennzeichnet eine Hemmung der Zellviabilität größer als 25% bei einer eingesetzten Konzentration von 100 μM .

Zelllinie	LSK082 [μM]	LSK084 [μM]	LSK090 [μM]	LSK096 [μM]
A2780	2,77 (5,56 \pm 0,07)	71,4 (4,15 \pm 0,03)	46,8 (4,33 \pm 0,07)	29,1 (4,54 \pm 0,05)
A2780CisR	8,09 (5,09 \pm 0,07)	>100 †	>100 †	37,2 (4,43 \pm 0,12)
Cal27	19,2 (4,72 \pm 0,04)	90,2 (4,05 \pm 0,04)	8,69 (5,06 \pm 0,03)	-
Cal27CisR	75,5 (4,12 \pm 0,03)	>100 †	22,5 (4,65 \pm 0,03)	-
Kyse510	5,49 (5,26 \pm 0,05)	>100 †	37,3 (4,43 \pm 0,08)	19,8 (4,70 \pm 0,07)
HEK293	7,43 (5,13 \pm 0,04)	>100 < 4	30,8 (4,51 \pm 0,03)	>100 (< 4)

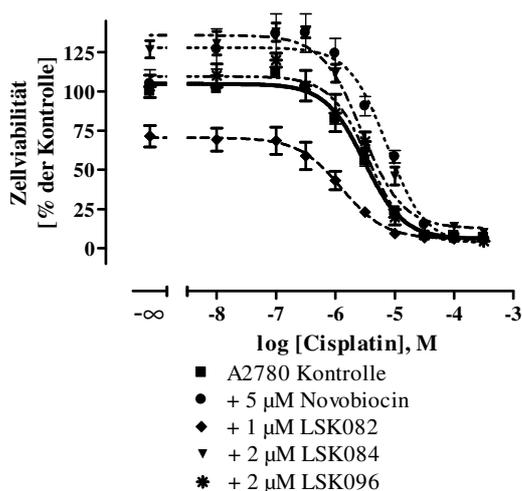
Wie erwartet wies die Vorstufe LSK084 die geringste Zytotoxizität in allen Zelllinien auf. Außer an den Zungenkarzinomzellen Cal27 war LSK082 von den getesteten Substanzen am zytotoxischsten. Insgesamt ließ sich feststellen, dass die Substanzen eine geringe Zytotoxizität aufwiesen im Vergleich zu den N-terminalen HSP90i (vergleiche Tabelle 6.6). LSK082 stellte sich als zytotoxischste Substanz heraus, außer an der Cal27-Zelllinie.

Während der Testung der Substanzen fiel jedoch auf, dass es zu Löslichkeitsproblemen bei LSK082 und LSK084 kam. Daher konnten in den folgenden Assays nicht überall dieselben Konzentrationen für die LSK-Substanzen eingesetzt werden. Es wurde immer versucht die höchste noch lösliche Konzentration einzusetzen, bei der die Zellen ohne morphologische Veränderungen überlebten.

Einfluss der LSK-Substanzen auf die Cisplatinsensitivität

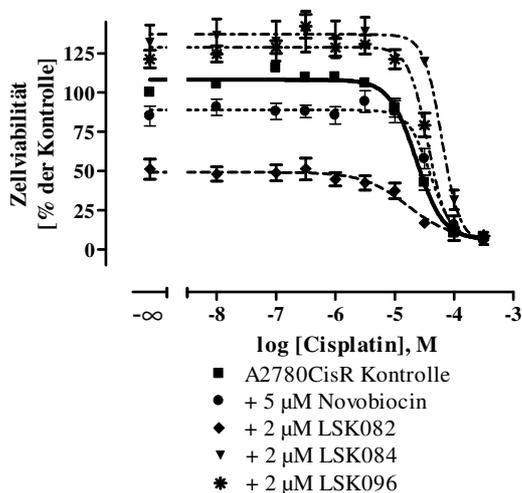
Da die bekannten HSP90i in der Lage waren die Cisplatinsensitivität zu erhöhen, wurden die neuen Substanzen ebenfalls daraufhin getestet. Dies erfolgte an den A2780, A2780CisR und Kyse510 Zellen. Zum Vergleich wurde ebenfalls der C-terminale Inhibitor Novobiocin getestet.

A



A2780				
Bedingungen	IC ₅₀ [µM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig
Kontrolle	3,07	5,51 ± 0,03	-	-
Novobiocin	7,44	5,13 ± 0,09	0,4	***
LSK082	1,27	5,90 ± 0,11	2,4	***
LSK084	2,81	5,55 ± 0,06	1,1	n.s.
LSK096	3,58	5,45 ± 0,08	0,9	n.s.

B

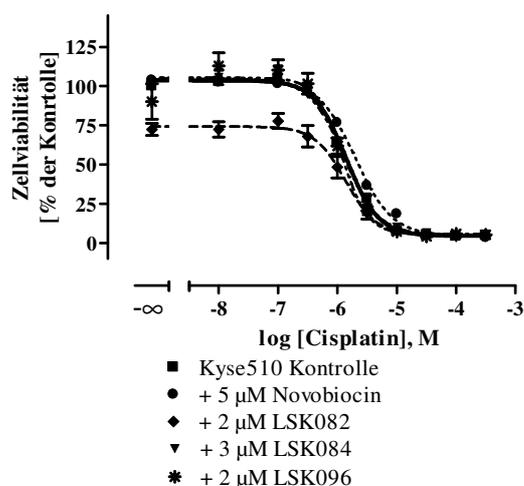


A2780CisR				
Bedingungen	IC ₅₀ [µM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig
Kontrolle	22,9	4,64 ± 0,03	-	-
Novobiocin	40,2	4,40 ± 0,07	0,6	***
LSK082	16,5	4,78 ± 0,21	1,4	n.s.
LSK084	62,1	4,21 ± 0,06	0,4	***
LSK096	36,0	4,44 ± 0,04	0,6	***

Abbildung 6. 32 Einfluss der LSK-Substanzen und Novobiocin auf die Cisplatinsensitivität von A2780, A2780CisR und Kyse510.

Legende s. S. 119

C



Kyse510				
Bedingungen	IC ₅₀ [µM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig
Kontrolle	1,40	5,85 ± 0,02	-	-
Novobiocin	2,01	5,70 ± 0,02	0,7	***
LSK082	1,38	5,86 ± 0,06	1,0	n.s.
LSK084	1,29	5,89 ± 0,04	1,1	n.s.
LSK096	1,19	5,93 ± 0,06	1,2	n.s.

Abbildung 6.32 Einfluss der LSK-Substanzen und Novobiocin auf die Cisplatinsensitivität von A2780, A2780CisR und Kyse510.

Die Substanzen wurden 48h vor der 72-stündigen Cisplatinbehandlung an A2780 (A), A2780CisR (B) oder Kyse510 (C) präinkubiert. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert ± SEM von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten in Triplikaten dar. Die Tabellen zeigen IC₅₀-Werte sowie pIC₅₀ ± SEM. Sf ist der Shiftfaktor berechnet als Quotient aus dem Kontroll-IC₅₀-Wert der unbehandelten Zelllinie und der behandelten Zelllinie, sowie Signifikanzen gekennzeichnet mit *** für p<0,001. Nicht signifikante Unterschiede sind mit n.s. gekennzeichnet.

Wie Abbildung 6.32 zeigt, kam es durch den Einsatz von Novobiocin in allen drei Zelllinien zu einer Erhöhung des IC₅₀-Wertes. Durch den Einsatz von LSK082 kam es bei den A2780 Zellen zu einer signifikanten Senkung des IC₅₀-Wertes. Dies ergab einen Shiftfaktor von 2,4. Bei den resistenten A2780CisR Zellen kam es ebenfalls zu einer Senkung des IC₅₀-Wertes, jedoch war diese mit einem Shiftfaktor von 1,4 nicht signifikant. An den A2780 kam es durch den Einsatz von LSK084 und LSK096 zu keiner signifikanten Änderung des IC₅₀-Wertes. Bei den A2780CisR hingegen kam es durch den Einsatz der beiden Inhibitoren sogar zu einer Steigerung des IC₅₀-Wertes. An den Kyse510 Zellen kam es durch keinen Inhibitor zu einer signifikanten Änderung des IC₅₀-Wertes von Cisplatin (siehe Abbildung 6.32C).

Der Einfluss der LSK-Substanzen auf die Apoptoseinduktion wurde zunächst über einen Zeitraum von 24 Stunden mit einer Konzentration von 2,5 µM untersucht. Um eine Caspase vermittelte Apoptoseinduktion zu untersuchen, wurde eine Probe vor der Inkubation mit den LSK-Substanzen zusätzlich mit dem unspezifischen Caspaseinhibitor QVD-OPh für 1 Stunde präinkubiert. Wegen geringer Substanzmengen, wurden äquimolare Konzentrationen der LSK-Substanzen getestet.

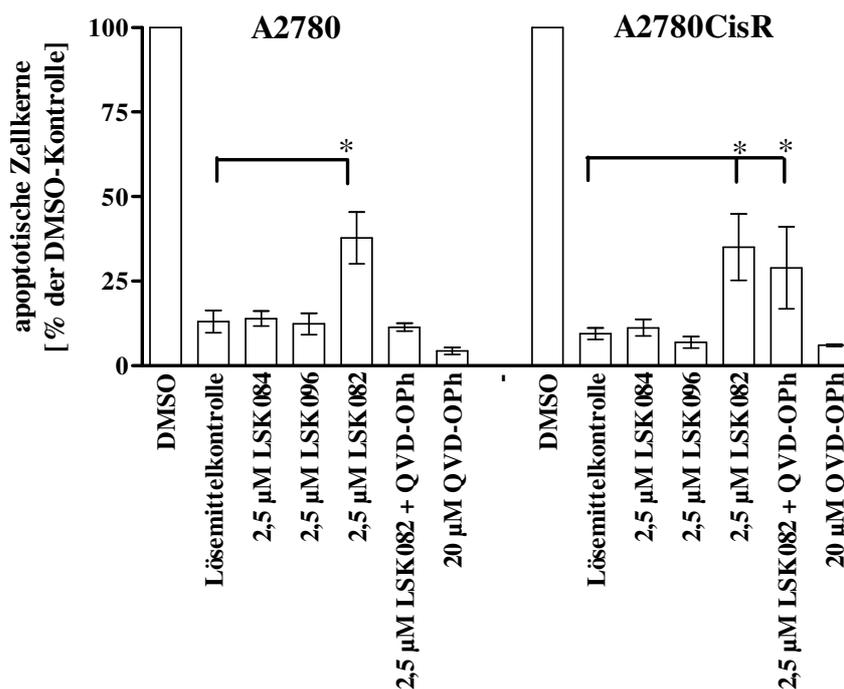


Abbildung 6.33 Apoptoseinduktion durch die LSK-Substanzen.

Die LSK-Substanzen wurden für 24h an den A2780 und A2780CisR Zellen inkubiert und anschließend die apoptotischen Zellkerne vermessen. Der Caspaseinhibitor QVD-Oph wurde 1h vor dem Zusatz von LSK082 in einer Konzentration von 20 µM zu der entsprechenden Probe gegeben. 10% DMSO für 24 Stunden wurde zum Auslösen von Apoptose verwendet und auf diese Apoptoseinduktion die restlichen Werte bezogen. Die Daten zeigen Mittelwerte ± SEM von mindestens 2 unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit * für $p < 0,05$.

Wie in Abbildung 6.33 zu sehen, war von den drei getesteten Substanzen in einer Konzentration von 2,5 µM lediglich LSK082 in beiden Zelllinien in der Lage, Apoptose zu induzieren (A2780 Ctrl $13,07 \pm 3,3\%$ vs. A2780 + 2,5 µM LSK082 $37,78 \pm 7,7\%$; A2780CisR Ctrl $9,46 \pm 1,7\%$ vs. A2780CisR + 2,5 µM LSK082 $35,01 \pm 9,8\%$). Durch den Einsatz des Caspaseinhibitors QVD-Oph konnte die Apoptoseinduktion an den A2780 Zellen verhindert werden (A2780 + QVD-Oph + 2,5 µM LSK082 $11,36 \pm 1,2\%$), nicht aber an den A2780CisR Zellen (A2780CisR + QVD-Oph + 2,5 µM LSK082 $28,94 \pm 12,2\%$). Die beiden anderen getesteten LSK-Substanzen waren an beiden Zelllinien nicht in der Lage, Apoptose zu induzieren. Da nur LSK082 in der Lage war, die Cisplatinempfindlichkeit zu verbessern sowie Apoptose in den Zellen zu induzieren, wurde nur LSK082 in Kombination mit Cisplatin zur Induktion von Apoptose getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.34 dargestellt.

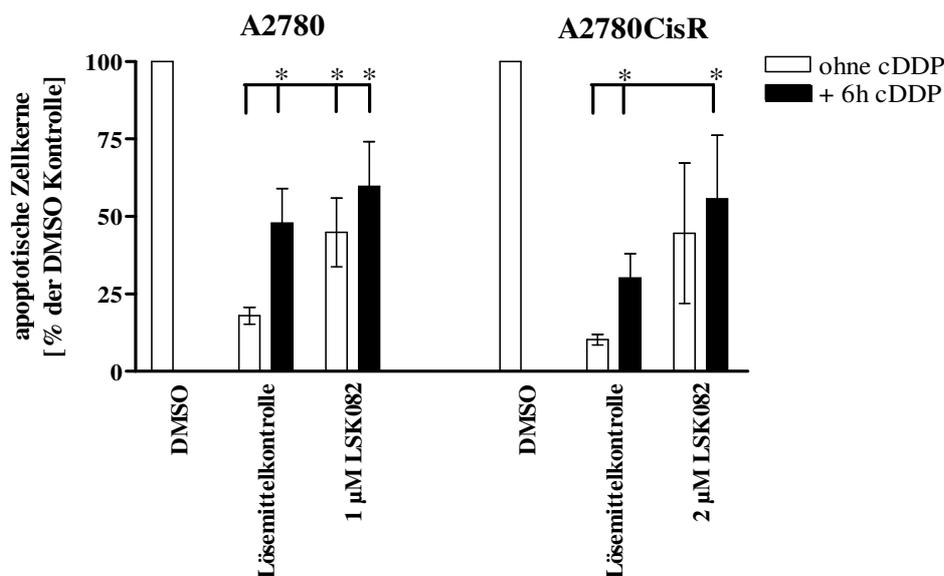


Abbildung 6.34 Apoptoseinduktion durch LSK082 in Kombination mit Cisplatin.

Die Zellen wurden entweder für insgesamt 78h mit LSK082 (ohne cDDP) oder 48h mit LSK082 präinkubiert, für 6h mit dem IC_{50} -Wert von Cisplatin inkubiert und anschließend für 24h weiterkultiviert (+6h cDDP). 10% DMSO für 24 Stunden wurde zum Auslösen von Apoptose verwendet und auf diese Apoptoseinduktion die restlichen Werte bezogen. Daten entsprechen dem Mittelwert \pm SEM von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede sind mit $*p < 0,05$ gekennzeichnet.

Da die Inkubationszeit erhöht wurde, mussten die eingesetzten Konzentrationen von LSK082 verringert werden. Auch hier kam es an beiden Zelllinien zur Induktion von Apoptose. Durch die Kombination von LSK082 mit Cisplatin kam es aber nicht zu einer stärkeren Induktion der Apoptose als durch Cisplatin oder LSK082 alleine.

Die LSK-Substanzen wurden ebenfalls verwendet um den Einfluss auf die Zellzyklusverteilung zu untersuchen. Das Ergebnis ist in Abbildung 6.35 gezeigt.

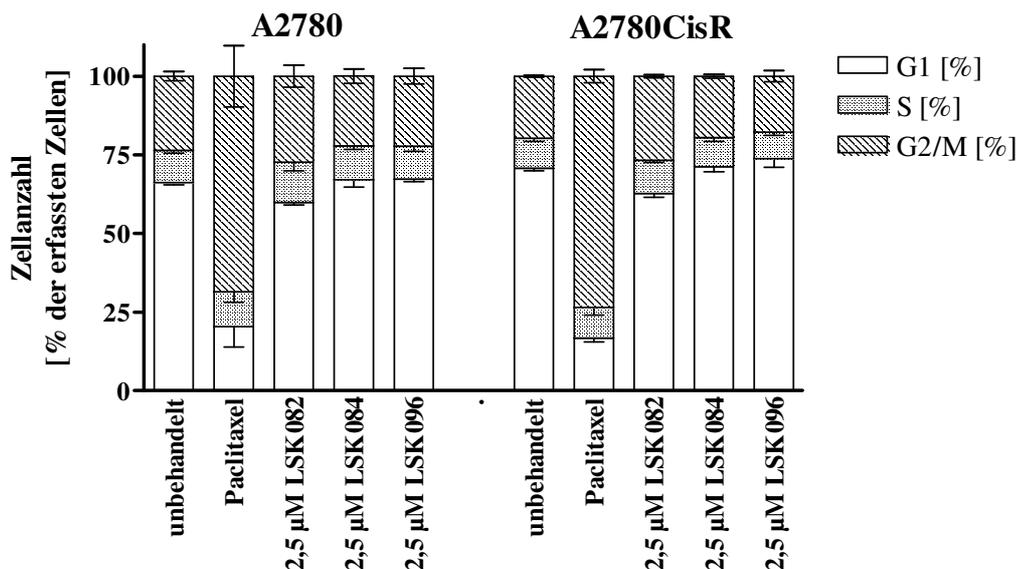


Abbildung 6.35 Einfluss der LSK-Substanzen auf die Zellzyklusverteilung der A2780 und A2780CisR.

A2780 und A2780CisR wurden für 48h mit LSK082, LSK084 oder LSK096 inkubiert und anschließend über Propidiumiodidfärbung der Zellzyklus bestimmt. Paclitaxel wurde als G₂/M-Kontrolle für 24h in einer Konzentration von 50 nM eingesetzt. Daten zeigen die Mittelwerte \pm SEM von mindestens 2 voneinander unabhängigen Experimenten.

Auch hier kam es durch den Einsatz der LSK-Substanzen zu keinem Arrest in einer Zellzyklusphase an den A2780 und A2780CisR Zellen. Die Experimente wurden einmalig auch an den Kyse510 Zellen durchgeführt. Hier war ebenfalls keine Änderung in der Zellzyklusverteilung durch den Einsatz der LSK-Substanzen zu detektieren.

Funktionalität der LSK-Substanzen

Da die LSK-Substanzen dafür konzipiert und synthetisiert wurden, um das HSP90-Protein zu hemmen [Ciglia et al., 2014, Spanier et al., 2014], wurden sie, wie die bekannten N-terminalen HSP90i, im Luciferase-Rückfaltungs-Assay getestet. Auch bei den LSK-Substanzen wurde zunächst getestet, ob die Substanzen nicht die aktive Luciferase inhibierten.

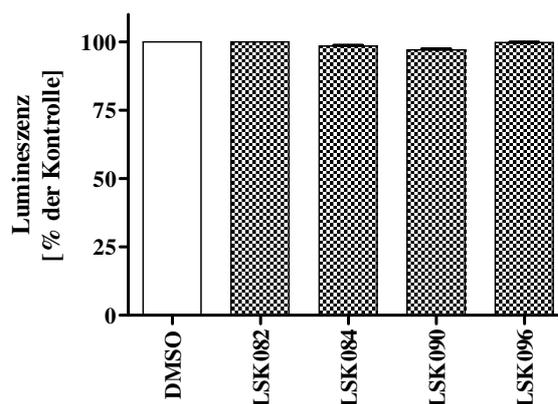


Abbildung 6.36 Die LSK-Substanzen hemmen die aktive Luciferase nicht.

Die LSK-Substanzen wurden für 2 Stunden (analog zum Vorgang beim Luciferase-Rückfaltungs-Assay, siehe Abbildung 6.28) mit der aktiven Luciferase inkubiert und anschließend die Lumineszenzintensität vermessen. Die Substanzen wurden in einer maximalen Konzentration von 479 μM für LSK090 und LSK096 und 240 μM für LSK082 und LSK084 eingesetzt. Daten entsprechen der gemessenen Lumineszenzintensität, prozentualisiert auf die Lösemittelkontrolle (DMSO) von einem Assay vermessen in Duplikaten.

Wie in Abbildung 6.36 gezeigt, kam es auch beim Einsatz der LSK-Substanzen zu keiner Hemmung an der aktiven Luciferase. Die Inhibition, die beim Luciferase-Rückfaltungs-Assay vermessen wurde, muss also über eine Inhibition der HSP90-Maschinerie laufen. Abbildung 6.37 zeigt die Konzentrations-Effekt-Kurven im Luciferase-Rückfaltungs-Assay der LSK-Substanzen.

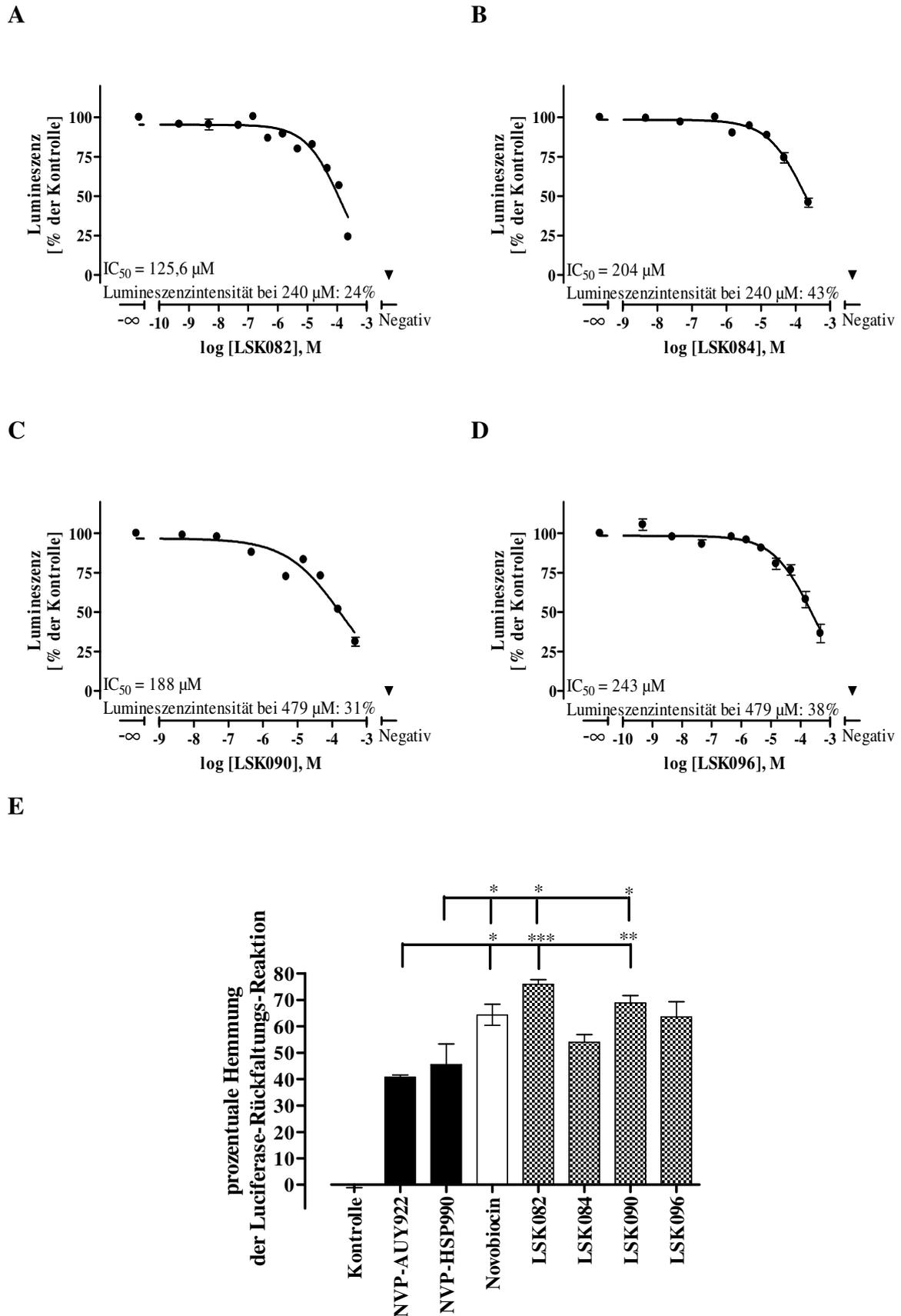


Abbildung 6.37 Ermittlung der inhibitorischen Aktivität gegenüber der HSP90-Maschinerie der LSK-Substanzen. Legende siehe S.125

Abbildung 6.37 Ermittlung der inhibitorischen Aktivität gegenüber der HSP90-Maschinerie der LSK-Substanzen.

A-D Die inhibitorische Aktivität der LSK-Substanzen wurde mittels Luciferase-Rückfaltungs-Assay bestimmt. Als HSP90-Quelle diente Kyse510 Zellysat. Negativ definiert die ablaufende Reaktion ohne HSP90-Quelle. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von mindestens 3 unabhängigen Versuchen in Triplikaten vermessen. Der IC_{50} -Wert ist im Graph angegeben, sowie die Lumineszenzintensität bei maximal eingesetzter Konzentration. **E** Maximale Hemmung der Luciferase-Rückfaltung beim Einsatz von 479 μ M NVP-AUY922, NVP-HSP990, Novobiocin, LSK090 oder LSK096 und 240 μ M LSK082 und LSK084 (wegen Löslichkeitsproblemen nur 240 μ M möglich). Graph zeigt Mittelwert \pm SEM von mindestens 3 unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Signifikante Unterschiede gekennzeichnet mit * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$.

Alle vier getesteten LSK-Substanzen zeigten eine Hemmung ähnlich dem Novobiocin, d.h. die Lumineszenzintensität sank mit steigender Konzentration bis zur maximal eingesetzten Konzentration. Da N-terminale HSP90i in dieser Arbeit (siehe Abbildung 6.30) und in der Literatur [Sadikot et al., 2013] im Luciferase-Rückfaltungs-Assay nur eine Hemmung von 40-50% aufwies, der C-terminale Inhibitor Novobiocin aber eine 100%ige Inhibition, könnte die 76%ige Hemmung von LSK082 auch über eine C-terminale Hemmung des HSP90-Proteins zustande kommen. Alle vier getesteten LSK-Substanzen wiesen IC_{50} -Werte in derselben Größenordnung auf. Im Vergleich zum C-terminalen Inhibitor Novobiocin, waren die IC_{50} -Werte etwas niedriger (LSK082 125,6 μ M, $pIC_{50} = 3,90 \pm 0,06$ vs. Novobiocin 382 μ M, $pIC_{50} = 3,42 \pm 0,08$). Beim Vergleich der erreichten maximalen Hemmungen der ablaufenden Reaktionen der LSK-Substanzen mit den bekannten HSP90i wurde deutlich, dass die maximale Hemmung sich signifikant von der der N-terminalen Inhibitoren unterschied, ebenso wie dies bei Novobiocin der Fall war (siehe Abbildung 6.37E). LSK082 zeigte die stärkste Hemmung der Luciferase-Rückfaltung, obwohl es aus Löslichkeitsgründen im Vergleich zu den anderen Inhibitoren (außer LSK084) in einer 2-fach verminderten Konzentration von 240 μ M eingesetzt wurde.

Durch den Luciferase-Rückfaltungs-Assay konnte also eine Hemmung am HSP90-Protein, bzw. an der HSP90-Maschinerie, festgestellt werden. Dieser Assay lieferte Hinweise für eine C-terminale Hemmung, da die Kurvenverläufe der LSK-Substanzen denen des Novobiocins hinsichtlich der Wirksamkeit ähnelten. Daher wurde ein weiterer Assay hinzugezogen, der die Dimerisierung des HSP90-Proteins untersuchen sollte. Dabei wurde dem Zellysat der Kyse510 Zellen ein aminoreaktiver Crosslinker zugesetzt, der in der Lage ist, Proteine kovalent miteinander zu verbinden. Somit können Di- oder Oligomere mittels eines Western Blots sichtbar gemacht werden. Yin et al. nutzten diese Methode um die Inhibition am C-Terminus durch Epigallocatechingallat zu zeigen [Yin et al., 2009]. Da in lebenden Zellen untersucht werden sollte, ob es zu einer Hemmung der Dimerisierung kam, wurden Kyse510 Zellen für 48 Stunden mit den entsprechenden HSP90i inkubiert.

Dafür wurden die potenteste Substanz LSK082, der C-terminale Inhibitor Novobiocin und der N-terminale Inhibitor NVP-AUY922 verwendet. Nach der 48-stündigen Inkubation mit den Substanzen und der Zellyse, wurden die Proben mit EGS vernetzt und anschließend mittels Western Blot untersucht. Zur Detektion des HSP90-Proteins wurde ein C-terminal spezifischer Antikörper verwendet. Abbildung 6.38A zeigt das Ergebnis.

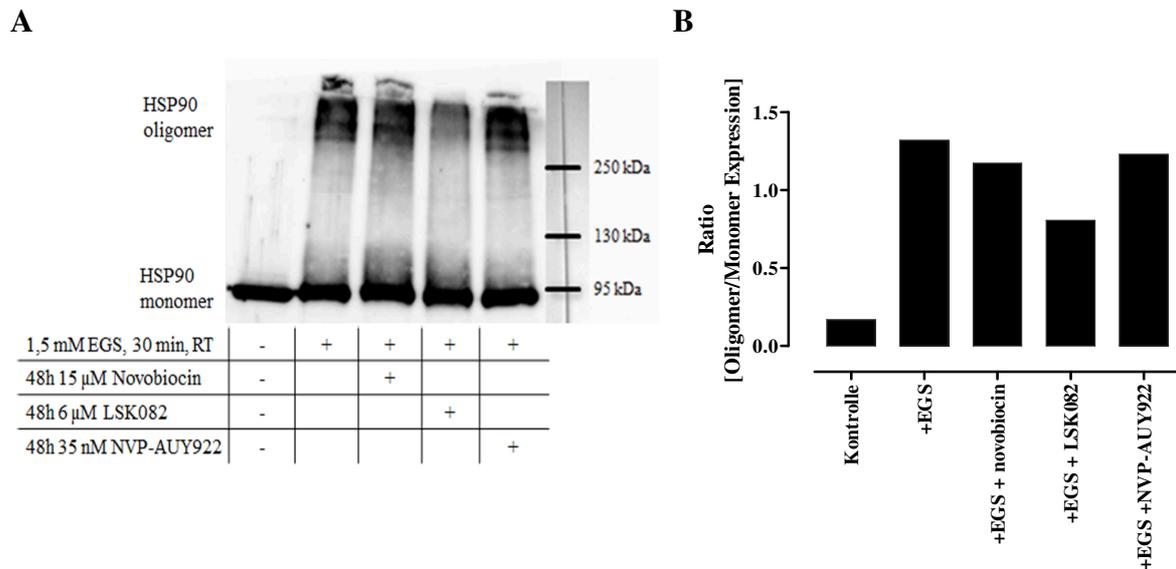


Abbildung 6.38 Inhibition der Oligomerisierung von HSP90.

A Detektion der HSP90-Expression ohne und mit Zusatz des Crosslinkers EGS. Die Kyse510 Zellen wurden vor der hypotonen Lyse für 48 Stunden mit Novobiocin, NVP-AUY922 oder LSK082 inkubiert. Es wurden 30 μ g Protein/Bande eingesetzt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. **B** Nach Auswertung des gezeigten Western Blots mit ImageJ wurde das Verhältnis der Oligomer zur Monomer Expression berechnet.

Durch das Crosslinken mit EGS wurden Oligomere im höheren kDa-Bereich sichtbar. Es war keine scharfe Bande als Dimer sichtbar, da im Zelllysate alle Cochaperone vorliegen und es nicht steuerbar ist, was alles vernetzt wird. Beim funktionalen HSP90-Protein bildet sich eine HSP90-Maschinerie, die außer dem Homodimer noch zahlreiche Cochaperone erfasst. Auch diese können durch das Quervernetzen erfasst werden und wurden somit bei der Western Blot Analyse sichtbar. Daher ergab sich bei 90 kDa eine deutliche Bande des HSP90-Monomers, die in allen Proben sichtbar war. Durch das Crosslinken wurden die HSP90-Oligomere sichtbar, die sich in einem Bereich größer als 250 kDa befanden. Es ergab sich hier keine klar definierte Bande sondern ein Bereich, der die Di- oder Trimere in Verbindung mit den Cochaperonen zeigte. Durch den Einsatz von LSK082 wurden die Banden im Oligomerbereich reduziert. Dies war beim Einsatz von NVP-AUY922 nicht sichtbar. NVP-AUY922 wurde hier als Negativkontrolle eingesetzt, da es die ATP-Bindestelle am N-Terminus als Angriffsort hat. Durch eine Auswertung mittels ImageJ wurde das Verhältnis von Oligomer zu Monomer berechnet (siehe Abbildung 6.38B).

Durch den Einsatz von Novobiocin kam es nur zu einer geringen Abnahme des Verhältnisses von Oligomer zu Monomer. Der Einsatz von LSK082 hingegen führte zu einer deutlichen Abnahme des Quotienten. LSK082 war also in der Lage die Oligomerisierung des HSP90-Proteins zu hemmen. Somit wurde auch in diesem Assay ein Hinweis erhalten, dass die LSK-Substanzen am C-Terminus des HSP90-Proteins wirken.

Da durch die N-terminalen HSP90i eine verminderte Expression der Klientproteine Akt und dessen Phosphorylierung festgestellt werden konnte (siehe Abbildung 6.20), wurde dies auch mit der potentesten Substanz LSK082 untersucht. Dafür wurden die A2780 und A2780CisR Zellen für 48 Stunden mit einer maximalen Konzentration von 100 μ M LSK082 inkubiert (siehe Abbildung 6.39). Das Auftreten von einigen Kristallen im Medium zeigte hier, dass das Löslichkeitsmaximum der Substanz LSK082 erreicht war. Beim Einsatz einer geringeren Konzentration war keine Beeinflussung der Akt-Expression oder dessen Phosphorylierung sichtbar.

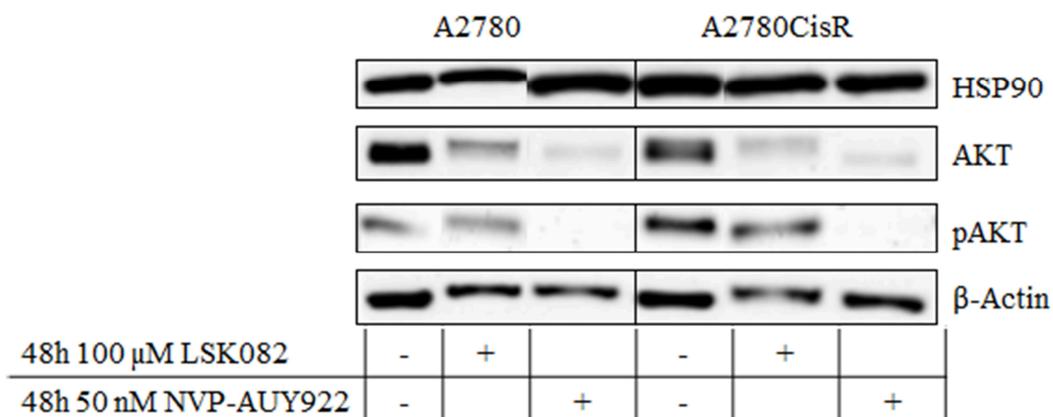


Abbildung 6.39 Herunterregulierung der Akt-Expression und dessen Phosphorylierung durch LSK082.

Die A2780 und A2780CisR Zellen wurden für 48h mit 100 μ M LSK082 oder 50 nM NVP-AUY922 inkubiert und anschließend die Proteine zur Bestimmung der Expression von HSP90, Akt und dessen Phosphorylierung gewonnen. β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Es wurden 25 μ g Protein/Bande eingesetzt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von 2 voneinander unabhängigen Experimenten.

Durch den Einsatz von NVP-AUY922 kam es zu einer deutlichen Abnahme der Akt-Expression sowie der Phosphorylierung, wie auch in Abbildung 6.20 zu sehen. Der Einsatz von LSK082 führte ebenfalls zu einer Abnahme der Akt-Expression und dessen Phosphorylierung in beiden Zelllinien. Dies bestätigte die Ergebnisse aus dem Luciferase-Rückfaltungs-Assay und dem Dimerisierungsassay. Die Substanz LSK082 zeigte also in allen durchgeführten Assays einen Einfluss auf das funktionelle HSP90-Protein und auch auf das nachgeschaltete Klientprotein Akt. Der Beweis, dass LSK082 die Protein-Protein-Interaktion bei der Dimerisierung des HSP90-Proteins inhibiert, konnte mit den verwendeten Assays jedoch nicht zweifelsfrei erbracht werden.

Weitere Wirkmechanismen der LSK-Substanzen

Die Wirkung auf die HSP90-Maschinerie bei den LSK-Substanzen lag im niedrigen dreistelligen μM -Bereich. Für den zytotoxischen Effekt ergaben sich deutlich geringere IC_{50} -Werte. Zwar ist dies auch bei den bekannten HSP90i zu beobachten (vergleiche Tabelle 6.6 und Abbildung 6.30), dennoch sollten bei den LSK-Substanzen andere Wirkmechanismen außer die HSP90-Hemmung untersucht werden. Zum einen wurde geprüft, ob die Substanzen in der Lage waren, die Membran zu schädigen. Dies wurde mittels einer Propidiumiodidfärbung durchgeführt, da PI nicht in der Lage ist, intakte Membranen zu passieren, sondern nur durch geschädigte Membranen in die Zelle gelangen kann. Um auszuschließen, dass die Membranschäden durch spätapoptotische Folgen entstanden sind, wurde gleichzeitig die Anzahl an apoptotischen Zellkernen bestimmt. Die Schädigung einer Membran erfolgt in der Regel schnell, daher wurden die A2780 Zellen für 6 Stunden mit den Substanzen inkubiert und im Folgenden die Membranintegrität sowie die Apoptoseinduktion bestimmt. Auch hier wurde vergleichend Novobiocin als C-terminaler HSP90i verwendet. Abbildung 6.40 zeigt die Ergebnisse.

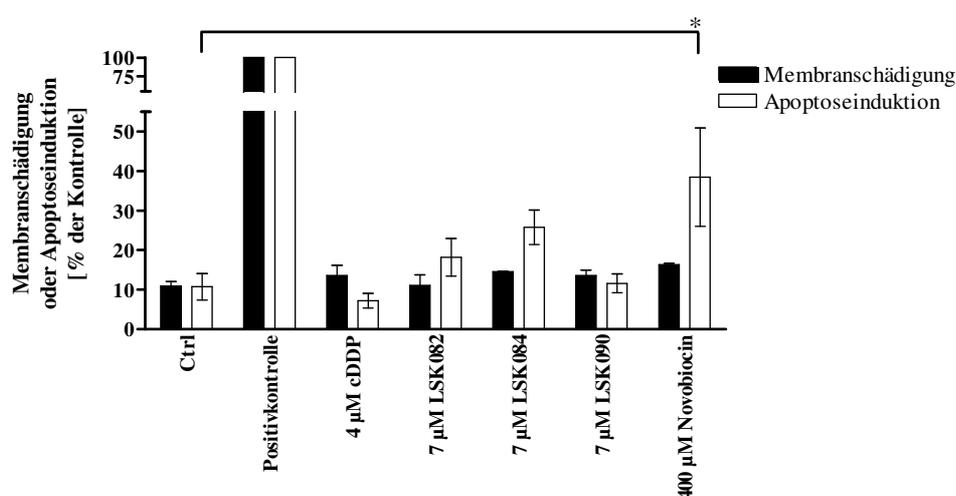


Abbildung 6.40 Membranschädigung im Vergleich zur Apoptoseinduktion an den A2780 Zellen durch die LSK-Substanzen und Novobiocin.

Die A2780 Zellen wurden für 6 Stunden mit den LSK-Substanzen, Novobiocin oder Cisplatin inkubiert und anschließend mittels PI-Färbung die Membranschädigung (schwarz ausgefüllte Balken) sowie die apoptotischen Kerne (offene Balken) vermessen. Als Positivkontrolle wurde für die Membranschädigung 0,2% Triton X-100 für 20 Minuten und für die Apoptose 10% DMSO verwendet. Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM von mindestens 2 voneinander unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede gekennzeichnet mit * für $p < 0,05$ gegen unbehandelte Kontrolle.

Von allen LSK-Substanzen wurde eine Konzentration von 7 μM verwendet um eine äquimolare Konzentration zu testen. Novobiocin wurde in einer Konzentration von 400 μM eingesetzt. Keine der untersuchten Substanzen konnte in den A2780 Zellen eine Membranschädigung induzieren. Durch Novobiocin kam es zu einer erhöhten

Apoptoseinduktion, die durch die hohe Novobiocin-Konzentration erklärbar war. Auch LSK082 und LSK084 induzierten Apoptose, jedoch war die Steigerung nicht signifikant. Eine Schädigung der Membran konnte somit als Wirkmechanismus für die LSK-Substanzen ausgeschlossen werden.

Zusätzlich wurde der Effekt der Substanzen auf das Mitochondrienpotential untersucht. Die Zellen wurden dafür mit TMRE angefärbt und die mittlere Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Inkubationsbedingungen ausgewertet. Der Entkoppler CCCP wurde als Positivkontrolle verwendet, da es durch den CCCP-Einsatz zu einem Zusammenbruch des Mitochondrienpotentials kommt. Zum besseren Vergleich mit dem Membranintegritätsassay wurden die A2780 Zellen ebenfalls für 6 Stunden mit den Substanzen inkubiert. Es wurden LSK082 und LSK090 getestet. Als Vergleich wurde auch Novobiocin eingesetzt. Abbildung 6.41 zeigt die Ergebnisse.

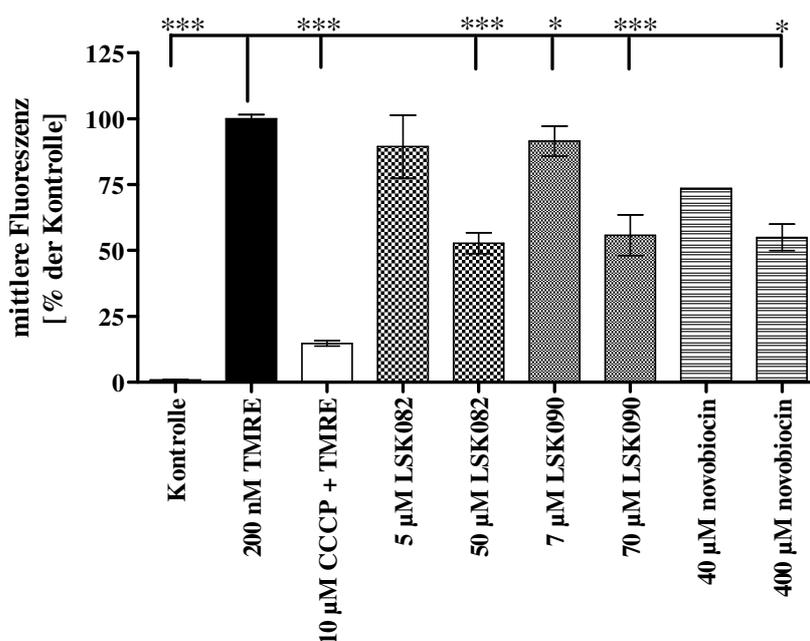


Abbildung 6.41 Bestimmung des Mitochondrienpotentials nach Inkubation mit LSK-Substanzen und Novobiocin.

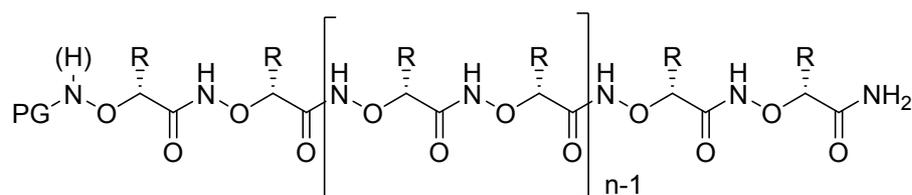
Die A2780 Zellen wurden für 6 Stunden mit LSK082, LSK090 und Novobiocin inkubiert und anschließend das Mitochondrienpotential nach Anfärben mit TMRE vermessen. Das Messfenster wurde durch 200 nM TMRE (entspricht vollständiger Anfärbung) und 10 µM CCCP für 50 Minuten inkubiert (entspricht dem Zusammenbruch des Mitochondrienpotentials) festgelegt. Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM von mindestens 2 voneinander unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede gekennzeichnet mit * für $p < 0,05$ und *** für $p < 0,001$ gegen TMRE Kontrolle.

Es wurden jeweils eine Konzentration und die 10-fache Konzentration davon eingesetzt. Von LSK082 konnten 7 µM nicht eingesetzt werden, da nicht mehr genügend LSK082 zur Verfügung stand, um anschließende Versuche durchzuführen. Daher wurde für LSK082 5 und 50 µM eingesetzt. Eine Steigerung der Konzentration der LSK-Substanzen sowie von Novobiocin induzierte immer eine Steigerung des Effekts. Durch den Einsatz der

höheren Konzentration kam es zu einer signifikanten Senkung des Mitochondrienpotentials durch LSK082 ($55,48 \pm 4,0\%$), LSK090 ($57,66 \pm 7,7\%$) und Novobiocin ($53,16 \pm 5,1\%$) im Vergleich zur Positivkontrolle. Jedoch konnte keine der eingesetzten Substanzen das Mitochondrienpotential auf das Niveau von CCCP ($14,53 \pm 1,1\%$) senken. Die LSK-Substanzen schienen also einen gewissen Effekt auf das Mitochondrienpotential aufzuweisen.

6.3.5.3 α -Aminoxyoligopeptide als HSP90i

α -Aminoxyoligopeptide können helikale Strukturen einnehmen [Diedrich et al., 2016b]. Es sollte untersucht werden, ob α -Aminoxyoligopeptide, die als C-terminale Inhibitoren des HSP90-Proteins entworfen wurden [Diedrich et al., 2016b, Bopp et al., 2016], in der Lage waren, tatsächlich das HSP90-Protein zu hemmen. 11 α -Aminoxyoligopeptide wurden im Arbeitskreis von Prof. Kurz synthetisiert. Darunter befanden sich 9 Hexamere und 2 Dekamere (siehe Abbildung 6.42). Als NH_2 -terminale Schutzgruppen wurden entweder Phthaloyl- (Phth) oder Carboxybenzylreste (Cbz) gewählt.



Hexamere

DDK38Phth	Phth- ^{NO} Ile- ^{NO} Ile- ^{NO} Ile- ^{NO} Ile- ^{NO} Leu- ^{NO} Leu-NH ₂
DDK51Phth	Phth- ^{NO} Leu- ^{NO} Leu- ^{NO} Ile- ^{NO} Ile- ^{NO} Phe- ^{NO} Phe-NH ₂
DDK51Cbz	Cbz- ^{NO} Leu- ^{NO} Leu- ^{NO} Ile- ^{NO} Ile- ^{NO} Phe- ^{NO} Phe-NH ₂
DDK77Cbz	Cbz- ^{NO} Ala- ^{NO} Phe- ^{NO} Ala- ^{NO} Leu- ^{NO} Ile- ^{NO} Ile-NH ₂
DDK78Cbz	Cbz- ^{NO} Ala- ^{NO} Phe- ^{NO} Phe- ^{NO} Ile- ^{NO} Ala- ^{NO} Leu-NH ₂
DDK88Cbz	Cbz- ^{NO} Phe- ^{NO} Phe- ^{NO} Ile- ^{NO} Ile- ^{NO} Leu- ^{NO} Leu-NH ₂
DDK89Cbz	Cbz- ^{NO} Tyr- ^{NO} Phe- ^{NO} Ile- ^{NO} Ile- ^{NO} Leu- ^{NO} Leu-NH ₂
DDK124Cbz	Cbz- ^{NO} Ile- ^{NO} Ile- ^{NO} Ile- ^{NO} Ile- ^{NO} Leu- ^{NO} Leu-NH ₂
DDK125Cbz	Cbz- ^{NO} Ala- ^{NO} Ile- ^{NO} Ala- ^{NO} Ile- ^{NO} Ala- ^{NO} Leu-NH ₂

Dekamere

DDK79Cbz	Cbz- ^{NO} Ala- ^{NO} Ile- ^{NO} Leu- ^{NO} Phe- ^{NO} Ala- ^{NO} Leu- ^{NO} Phe- ^{NO} Ile- ^{NO} Leu- ^{NO} Phe-NH ₂
DDK81Cbz	Cbz- ^{NO} Ala- ^{NO} Phe- ^{NO} Leu- ^{NO} Phe- ^{NO} Ala- ^{NO} Leu- ^{NO} Phe- ^{NO} Ile- ^{NO} Leu- ^{NO} Phe-NH ₂

Abbildung 6.42 Grundstruktur der DDK-Substanzen nach [Diedrich et al., 2016b].

Zytotoxische Effekte der α -Aminoxyoligopeptide

Zunächst wurde die Zytotoxizität über 72 Stunden an unterschiedlichen Karzinomzellen und HEK293 Zellen getestet. Tabelle 6.11 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 6.11 Zytotoxizität der DDK-Substanzen dargestellt als IC_{50} -Werte ($pIC_{50} \pm SEM$) bestimmt mittels MTT-Assay mit 72-stündiger Inkubation.

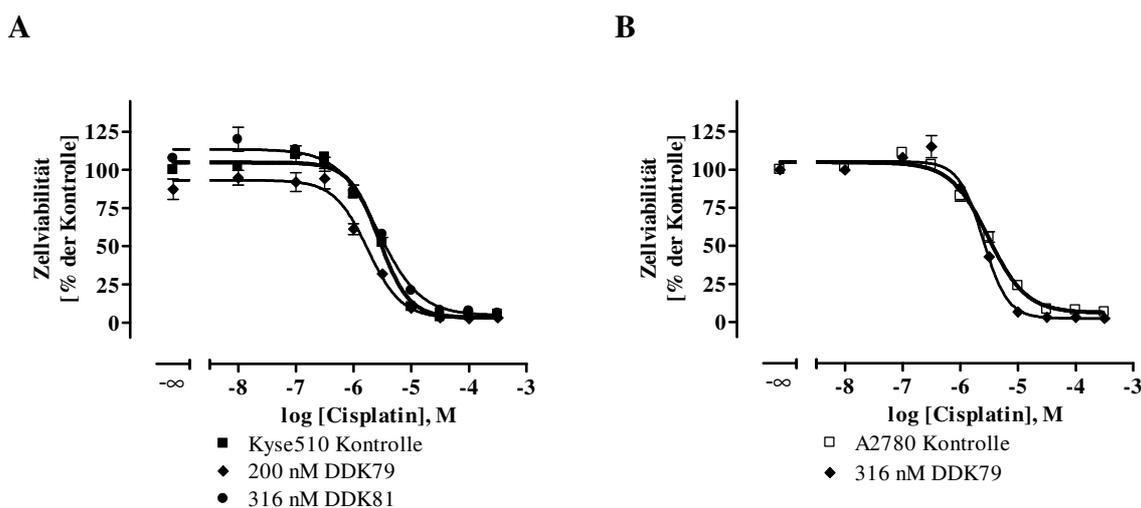
Gezeigte Daten sind der Mittelwert und $pIC_{50} \pm SEM$ von drei unabhängigen Experimenten vermessen in Triplikaten. † kennzeichnet eine Hemmung der Zellviabilität größer als 25% bei einer eingesetzten Konzentration von 100 μM .

Substanz	A2780sens [μM]	A2780CisR [μM]	Kyse sens [μM]	KyseCisR [μM]	HEK293 [μM]
Hexamere					
DDK38Phth	> 100 †	> 100 (< 4)	> 100 †	66,1 (4,18 \pm 0,09)	> 100 (< 4)
DDK51Phth	57,5 (4,24 \pm 0,06)	70,0 (4,16 \pm 0,04)	58,0 (4,24 \pm 0,03)	54,6 (4,26 \pm 0,03)	> 100 (< 4)
DDK51Cbz	7,53 (5,12 \pm 0,03)	8,93 (5,05 \pm 0,07)	5,71 (5,24 \pm 0,04)	7,79 (5,11 \pm 0,02)	20,2 (4,7 \pm 0,05)
DDK77Cbz	81,1 (4,09 \pm 0,02)	> 100 †	63,8 (4,2 \pm 0,04)	77,3 (4,11 \pm 0,03)	> 100 †
DDK78Cbz	55,0 (4,26 \pm 0,05)	60,9 (4,22 \pm 0,03)	40,2 (4,4 \pm 0,03)	52,4 (4,28 \pm 0,03)	84,0 (4,08 \pm 0,04)
DDK88Cbz	7,09 (5,15 \pm 0,05)	5,79 (5,24 \pm 0,05)	2,92 (5,53 \pm 0,07)	6,91 (5,16 \pm 0,05)	10,7 (4,97 \pm 0,05)
DDK89Cbz	14,2 (4,85 \pm 0,06)	21,1 (4,68 \pm 0,04)	7,27 (5,14 \pm 0,07)	14,0 (4,85 \pm 0,06)	22,1 (4,66 \pm 0,07)
DDK124Cbz	91,6 (4,04 \pm 0,09)	> 100 †	55,8 (4,25 \pm 0,04)	65,8 (4,18 \pm 0,07)	17,5 (4,76 \pm 0,08)
DDK125Cbz	> 100 †	> 100 †	> 100 (< 4)	> 100 (< 4)	> 100 (< 4)
Dekamere					
DDK79Cbz	3,30 (5,48 \pm 0,04)	1,67 (5,78 \pm 0,05)	1,40 (5,85 \pm 0,07)	2,57 (5,59 \pm 0,07)	8,97 (5,05 \pm 0,07)
DDK81Cbz	7,99 (5,1 \pm 0,06)	3,88 (5,41 \pm 0,03)	2,66 (5,58 \pm 0,04)	6,63 (5,18 \pm 0,09)	26,3 (4,58 \pm 0,05)

Es fiel auf, dass die beiden Dekamere generell geringere IC_{50} -Werte aufwiesen als die Hexamere. Die beiden Phthaloyl-geschützten Substanzen wiesen höhere IC_{50} -Werte als die Carboxybenzyl-geschützten Substanzen auf. Besonders deutlich wurde dies bei der Substanz DDK51, die sowohl Phthaloyl- als auch Carboxybenzyl-geschützt vorlag. Durch die Cbz-Schutzgruppe verringerte sich der IC_{50} -Wert in allen Zelllinien um mindestens das 5-fache. Weiter war auffällig, dass die Substanzen DDK79Cbz, DDK81Cbz und

DDK88Cbz eine höhere Zytotoxizität an den A2780CisR als den sensitiven A2780 Zellen aufwiesen. Die Ergebnisse an den HEK293 Zellen zeigten keine oder geringe Tumorselektivität.

DDK79Cbz und DDK81Cbz wurden weiterhin an Kyse510 und A2780 Zellen hinsichtlich der Beeinflussung der Cisplatinsensitivität untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.43 zusammengefasst.



C

Bedingung	Kyse510				A2780			
	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig
Kontrolle	2,79	5,55 ± 0,03	-	-	3,07	5,51 ± 0,03	-	-
DDK79Cbz	1,76	5,76 ± 0,05	1,6	**	2,49	5,60 ± 0,03	1,2	n.s.
DDK81Cbz	2,71	5,57 ± 0,05	1,0	n.s.	-	-	-	-

Abbildung 6.43 Einfluss von DDK79Cbz und DDK81Cbz auf die Cisplatinsensitivität von A2780 und Kyse510 Zellen.

DDK79Cbz oder DDK81Cbz wurden 48h vor der 72-stündigen Inkubation mit Cisplatin an Kyse510 (A) und A2780 (B) präinkubiert. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert ± SEM von mindestens 2 voneinander unabhängigen Experimenten in Triplikaten dar. C IC₅₀-Werte sowie pIC₅₀ ± SEM von den gezeigten Kurven. Sf ist der Shiftfaktor berechnet als Quotient aus dem Kontroll-IC₅₀-Wert der unbehandelten Zelllinie und der behandelten Zelllinie, sowie Signifikanzen gekennzeichnet mit ** für p<0,01. Nicht signifikante Unterschiede sind mit n.s. gekennzeichnet.

Es konnte kein signifikanter Einfluss durch den Einsatz der beiden Dekamere auf die Cisplatinsensitivität festgestellt werden. Bei höheren Konzentrationen von 300 nM DDK79Cbz oder 1 μM DDK81Cbz waren die Kyse510 Zellen bereits durch den alleinigen Einsatz der Inhibitoren abgestorben.

Untersuchung der Beeinflussung der DDK-Substanzen auf die HSP90-Inhibition

Die Substanzen wurden ebenfalls im Luciferase-Rückfaltungs-Assay getestet, um den Einfluss auf das HSP90-Protein zu untersuchen. Dafür wurde zunächst die Inhibition auf die aktive Luciferase untersucht. Abbildung 6.44 zeigt die Ergebnisse.

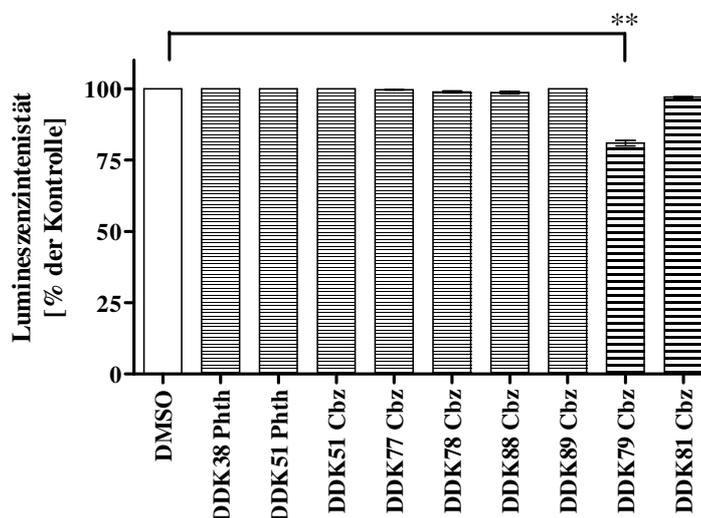


Abbildung 6.44 Außer DDK79Cbz hemmen die DDK-Substanzen die aktive Luciferase nicht.

Die DDK-Substanzen wurden für 2 Stunden (analog zum Vorgang beim Luciferase-Rückfaltungs-Assay) mit der aktiven Luciferase inkubiert und anschließend die Lumineszenzintensität vermessen. Die Substanzen wurden in einer maximalen Konzentration von 479 μM eingesetzt. Daten entsprechen der gemessenen Lumineszenzintensität, prozentualisiert auf die Lösemittelkontrolle (DMSO) von einem Assay vermessen in Duplikaten. Signifikante Unterschiede gekennzeichnet mit ** für $p < 0,01$.

Die DDK-Substanzen zeigten keinen Einfluss auf die aktive Luciferase mit Ausnahme von DDK79Cbz. Hier kam es zu einer geringfügigen Abnahme der Lumineszenzintensität auf 80,8% der Lösemittelkontrolle. Abbildung 6.45 fasst die Ergebnisse des Luciferase-Rückfaltungs-Assays der DDK-Substanzen zusammen.

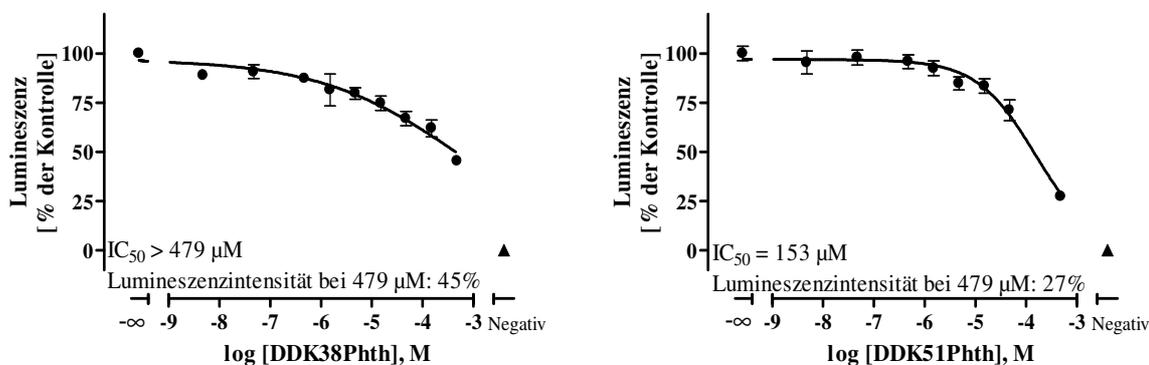


Abbildung 6.45 Ermittlung der inhibitorischen Aktivität gegenüber der HSP90-Maschinerie der DDK-Substanzen.

Legende siehe S. 135

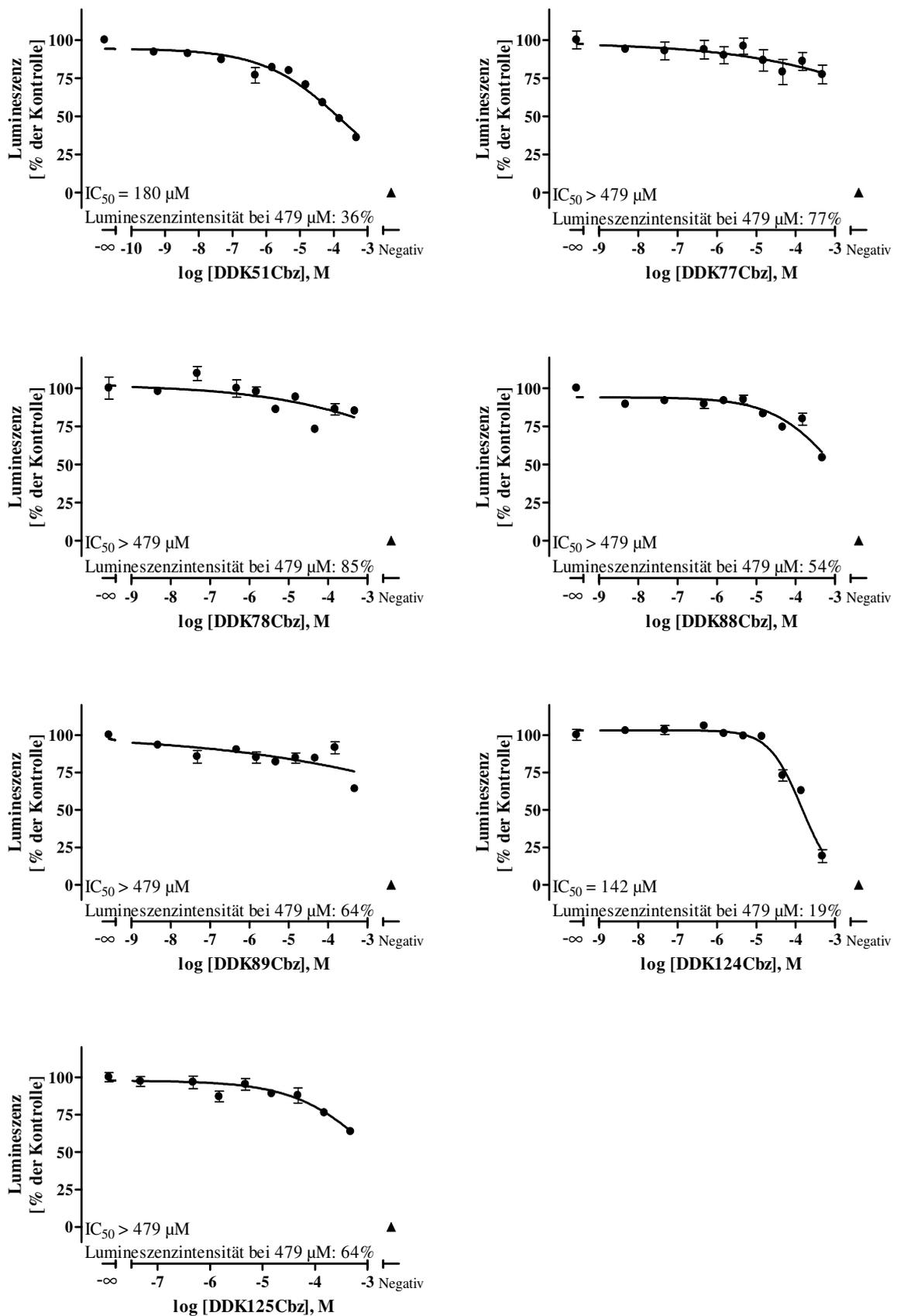


Abbildung 6.45 Ermittlung der inhibitorischen Aktivität gegenüber der HSP90-Maschinerie der DDK-Substanzen.

Legende siehe S. 135

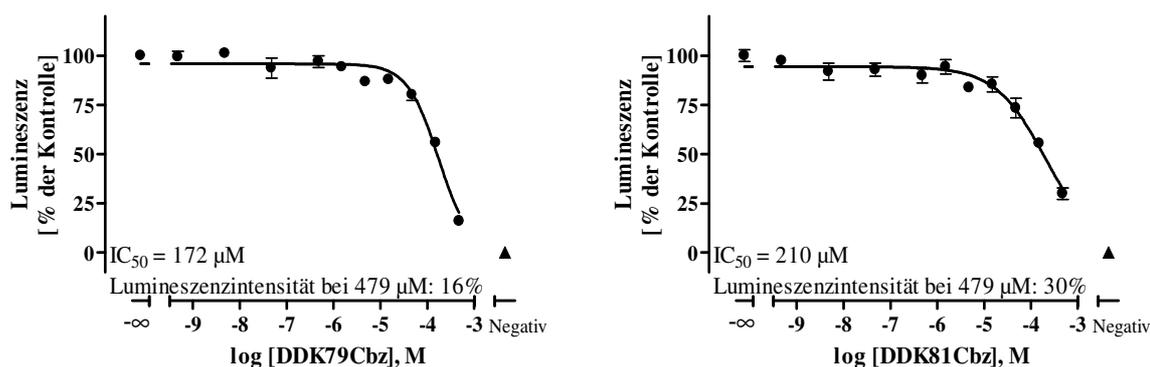


Abbildung 6.45 Ermittlung der inhibitorischen Aktivität gegenüber der HSP90-Maschinerie der DDK-Substanzen.

Die inhibitorische Aktivität der DDK-Substanzen wurde mittels Luciferase-Rückfaltungs-Assay bestimmt. Als HSP90-Quelle diente Kyse510 Zelllysate. Negativ definiert die ablaufende Reaktion ohne HSP90-Quelle. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von mindestens 2 unabhängigen Versuchen in Triplikaten vermessen. Der IC₅₀-Wert ist im Graph angegeben, sowie die Lumineszenzintensität bei maximal eingesetzter Konzentration.

Viele der getesteten Substanzen zeigten nur wenig Aktivität im Luciferase-Rückfaltungs-Assays. Die Hexamere DDK51Phth, DDK51Cbz und DDK124Cbz sowie die Dekamere DDK79Cbz und DDK81Cbz zeigten eine Hemmung der Luciferase-Rückfaltung. Die Kurvenverläufe sahen wie die von den LSK-Substanzen aus (siehe Abbildung 6.37). Dies würde ebenfalls auf eine C-terminale HSP90-Hemmung schließen lassen. DDK79Cbz hemmt direkt die aktive Luciferase um ca. 20% bei einer Konzentration von 479 µM (siehe Abbildung 6.44). Beim Luciferase-Rückfaltungs-Assay hemmte DDK79Cbz die Rückfaltung der Luciferase um 84%. Dies bedeutet, dass die Hemmung der aktiven Luciferase nicht alleine für die Abnahme der Lumineszenzintensität im Luciferase-Rückfaltungs-Assay verantwortlich sein kann. Folglich hemmt DDK79Cbz auch die HSP90-Maschinerie. Im Luciferase-Rückfaltungs-Assay war kein Zusammenhang zwischen der Struktur und der Aktivitäten sichtbar, da beide Dekamere ähnlich hohe IC₅₀-Werte wie die Hexamere aufwiesen. Ebenso war keine Änderung des IC₅₀-Wertes in Abhängigkeit der Schutzgruppe Phth oder Cbz bei DDK51 zu sehen. Die hier getesteten Substanzen konnten alle mit einer maximalen Konzentration von 479 µM eingesetzt werden, die weit über dem ermittelten zytotoxischen IC₅₀-Wert lag. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Zytotoxizität der DDK-Substanzen nur teilweise auf einer HSP90-Hemmung basiert.

Da DDK79Cbz die höchste Zytotoxizität aufwies und im Luciferase-Rückfaltungs-Assay mit 84% die stärkste Hemmung aufwies, wurde der Einfluss dieser Substanz auf das Oligomerisierungsverhalten des HSP90-Proteins an Kyse510 Zellen untersucht. Abbildung 6.46 zeigt das Ergebnis.

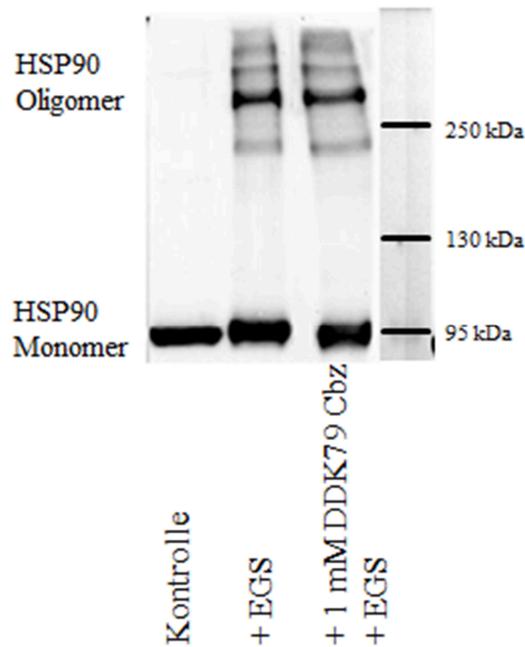


Abbildung 6.46 DDK79Cbz konnte die Oligomerisierung des HSP90-Protein nicht beeinflussen.

Detektion der HSP90-Expression ohne und mit Zusatz des Crosslinkers EGS. Das Zelllysat von Kyse510 Zellen wurde vor Zugabe des Crosslinker 2,5 Stunden mit 1 mM DDK79Cbz inkubiert. Es wurden 30 µg Protein/Bande eingesetzt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

Zum Einsatz kam das hypotone Lysat von Kyse510 Zellen. Dies wurde vor der Zugabe des Crosslinkers (1,5 mM EGS) für 2,5 Stunden mit 1 mM DDK79Cbz inkubiert, einer fast 6-fach höheren Konzentration als der IC_{50} -Wert im Luciferase-Rückfaltungs-Assay bestimmt (siehe Abbildung 6.45). Das HSP90-Monomer war in allen drei Proben gut zu sehen. Durch das Crosslinken wurden auch die Oligomere bei höheren Größen sichtbar. Auch hier waren wieder mehrere Banden sichtbar, was durch die Cochaperone des HSP90-Proteins erklärbar ist. Durch den Einsatz von DDK79Cbz kam es aber zu keiner veränderten Intensität der Oligomer-Banden. Sowohl die schwache Bande bei ca. 180 kDa, als auch die stärkere Bande bei ca. 280 kDa und die folgenden Banden darüber blieben unbeeinflusst. Unter diesen Bedingungen zeigte DDK79Cbz folglich keinen Einfluss auf die Oligomerisierung des HSP90-Proteins, obwohl die hier eingesetzte Konzentration deutlich über dem IC_{50} -Wert im Luciferase-Rückfaltungs-Assay lag.

Weitere Wirkmechanismen von DDK-Substanzen

Der ermittelte zytotoxische Effekt der DDK-Substanzen schien nicht ausschließlich über das HSP90-Protein vermittelt zu sein. Zum einen begründet sich diese Aussage über die weitaus höheren IC_{50} -Werte für die Hemmung des HSP90-Proteins, zum anderen

korrelierte die Reihenfolge der Potenz der Zytotoxizität nicht mit der auf die HSP90-Hemmung. Da die beiden längeren Dekamere DDK79Cbz und DDK81Cbz in allen Zelllinien die höchste Zytotoxizität aufwiesen, wurde ein weiterer Wirkmechanismus für die Substanzen vermutet. Gavenonis et al [Gavenonis et al., 2014] zeigten, dass Peptide mit helikaler Struktur teilweise membranolytische Effekte aufweisen. Für die DDK-Substanzen wurde eine 2_8 -helikale Konformation bestätigt [Diedrich et al., 2016b], die möglicherweise für eine membranolytische Schädigung sprechen würde. Daher wurde vor allem für die Dekamere die Membranintegrität untersucht. Um unterscheiden zu können, ob die Färbung mit PI auf einer Schädigung der Zellmembran beruht oder auf spätapoptotischen Folgen, wurde die Membranintegrität zeitgleich mit der Apoptose vermessen. Die Kyse510 Zellen wurden dafür 24 Stunden mit den Substanzen inkubiert und anschließend die Membranschädigung und die Apoptoseinduktion vermessen. Das Ergebnis ist in Abbildung 6.47 gezeigt.

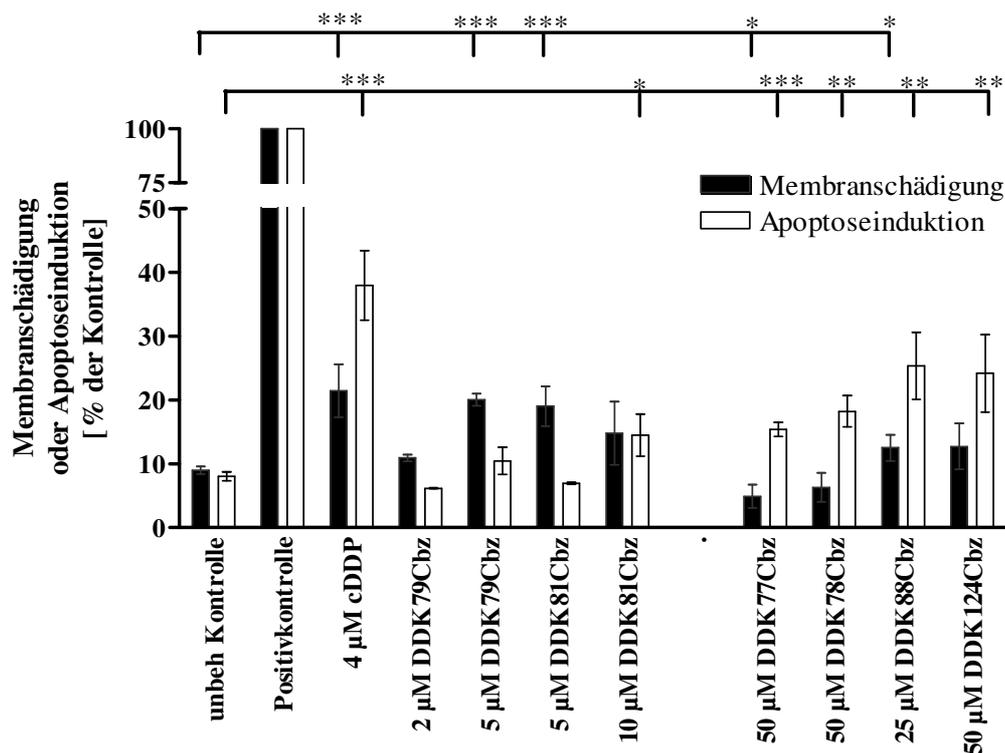


Abbildung 6.47 Membranschädigung im Vergleich zur Apoptoseinduktion an den Kyse510 Zellen durch ausgewählte DDK-Substanzen.

Kyse510 wurden für 24h mit den DDK-Substanzen oder Cisplatin inkubiert und anschließend mittels PI-Färbung die Membranschädigung (schwarz ausgefüllte Balken) sowie die apoptotischen Kerne (offene Balken) vermessen. Als Positivkontrolle wurden für die Membranschädigung 0,2% Triton X-100 für 20 Minuten und für die Apoptose 24h 10% DMSO eingesetzt. Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede gekennzeichnet mit * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$.

Die Dekamere verursachten deutlich mehr Membranschädigung als die Hexamere. Für die Dekamere wurden dafür die doppelten und 3,5-fachen IC_{50} -Werte der Zytotoxizität eingesetzt. Bei den Hexameren wurde eine Konzentration von 50 μ M eingesetzt, mit Ausnahme von DDK88Cbz. Diese Substanz wies einen geringeren IC_{50} -Wert an den Kyse sens Zellen auf im Vergleich zu den anderen getesteten Hexameren. Daher wurden von DDK88Cbz nur 25 μ M eingesetzt. Die hohe eingesetzte Konzentration der Hexamere (25 oder 50 μ M) sollte sicherstellen, einen Effekt zu sehen, was bei der Analyse der Apoptoseinduktion der Fall war. Ebenfalls wurde die IC_{50} -Konzentration von Cisplatin als Vergleich eingesetzt. Hier wurde deutlich, dass Cisplatin innerhalb von 24 Stunden deutlich mehr Apoptose (AP: $37,96 \pm 3,66$ %) als Membranschädigung (MI: $24,46 \pm 2,99$ %) auslöste. Dies ist durch den Wirkmechanismus von Cisplatin zu erklären. Es wurde deutlich, dass die Dekamere mehr Membranschädigung auslösen (MI: 5 μ M DDK79Cbz: $20,1 \pm 1,3$ %; 5 μ M DDK81Cbz: $19,1 \pm 2,1$ %), die nicht durch die Apoptoseinduktion erklärbar war (AP: 5 μ M DDK79Cbz: $10,5 \pm 2,1$ %; 5 μ M DDK81Cbz: $6,9 \pm 0,5$ %). Bei den Hexameren war dieses Bild revertiert. Es wurde deutlich mehr Apoptose vermessen als Membranschäden (z.B. mit 25 μ M DDK88Cbz MI $12,5 \pm 1,9$ % vs. AP $25,4 \pm 3,0$ %). Dies sprach dafür, dass die DDK-Substanzen eine gewisse Anzahl an Monomeren benötigen, um die Membran zu schädigen. Die bei den Dekameren beobachtete Schädigung der Membran könnte eine Erklärung für die Zytotoxizität sein. Zusätzlich erklären diese Befunde, warum keine unterschiedliche Wirkung an den sensitiven und resistenten Subklonen zu beobachten war und die Reihenfolge der zytotoxischen Potenz nicht mit der der HSP90-Inhibition korrelierte. Diese Daten sind Teile der Publikation [Diedrich et al., 2016b].

6.4 Kombinationen von Inhibitoren zur Beeinflussung der Cisplatinsensitivität

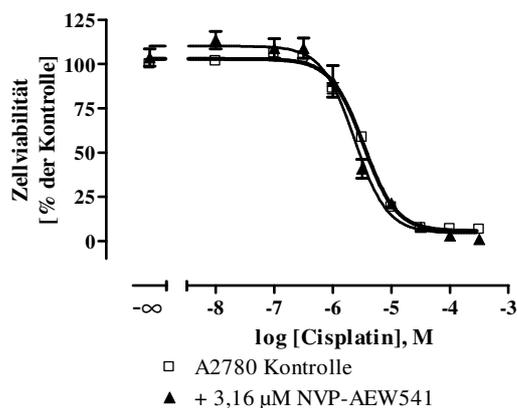
Die Standardtherapie des Ovarialkarzinoms besteht aus einer Kombination aus Carboplatin mit Paclitaxel. Der Ansatz, unterschiedliche Wirkmechanismen zur Erhöhung der Wirksamkeit auszunutzen, findet in der Therapie des Ovarialkarzinoms bereits einen breiten Einsatz [Bukowska et al., 2015]. In der Klinik kann dies oft zu einer Senkung der eingesetzten Konzentration und auch der unerwünschten Nebenwirkungen führen. Dieser Ansatz wurde in vorliegender Arbeit in Bezug auf die Erhöhung der Cisplatinsensitivität untersucht.

6.4.1 HSP90i mit IGF-1R-Modulatoren

Die Generierung einer resistenten Zelllinie A2780CisR zeigte, dass der IGF-1R in den A2780CisR überexprimiert war im Vergleich zu den sensitiven A2780 Zellen [Eckstein et al., 2009]. Der Einsatz des IGF-1R-Inhibitors NVP-AEW541 wurde daher getestet. Der IC_{50} -Wert über eine 72-stündige Inkubationszeit lag an den A2780 bei $5,39 \mu\text{M}$ ($pIC_{50} = 5,27 \pm 0,05$) und an den A2780CisR bei $4,02 \mu\text{M}$ ($pIC_{50} = 5,40 \pm 0,12$).

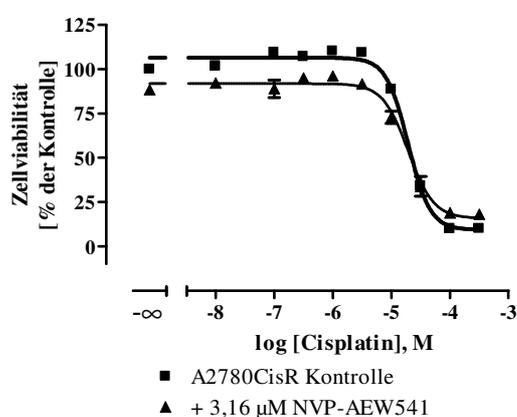
An den Ovarialkarzinomzellen wurde NVP-AEW541 eingesetzt, um den Einfluss auf die Cisplatinsensitivität zu untersuchen. Abbildung 6.48 stellt die Ergebnisse dar.

A



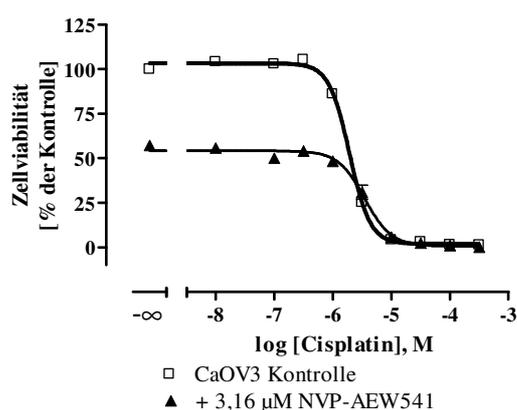
A2780				
Bedingungen	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig
Kontrolle	3,34	5,48 ± 0,02	-	-
NVP-AEW541	2,35	5,63 ± 0,05	1,4	**

B



A2780CisR				
Bedingungen	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig
Kontrolle	19,7	4,71 ± 0,02	-	-
NVP-AEW541	16,8	4,78 ± 0,04	1,2	n.s.

C



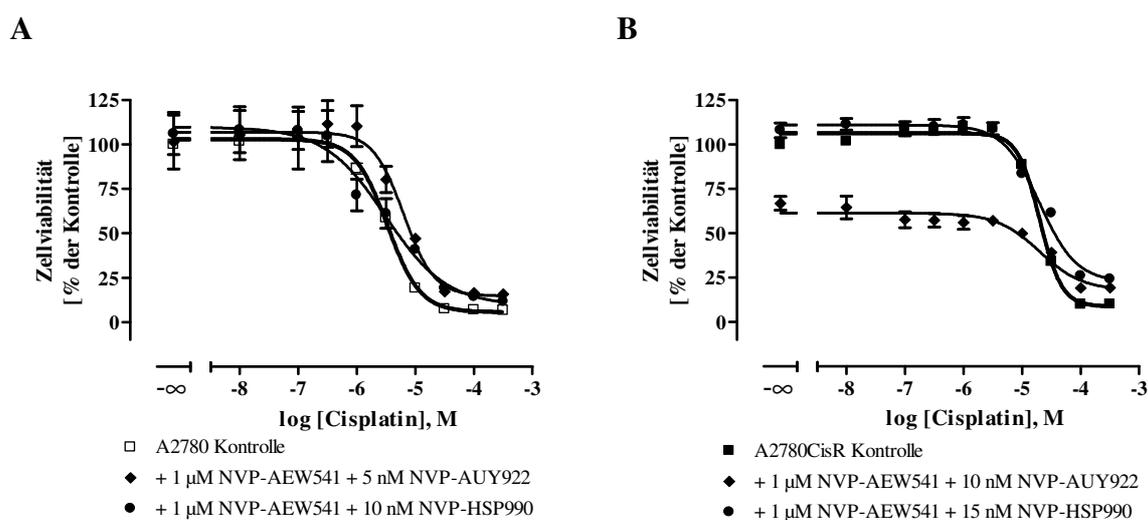
CaOV3				
Bedingungen	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig
Kontrolle	1,93	5,72 ± 0,01	-	-
NVP-AEW541	3,50	5,46 ± 0,04	0,6	***

Abbildung 6.48 Einfluss von NVP-AEW541 auf die Cisplatinempfindlichkeit von A2780, A2780CisR und CaOV3.

NVP-AEW541 wurde 48h vor der 72-stündigen Cisplatinbehandlung an A2780 (A), A2780CisR (B) oder CaOV3 (C) präinkubiert. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert ± SEM von mindestens 2 voneinander unabhängigen Experimenten in Triplikaten dar. Die Tabellen zeigen IC₅₀-Werte sowie pIC₅₀ ± SEM. Sf ist der Shiftfaktor berechnet als Quotient aus dem Kontroll-IC₅₀-Wert der unbehandelten Zelllinie und der behandelten Zelllinie, sowie Signifikanzen gekennzeichnet mit ** für p<0,01 und *** für p<0,001. Nicht signifikante Unterschiede sind mit n.s. gekennzeichnet.

An den A2780 kam es durch den Einsatz von 3,16 μM NVP-AEW541 für 48 Stunden vor der Cisplatininkubation zu einer leichten Erhöhung der Cisplatinempfindlichkeit. Bei den A2780CisR wurde keine Beeinflussung der Cisplatinempfindlichkeit festgestellt. An den CaOV3 Zellen führte der Einsatz von NVP-AEW541 zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Cisplatin.

Der IGF-1R-Inhibitor NVP-AEW541 wurde mit den beiden N-terminalen HSP90i NVP-AUY922 und NVP-HSP990 an den A2780 und A2780CisR Zellen kombiniert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.49 gezeigt.



C

Bedingung	A2780				A2780CisR			
	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ \pm SEM	Sf	Sig	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ \pm SEM	Sf	Sig
Kontrolle	3,34	5,48 \pm 0,02	-	-	19,7	4,71 \pm 0,02	-	-
NVP-AEW541 + NVP-AUY922	6,30	5,20 \pm 0,11	0,5	***	29,1	4,54 \pm 0,17	0,7	n.s.
NVP-AEW541 + NVP-HSP990	3,12	5,51 \pm 0,17	1,1	n.s.	24,2	4,62 \pm 0,06	0,8	n.s.

Abbildung 6.49 Einfluss von NVP-AEW541 in Kombination mit den N-terminalen HSP90i auf die Cisplatinempfindlichkeit von A2780 und A2780CisR.

NVP-AEW541 und die HSP90i wurden 48h vor der 72-stündigen Cisplatinbehandlung an A2780 (A) oder A2780CisR (B) präinkubiert. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert \pm SEM von mindestens 2 voneinander unabhängigen Experimenten in Triplikaten dar. C IC₅₀-Werte sowie pIC₅₀ \pm SEM von den gezeigten Kurven. Sf ist der Shiftfaktor berechnet als Quotient aus dem Kontroll-IC₅₀-Wert der unbehandelten Zelllinie und der behandelten Zelllinie, sowie Signifikanzen gekennzeichnet mit *** für p<0,001. Nicht signifikante Unterschiede sind mit n.s. gekennzeichnet.

In beiden Zelllinien war ein leichte, nicht signifikante Erhöhung des IC₅₀-Wertes von Cisplatin zu sehen, außer bei der Kombination von NVP-AEW541 mit NVP-HSP990 an den A2780 Zellen. Bei der Kombination der HSP90i mit NVP-AEW541 war auffällig, dass der positive Effekt auf die Cisplatinempfindlichkeit, der durch die HSP90i alleine ausgelöst

wurde (siehe Abbildung 6.15), durch NVP-AEW541 rückgängig gemacht wurde. Sowohl die HSP90i als auch der IGF-1R-Inhibitor greifen in den PI3K-Signaltransduktionsweg ein. Obwohl durch die Kombination der unterschiedlichen Inhibitoren ein synergistischer Effekt aufgrund des Wirkmechanismus denkbar wäre, wurde keine Verbesserung des Effektes an den A2780 Zellen gesehen.

Da die Expression des IGF-Rezeptors während der Resistenzentwicklung anstieg [Eckstein et al., 2009], wurde untersucht, ob der Einsatz von NVP-AEW541 während der Resistenzentwicklung eine Ausbildung der Resistenz verhindern kann. Dafür wurden die A2780 Zellen dauerhaft mit 1 μM NVP-AEW541 in Kultur gehalten und die Zellen wöchentlich mit 3,5 μM Cisplatin für 6 Stunden behandelt. Abbildung 6.50 zeigt das Ergebnis. Auch hier sind wieder die Resistenzentwicklung ohne einen weiteren Zusatz (A2780CisR_{neu}) sowie die unbehandelten A2780 Zellen gezeigt (vergleiche Abbildung 6.7).

A

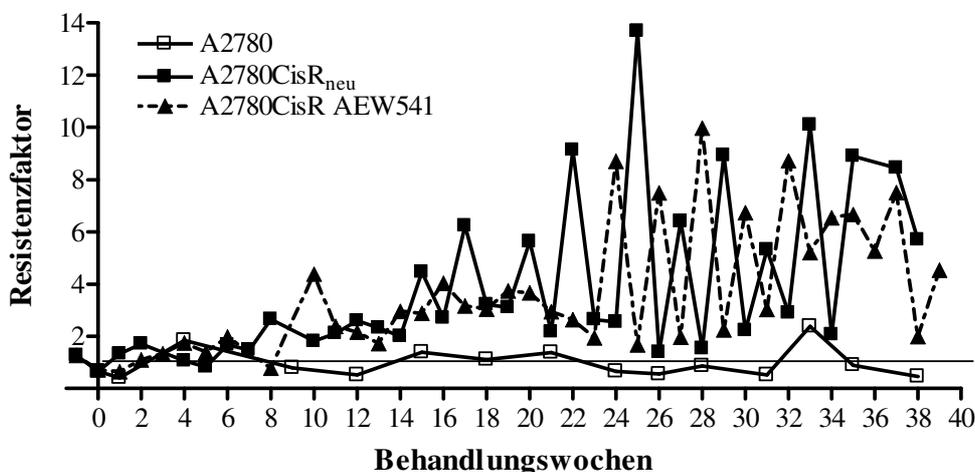


Abbildung 6.50 Resistenzentwicklung an den A2780 Zellen unter dem Einsatz von NVP-AEW541.

Legende s. S. 143

B

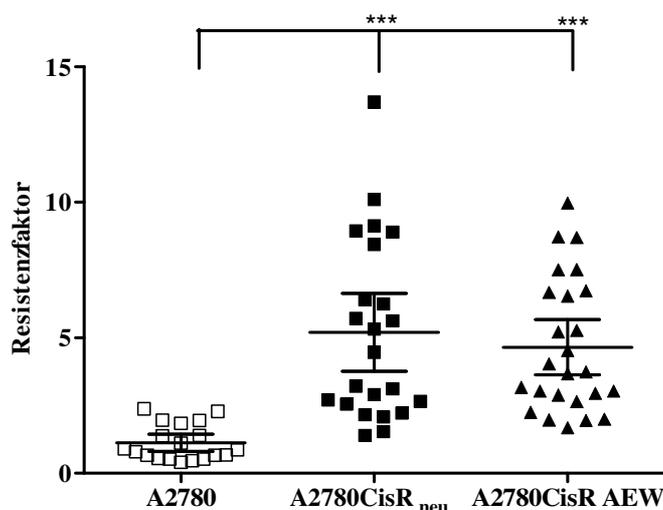


Abbildung 6.50 Resistenzentwicklung an den A2780 Zellen unter dem Einsatz von NVP-AEW541.

A A2780 Zellen wurden wöchentlich mit Cisplatin in einer IC_{50} -Konzentration behandelt, entweder ohne weiteren Zusatz (A2780CisR_{neu}) oder unter permanenter Anwesenheit von 1 μ M NVP-AEW541 (A2780CisR AEW541). Nach 34 Wochen wurde die wöchentliche Behandlung mit Cisplatin beendet. Parallel wurden IC_{50} -Werte der unbehandelten A2780Zellen zur Verlaufskontrolle bestimmt (A2780). Der Mittelwert der Verlaufskontrolle wurde verwendet um den Resistenzfaktor als Quotient der IC_{50} -Werte aus behandelter Zelllinie und unbehandelter Kontrolle zu berechnen. Dieser ist im Graphen gegen die Behandlungswochen aufgetragen. Die Gerade kennzeichnet einen Resistenzfaktor von 1, d.h. keine Veränderung im IC_{50} -Wert. **B** Gruppierung der Resistenzfaktoren ab der 22. Behandlungswoche der unterschiedlich behandelten Kinetiken. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM der Resistenzfaktoren. Signifikante Unterschiede zu A2780 sind gekennzeichnet mit *** für $p < 0,001$. Alle Datensätze sind normalverteilt (D'Agostino & Pearson normality test, Graph Pad Prism).

Es wurde deutlich, dass selbst der frühe Einsatz von NVP-AEW541 die Entwicklung einer Resistenz gegenüber Cisplatin nicht verhindern konnte. Der zeitliche Verlauf der Resistenzfaktoren in An- oder Abwesenheit von NVP-AEW541 ist ähnlich. Die Zellen wurden dabei 36 Mal mit Cisplatin behandelt. Gemittelt über die letzten 22 Wochen ergab sich für A2780CisR AEW ein IC_{50} -Wert von 10,1 μ M ($pIC_{50} = 5,00 \pm 0,05$). Damit lag der IC_{50} -Wert am Endpunkt genauso hoch wie bei der resistenten Zelllinie. Es ergab sich ein finaler Resistenzfaktor von 4,7 über die letzten 22 Wochen. Der Unterschied zur Resistenzentwicklung ohne Zusatz eines Inhibitors (A2780CisR_{neu}) war statistisch nicht signifikant.

6.4.2 HSP90i mit PI3K-Modulatoren

Einige der Klientproteine des HSP90-Proteins sind im PI3K/Akt-Signalweg vertreten. Hierbei handelt es sich nicht nur um Akt, dessen Regulierung durch HSP90i bereits gezeigt wurde, sondern auch um mTOR. Ferner weist der PI3K/Akt-Signalweg in Karzinomzellen häufig Mutationen und Dysregulationen auf [Li et al., 2014]. NVP-BEZ235 ist ein Inhibitor, der in diesen Signalweg an zwei Stellen eingreift. Es handelt sich um einen dualen PI3K und mTOR-Inhibitor, der bei Konzentrationen kleiner 100 nM hauptsächlich

mTOR inhibiert und bei höheren Konzentrationen zusätzlich PI3K hemmt [Serra et al., 2008]. So sollte durch die Kombination von NVP-BEZ235 mit HSP90i der Effekt auf die Cisplatinsensitivität verstärkt werden.

Dafür wurden zunächst die IC_{50} -Werte von NVP-BEZ235 an den Ovarialkarzinomzelllinien sowie an HEK293 über 72 Stunden bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.12 zu sehen.

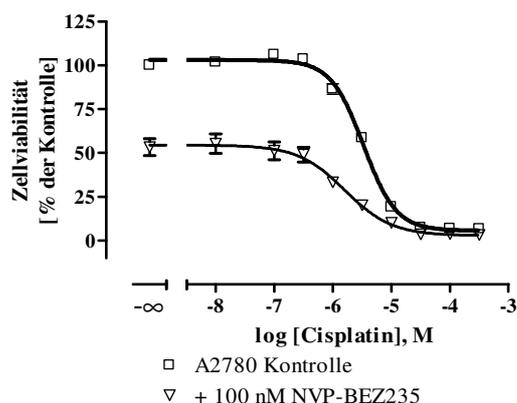
Tabelle 6.12 Zytotoxizität von NVP-BEZ235 dargestellt als IC_{50} -Wert und $pIC_{50} \pm SEM$ bestimmt mittels MTT-Assay mit 72-stündiger Inkubation an unterschiedlichen Zelllinien.

Gezeigt sind Mittelwert \pm SEM von mindestens 2 Versuchen in Triplikaten durchgeführt.

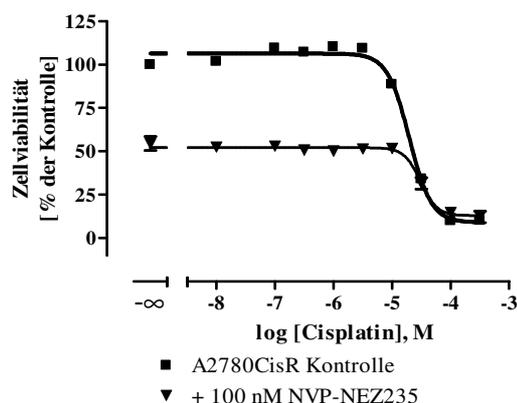
Zelllinie	IC_{50} [nM]	$pIC_{50} \pm SEM$
A2780	23,9	$7,62 \pm 0,07$
A2780CisR	20,8 nM	$7,68 \pm 0,04$
CaOV3	4,85 nM	$8,31 \pm 0,06$
CaOV3CisR	14,2 nM	$7,85 \pm 0,08$
OVCAR3	75,3	$7,12 \pm 0,04$
OVCAR3CisR	113	$6,95 \pm 0,04$
HEK293	29,8	$7,53 \pm 0,01$

Bei den CaOV3 und OVCAR3 Zellen war NVP-BEZ235 an den sensitiven Zellen zytotoxischer als an den resistenten Zellen. Besonders an den CaOV3 Zellen zeigte sich eine hohe Zytotoxizität mit einem IC_{50} -Wert von 4,85 nM. Eine Präferenz für Tumorzellen konnte durch die HEK293 Zellen nicht gezeigt werden, da die IC_{50} -Werte an den HEK293 Zellen in derselben Größenordnung wie von den Karzinomzellen lagen. Abbildung 6.51 fasst die Ergebnisse zum Einfluss des dualen PI3K/mTOR-Inhibitor auf die Cisplatinsensitivität an den Ovarialkarzinomzellen zusammen.

A



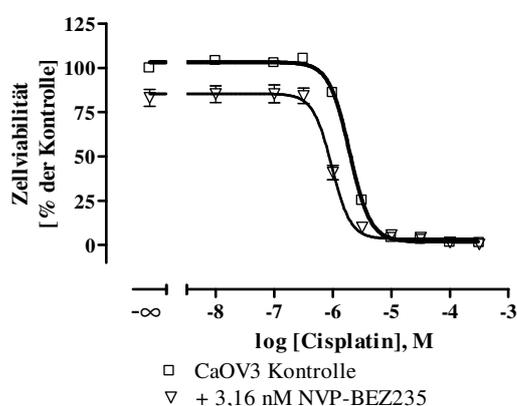
B



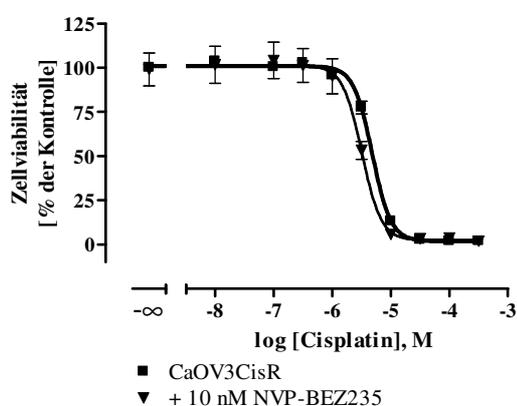
C

Bedingung	A2780				A2780CisR			
	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig
Kontrolle	3,34	5,48 ± 0,02	-	-	19,7	4,71 ± 0,02	-	-
NVP-BE2235	1,61	5,79 ± 0,09	2,1	**	30,65	4,51 ± 0,04	0,6	*

D



E



F

Bedingung	CaOV3				CaOV3CisR			
	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig
Kontrolle	1,92	5,72 ± 0,01	-	-	4,80	5,32 ± 0,02	-	-
NVP-BE2235	0,96	6,02 ± 0,03	2,0	***	3,21	5,49 ± 0,05	1,5	***

Abbildung 6.51 Einfluss von NVP-BE2235 auf die Cisplatinempfindlichkeit von A2780, A2780CisR, CaOV3 und CaOV3CisR.

NVP-BE2235 wurde 48h vor der 72-stündigen Cisplatinbehandlung an A2780 (A), A2780CisR (B), CaOV3 (D) oder CaOV3CisR (E) präinkubiert. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert ± SEM von mindestens 2 voneinander unabhängigen Experimenten in Triplikaten dar. C, F IC₅₀-Werte sowie pIC₅₀ ± SEM von den gezeigten Kurven. Sf ist der Shiftfaktor berechnet als Quotient aus dem Kontroll-IC₅₀-Wert der unbehandelten Zelllinie und der behandelten Zelllinie, sowie Signifikanzen gekennzeichnet mit * für p<0,05, ** für p<0,01 und *** für p<0,001.

Der Einsatz von NVP-BEZ235 führte nur an den sensitiven Subklonen zu einer leichten Erhöhung der Cisplatinempfindlichkeit.

Bei einer Tripel-Kombination von NVP-BEZ235 mit den HSP90i NVP-HSP990 oder NVP-AUY922 wurde keine stärkere Beeinflussung der Cisplatinempfindlichkeit als bei der dualen Kombination an den A2780, A2780CisR, CaOV3 oder CaOV3 Zellen ermittelt. Der Unterschied zum alleinigen Einsatz von NVP-BEZ235 war nicht signifikant (siehe Tabelle 6.13).

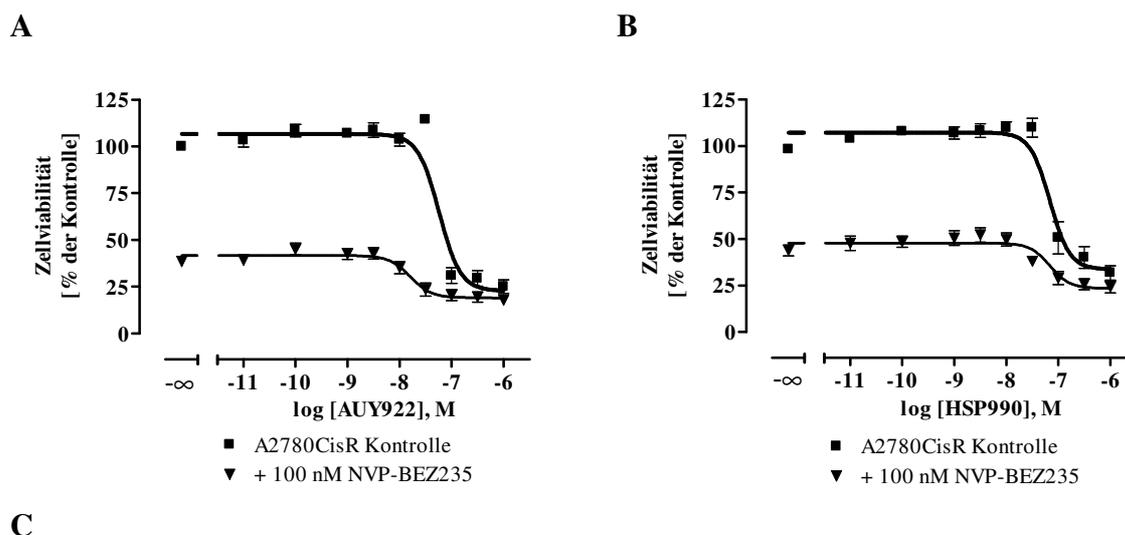
Tabelle 6.13 Einfluss der Kombination von NVP-BEZ235 mit den N-terminalen HSP90i auf die Cisplatinempfindlichkeit von A2780, A2780CisR, CaOV3 und CaOV3CisR Zellen.

NVP-BEZ235 und NVP-HSP990 oder NVP-AUY922 wurden 48h vor der 72-stündigen Inkubation mit Cisplatin zu den Zellen gegeben. Die Tabelle zeigt IC₅₀-Werte und pIC₅₀ ± SEM) von mindestens 1 unabhängigen Experimenten in Triplicaten durchgeführt und den Shiftfaktor (Sf), berechnet als Quotient aus der unbehandelten Kontrolle und der Probe mit den Inhibitoren. An den A2780 wurden 5 nM NVP-AUY922 und 10 nM NVP-HSP990 mit NVP-BEZ235 kombiniert, an den A2780CisR wurden 10 nM NVP-AUY922 und 15 nM NVP-HSP990 verwendet.

Bedingung	A2780				A2780CisR			
	IC ₅₀ [µM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig	IC ₅₀ [µM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig
Kontrolle	3,34	5,48 ± 0,02	-	-	19,7	4,71 ± 0,02	-	-
50 nM NVP-BEZ235 + NVP-AUY922	4,52	5,35 ± 0,07	0,7	n.s.	28,6	4,54 ± 0,09	0,7	n.s.
NVP-HSP990	4,91	5,31 ± 0,09	0,7	n.s.	30,0	4,52 ± 0,11	0,7	n.s.
Bedingung	CaOV3				CaOV3CisR			
	IC ₅₀ [µM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig	IC ₅₀ [µM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig
Kontrolle	1,92	5,72 ± 0,01	-	-	4,80	5,32 ± 0,02	-	-
3,16 nM NVP-BEZ235 + 10 nM NVP-HSP990	0,75	6,12 ± 0,06	2,6	***	2,54	5,59 ± 0,06	1,9	***

*** für p<0,001 gegen unbehandelte Kontrolle. Nicht signifikante Unterschiede sind mit n.s. gekennzeichnet.

NVP-BEZ235 wurde ebenfalls eingesetzt um den Effekt auf die Zytotoxizität der HSP90i zu untersuchen. Dafür wurde NVP-BEZ235 für 48 Stunden präinkubiert und im Folgenden eine Konzentrations-Effekt-Kurve von NVP-AUY922 bzw. NVP-HSP990 vermessen. An den A2780 Zellen ergab sich dabei kein Unterschied für den IC₅₀-Wert der HSP90i. Abbildung 6.52 zeigt die Ergebnisse an den A2780CisR.



C

Bedingung	A2780CisR – NVP-AUY922				A2780CisR – NVP-HSP990			
	IC ₅₀ [nM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig	IC ₅₀ [nM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig
Kontrolle	58,0	7,24 ± 0,06	-	-	71,6	7,15 ± 0,06	-	-
NVP-BEZ235	16,2	7,79 ± 0,12	3,6	***	36,1	7,44 ± 0,12	2,0	n.s.

Abbildung 6.52 Einfluss von NVP-BEZ235 auf die Zytotoxizität der N-terminalen HSP90i an A2780CisR.

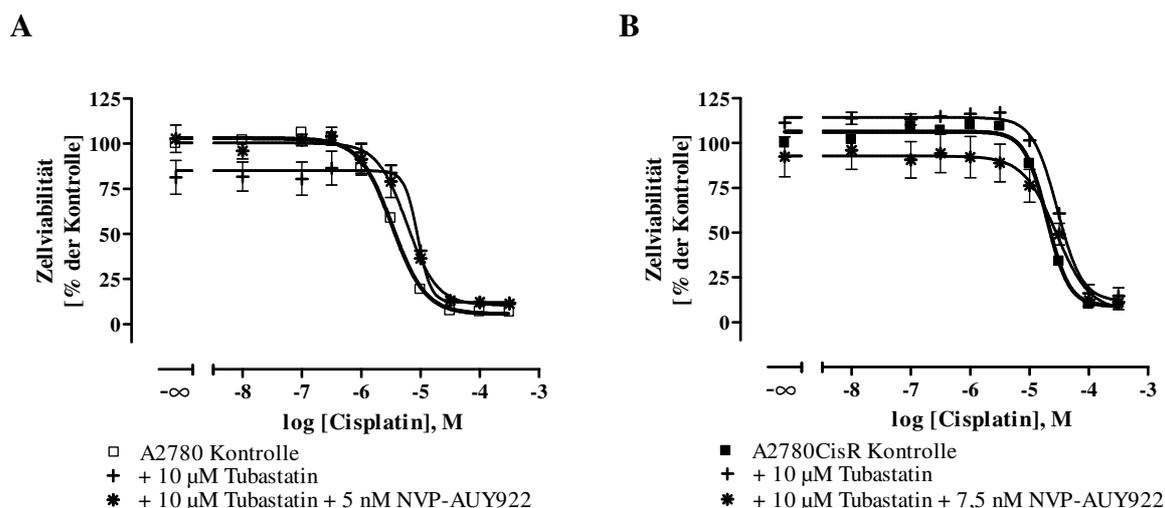
NVP-BEZ235 wurde 48h vor der 72-stündigen Inkubation mit den N-terminalen HSP90i NVP-AUY922 (A) oder NVP-HSP990 (B) an A2780CisR präinkubiert. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert ± SEM von mindestens 2 voneinander unabhängigen Experimenten in Triplikaten dar. C IC₅₀-Werte sowie pIC₅₀ ± SEM von den gezeigten Kurven. Sf ist der Shiftfaktor berechnet als Quotient aus dem Kontroll-IC₅₀-Wert der unbehandelten Zelllinie und der behandelten Zelllinie, sowie Signifikanzen gekennzeichnet mit *** für p<0,001. Nicht signifikante Unterschiede sind mit n.s. gekennzeichnet.

Bei den A2780CisR Zellen kam es zu einer Senkung des IC₅₀-Wertes der HSP90i. Ähnlich wie bei der Inkubation mit Cisplatin ergaben sich auch hier höhere IC₅₀-Werte für die Kontroll-Werte der HSP90i, da die Zellen sich 48 Stunden länger in den 96-Well Platten befanden. Es wurde deutlich, dass die Wirkung der HSP90i durch den Einsatz eines PI3K/mTOR-Inhibitors verbessert werden kann. Die Kombination aus HSP90i und einem PI3K/mTOR-Inhibitor zeigte jedoch keinen stärkeren Einfluss auf die Cisplatinempfindlichkeit als die Verwendung nur eines Modulators mit Cisplatin (siehe Abbildung 6.15 und Abbildung 6.51).

6.4.3 HSP90i und HDACi

Das HSP90-Protein wird hauptsächlich durch HDAC6 deacetyliert [Prodromou, 2016]. Durch den Einsatz von HDACi kommt es daher zu einer höheren Acetylierung des HSP90-Proteins. Dies führt zu einer Verringerung der HSP90-Aktivität, unter anderem durch eine verringerte Affinität zu dem Cochaperon p23. Ebenso scheint hyperacetyliertes HSP90 auch eine verminderte Affinität gegenüber ATP zu besitzen [Kovacs et al., 2005]. Daher wurde die Kombination von HSP90i mit HDACi untersucht. Zum Einsatz kamen NVP-AUY922 und NVP-HSP990 als HSP90i und Panobinostat und LMK235 als HDACi. Ebenso wurde Tubastatin A als HDAC6 selektiver HDACi eingesetzt.

Da hauptsächlich HDAC6 das HSP90-Protein deacetyliert, wurde Tubastatin A als HDAC6 selektiver HDACi [Butler et al., 2010] als erstes mit den HSP90i an den A2780 Zellen kombiniert. Der IC_{50} -Wert von Tubastatin A über 72 Stunden war größer als $100 \mu\text{M}$ an beiden Zelllinien. Abbildung 6.53 zeigt die Ergebnisse beim Einsatz von Tubastatin alleine oder in Kombination mit NVP-AUY922 zur 48-stündigen Präinkubation vor der Cisplatininkubation.



C

Bedingung	A2780				A2780CisR			
	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig
Kontrolle	3,34	5,48 ± 0,02	-	-	19,7	4,71 ± 0,02	-	-
Tubastatin	8,95	5,05 ± 0,07	0,4	***	29,4	4,53 ± 0,03	0,7	***
Tubastatin + NVP-AUY922	5,90	5,23 ± 0,06	0,6	***	28,4	4,55 ± 0,13	0,7	n.s.

Abbildung 6.53 Einfluss von Tubastatin in Kombination mit NVP-AUY922 auf die Cisplatinempfindlichkeit von A2780 und A2780CisR.

Tubastatin wurde alleine oder in Kombination mit NVP-AUY922 48h vor der 72-stündigen Cisplatininkubation zu den A2780 (A) oder A2780CisR (B) gegeben. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert ± SEM von mindestens 2 voneinander unabhängigen Experimenten in Triplikaten dar. C IC₅₀-Werte sowie pIC₅₀ ± SEM von den gezeigten Kurven. Sf ist der Shiftfaktor berechnet als Quotient aus dem Kontroll-IC₅₀-Wert der unbehandelten Zelllinie und der behandelten Zelllinie, sowie Signifikanz gekennzeichnet mit *** für p<0,001. Nicht signifikante Unterschiede sind mit n.s. gekennzeichnet.

Durch den alleinigen Einsatz von 10 μM Tubastatin für 48 Stunden vor der Cisplatinzugabe kam es in beiden Zelllinien zu einer signifikanten Senkung der Cisplatinempfindlichkeit. Durch die Kombination von Tubastatin A mit NVP-AUY922 kam es in beiden Zelllinien zu keiner Veränderung des IC₅₀-Wertes. Ähnlich wie beim Einsatz von NVP-AEW541 kam es auch hier zu einer Behinderung des Effektes der durch HSP90i alleine ausgelöst wurde, was an den geringeren Shiftfaktoren zu erkennen war. Da der Einsatz des HDAC6 selektiven HDACi zu keiner Veränderung in der Cisplatinempfindlichkeit an den A2780 führte und es bei der Kombination mit den HSP90i sogar negative Effekte aufwies, wurden die folgenden Untersuchungen nur mit Panobinostat und LMK235 als HDACi durchgeführt.

6.4.3.1 Gegenseitige Beeinflussung der Zytotoxizität

Zunächst wurde die duale Kombination der HDACi mit den HSP90i untersucht. Dafür wurden die Zellen zunächst für 48 Stunden mit den HSP90i inkubiert und anschließend die Konzentrations-Effekt-Kurve der HDACi vermessen.

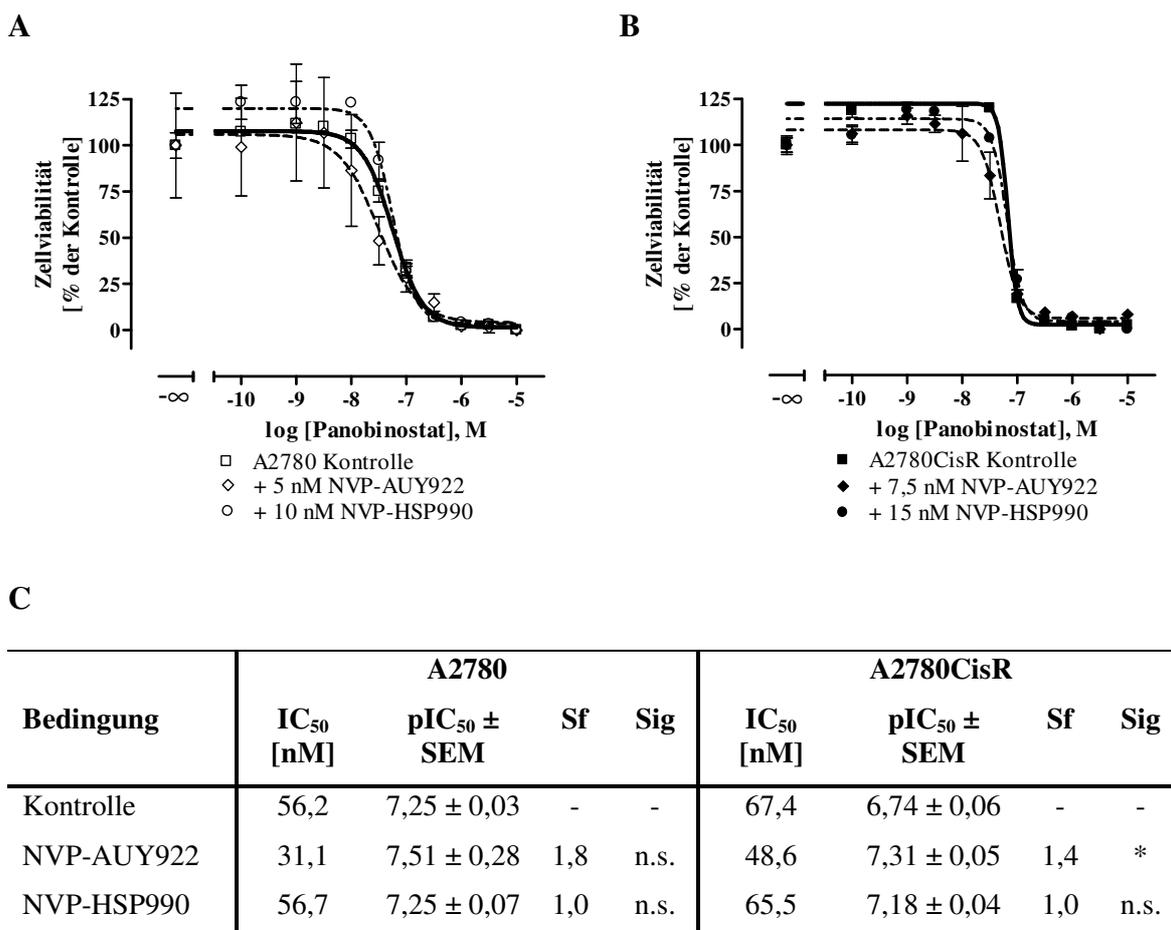
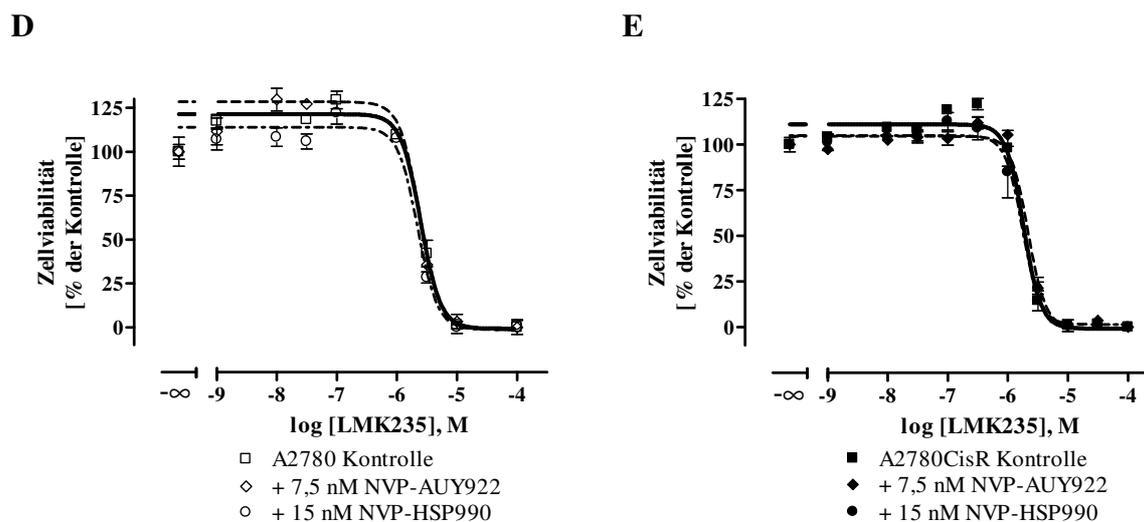


Abbildung 6.54 Einfluss der HSP90i auf die HDACi-Sensitivität.

Legende s. S. 151



F

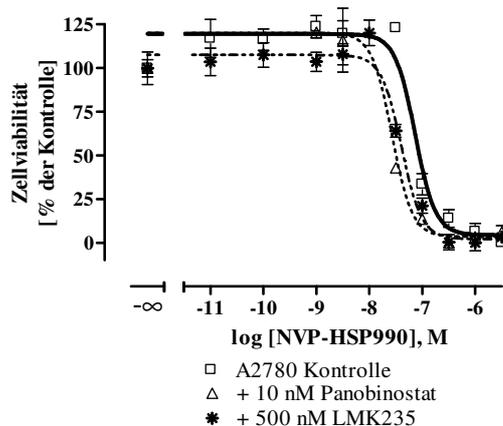
Bedingung	A2780				A2780CisR			
	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig
Kontrolle	2,49	5,60 ± 0,04	-	-	1,83	5,74 ± 0,04	-	-
NVP-AUY922	2,42	5,62 ± 0,05	1,0	n.s.	2,19	5,66 ± 0,02	0,8	n.s.
NVP-HSP990	2,24	5,65 ± 0,04	1,1	n.s.	1,77	5,75 ± 0,05	1,0	n.s.

Abbildung 6.54 Einfluss der HSP90i auf die HDACi-Sensitivität.

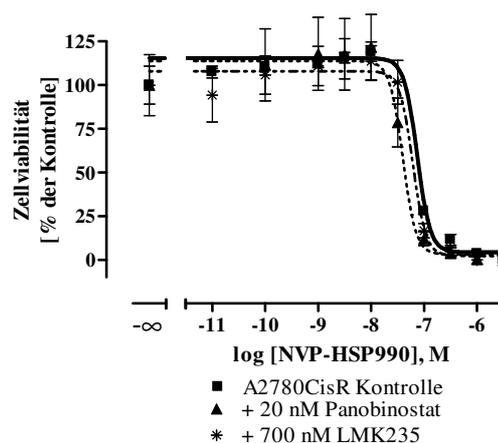
Die HSP90i NVP-AUY922 und NVP-HSP990 wurden 48h vor der 72-stündigen Inkubation zusammen mit den HDACi Panobinostat oder LMK235 an A2780 (A, D) oder A2780CisR (B, E) präinkubiert. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert ± SEM von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten in Triplikaten dar. C, F IC₅₀-Werte sowie pIC₅₀ ± SEM von den gezeigten Kurven. Sf ist der Shiftfaktor berechnet als Quotient aus dem Kontroll-IC₅₀-Wert der unbehandelten Zelllinie und der behandelten Zelllinie, sowie Signifikanzen gekennzeichnet mit * für p<0,05. Nicht signifikante Unterschiede sind mit n.s. gekennzeichnet.

Wie Abbildung 6.54 zeigt, kam es bei maximalen Shiftfaktoren von 1,8 zu keiner nennenswerten Beeinflussung der HDACi-IC₅₀-Werte. Anders zeigte sich das Bild, wenn die Reihenfolge invertiert wurde, d.h. die Zellen wurden zunächst mit HDACi für 48 Stunden inkubiert und im Anschluss daran die HSP90i für 72 Stunden inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.55 gezeigt.

A



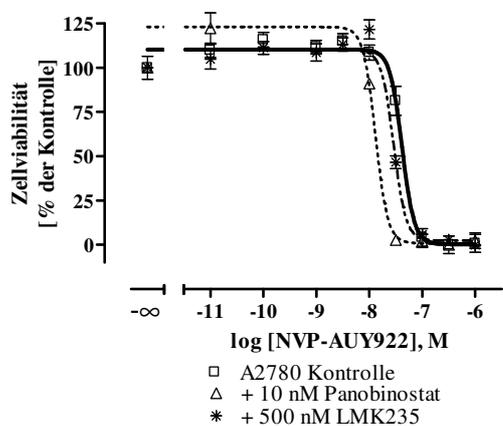
B



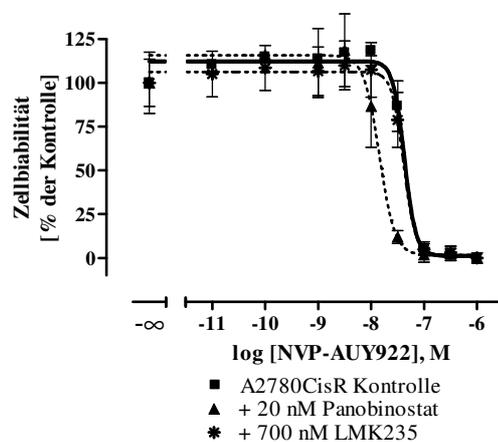
C

Bedingung	A2780				A2780CisR			
	IC ₅₀ [nM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig	IC ₅₀ [nM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig
Kontrolle	74,0	7,13 ± 0,04	-	-	74,6	7,13 ± 0,02	-	-
Panobinostat	26,9	7,57 ± 0,07	2,8	***	39,9	7,40 ± 0,08	1,9	**
LMK235	40,8	7,39 ± 0,05	1,8	***	61,7	7,21 ± 0,08	1,2	n.s

D



E



F

Bedingung	A2780				A2780CisR			
	IC ₅₀ [nM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig	IC ₅₀ [nM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig
Kontrolle	41,6	7,38 ± 0,03	-	-	42,8	7,37 ± 0,06	-	-
Panobinostat	13,2	7,88 ± 0,04	3,2	***	14,4	7,84 ± 0,13	3,0	*
LMK235	29,1	7,54 ± 0,02	1,4	***	41,3	7,39 ± 0,13	1,0	n.s

Abbildung 6.55 Einfluss der HDACi auf die HSP90i-Sensitivität.

Legende s.S. 153

Abbildung 6.55 Einfluss der HDACi auf die HSP90i-Sensitivität

Die HDACi Panobinostat und LMK235 wurden 48h vor der 72-stündigen Inkubation zusammen mit den HSP90i NVP-AUY922 oder NVP-HSP990 an A2780 (**A, D**) oder A2780CisR (**B, E**) präinkubiert. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert \pm SEM von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten in Triplikaten dar. **C, F** IC₅₀-Werte sowie pIC₅₀ \pm SEM von den gezeigten Kurven. Sf ist der Shiftfaktor berechnet als Quotient aus dem Kontroll-IC₅₀-Wert der unbehandelten Zelllinie und der behandelten Zelllinie, sowie Signifikanzen gekennzeichnet mit * für p<0,05, ** für p<0,01 und *** für p<0,001. Nicht signifikante Unterschiede sind mit n.s. gekennzeichnet.

Im Vergleich zu Tabelle 6.6, in denen ebenfalls die IC₅₀-Werte über 72 Stunde gezeigt sind, waren die hier ermittelten Werte der Kontrolle erhöht. Dies ist dadurch erklärbar, dass die Zellen länger in den 96-Well Platten verweilen mussten, da vor der 72 Stunden Inkubation noch für 48 Stunden präinkubiert wurde. Dies führte an den A2780 Zellen zu einer Erhöhung des IC₅₀-Wertes. Durch die Inkubation mit den HDACi kam es zu einer Steigerung der Zytotoxizität der HSP90i. Dieser Effekt war an den A2780 ausgeprägter als an den A2780CisR und mit Panobinostat stärker ausgeprägt als mit LMK235. Es konnte bei NVP-AUY922 eine Verringerung des IC₅₀-Wertes auf ein Drittel bestimmt werden. Dies zeigte, dass die Reihenfolge, in der die Inhibitoren verabreicht werden, Einfluss auf die Zytotoxizität hatte.

Als weitere Untersuchung wurde die Applikationsreihenfolge auf die Fähigkeit zur Apoptoseinduktion untersucht. Dafür wurden die A2780 und A2780CisR Zellen zunächst für 24 Stunden mit einem der Inhibitorclassen inkubiert und erst danach wurden für weitere 24 Stunden beide Inhibitoren auf die Zellen gegeben. Es wurden beide Reihenfolgen getestet (siehe Abbildung 6.56).

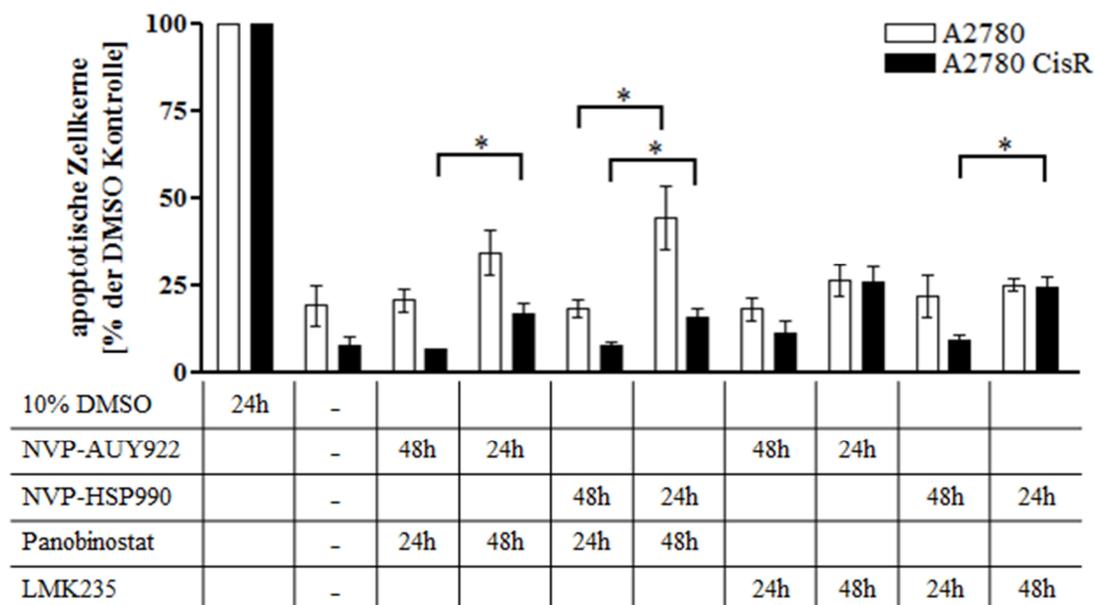


Abbildung 6.56 Eine Präinkubation mit HDACi führte zu einer höheren Apoptoseinduktion als eine Präinkubation mit HSP90i.

Die Zellen wurden entweder für 24h mit den HSP90i präinkubiert, gefolgt von einer 24-stündigen Inkubation mit HSP90i und HDACi zusammen oder es wurde zuerst mit 24h mit den HDACi inkubiert gefolgt von einer 24-stündigen Inkubation mit beiden Inhibitoren. An den A2780 wurden 5 nM NVP-AUY922, 10 nM NVP-HSP990, 10 nM Panobinostat und 350 nM LMK235 und an den A2780CisR 7,5 nM NVP-AUY922, 15 nM NVP-HSP990, 20 nM Panobinostat und 500 nM LMK235 eingesetzt. 10% DMSO für 24 Stunden wurde zum Auslösen von Apoptose verwendet und auf diese Apoptoseinduktion die restlichen Werte bezogen. Daten entsprechen dem Mittelwert \pm SEM von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit * für $p < 0,05$.

Es wurde deutlich, dass eine Präinkubation mit einem HDACi gefolgt von der Zugabe des HSP90i zu einer höheren Apoptoseinduktion führte, als die umgekehrte Reihenfolge. Auch dieser Effekt war mit Panobinostat deutlicher zu sehen als mit LMK235. So ergab sich bei der Kombination von NVP-HSP990 mit Panobinostat an den A2780 Zellen $18,57 \pm 2,7\%$ apoptotische Zellen, wenn die Zellen zuerst mit dem HSP90i inkubiert wurden. Durch eine Änderung der Reihenfolge stieg der Anteil apoptotischer Zellkerne auf $44,3 \pm 8,9\%$. Dies bedeutet eine Steigerung um das 2,4-fache. Der Effekt, dass eine Präinkubation mit dem HDACi zu einer höheren Apoptoseinduktion führte als eine Präinkubation mit dem HSP90i, war an A2780CisR häufiger festzustellen als an den A2780 (z.B. A2780CisR 24h LMK235 + 48h NVP-HSP990 $9,4 \pm 1,6\%$ vs. A2780CisR 48h LMK235 + 24h NVP-HSP990 $24,3 \pm 3,4$; d.h. Steigerung um das 2,6-fache).

Die Kombination der HDACi mit den HSP90i wurde ebenfalls hinsichtlich der Beeinflussung des Zellzyklus untersucht. Dafür wurde, wie beim Einsatz der Einzelsubstanzen, eine höhere Konzentration als bei den MTT-Versuchen verwendet. Das Ergebnis ist in Abbildung 6.57 dargestellt.

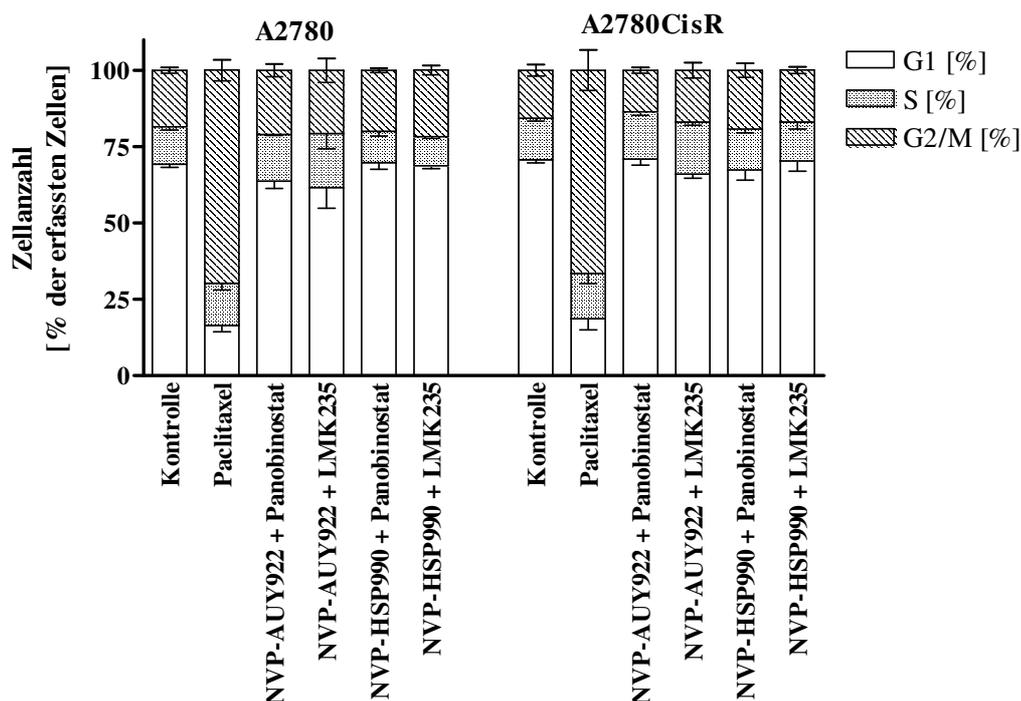


Abbildung 6.57 Zellzyklusverteilung nach 48h Behandlung mit der Kombination von HDACi und HSP90i.

A2780 und A2780CisR wurden für 48h mit den Inhibitoren inkubiert und anschließend mittels PI-Färbung der Zellzyklus bestimmt. Verwendete Konzentrationen waren an den A2780 20 nM NVP-AUY922, 20 nM NVP-HSP990, 20 nM Panobinostat und 500 nM LMK235 und an den A2780CisR 25 nM NVP-AUY922, 22 nM NVP-HSP990, 20 nM Panobinostat und 700 nM LMK235. Paclitaxel wurde als G₂/M-Kontrolle für 24h in einer Konzentration von 50 nM eingesetzt. Daten zeigen Mittelwerte ± SEM von mindestens 2 voneinander unabhängigen Experimenten.

Keine Kombination von HDACi mit HSP90i führte zu einer Beeinflussung des Zellzyklus.

6.4.3.2 Erhöhung der Cisplatinsensitivität durch die Kombination von HDACi und HSP90i

Es wurde außerdem untersucht, wie sich die Kombination von HDACi und HSP90i auf die Cisplatinsensitivität auswirkt. Dafür wurden unterschiedliche Schemata ausgetestet (siehe Abbildung 6.58). Die Zellen sollten dabei nicht länger als 120 Stunden inkubiert werden, da es sonst zu einem stärkeren Wachstum und im Folgenden zu einem Anstieg im Cisplatin IC₅₀-Wert kam. Die Zellen wurden entweder zeitgleich für 48 Stunden mit den HSP90i und den HDACi präinkubiert, gefolgt von einer 72-stündigen Cisplatinbehandlung in Gegenwart von HDACi und HSP90i (Abbildung 6.58A). Um das Priming mit den HDACi genauer zu untersuchen, wurden die HDACi für 48 Stunden alleine präinkubiert, gefolgt von der gleichzeitigen Zugabe der HSP90i mit Cisplatin für 72 Stunden (Abbildung 6.58B). Weiterhin wurden HDACi für 48 Stunden präinkubiert, gefolgt von einer 24-stündigen Inkubation mit den HDACi und den HSP90i zusammen. Anschließend wurde Cisplatin für 48 Stunden gemeinsam mit beiden Inhibitoren zu den Zellen gegeben

(Abbildung 6.58C). Bei diesem Schema musste die Inkubationszeit von Cisplatin auf 48 Stunden reduziert werden, da sonst die totale Inkubationszeit von 120 Stunden überschritten gewesen wäre. So lassen sich Schema A und B direkt vergleichen, wohingegen bei Schema C höhere IC_{50} -Werte von Cisplatin, durch die kürzere Inkubationszeit des Cisplatins, erwartet wurden.

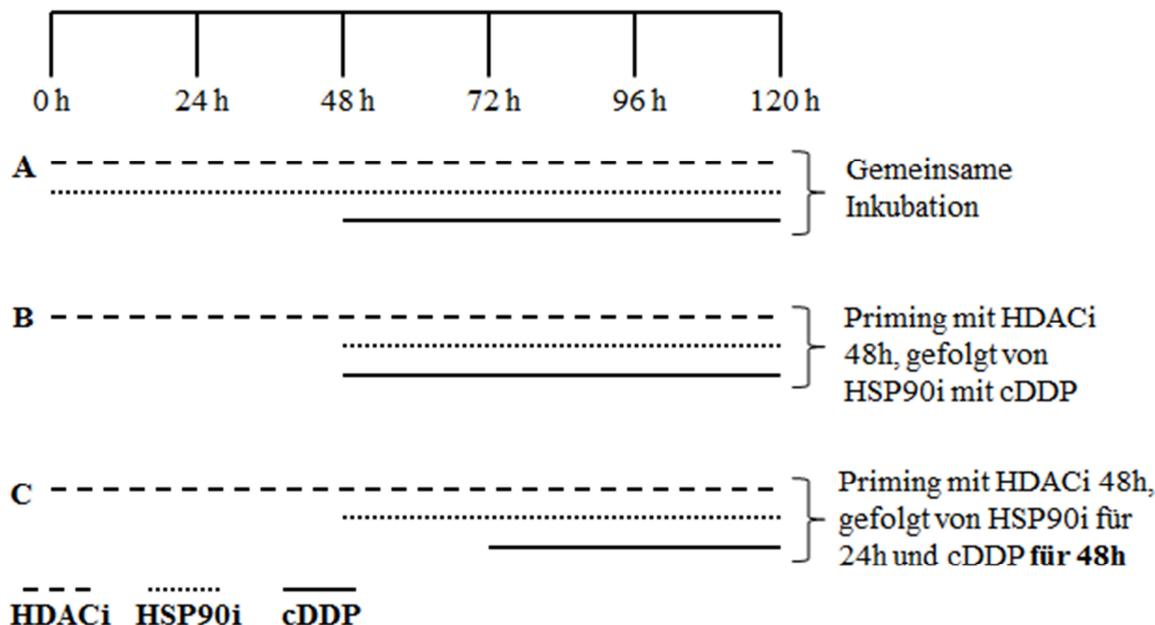


Abbildung 6.58 Schemata der Kombinationsgabe von HDACi mit HSP90i.

Bei Schema A wurden beide Inhibitoren gleichzeitig zu den Zellen gegeben und für 48h vor der Cisplatinzugabe inkubiert. Bei Schema B wurde lediglich der HDACi 48h präinkubiert und anschließend der HSP90i zusammen mit Cisplatin für 72h inkubiert. Bei Schema C wurden die Zellen zunächst für 48h mit dem HDACi präinkubiert, gefolgt von einer 24h Inkubation mit den HDACi und HSP90i. Anschließend wurde Cisplatin für 48h zusammen mit den Inhibitoren hinzugegeben. Eine durchgezogene Linie kennzeichnet die Cisplatinzugabe, eine gepunktete die HSP90i-Zugabe und eine gestrichelte die HDACi-Zugabe.

Abbildung 6.59 zeigt die Ergebnisse der Schemata A und B. Die Kontrollkurven der alleinigen Präinkubation mit den Inhibitoren wurden der Übersicht halber nicht in die Graphen mit aufgenommen. Da es durch die Kombination der beiden Inhibitoren zur Verstärkung der zytotoxischen Effekte kam, mussten die eingesetzten Konzentrationen verringert werden. An den A2780 wurden daher 8 nM NVP-HSP990 und 350 nM LMK235 eingesetzt. An den A2780CisR wurden 7,5 nM NVP-AUY922 und 500 nM LMK235 verwendet.

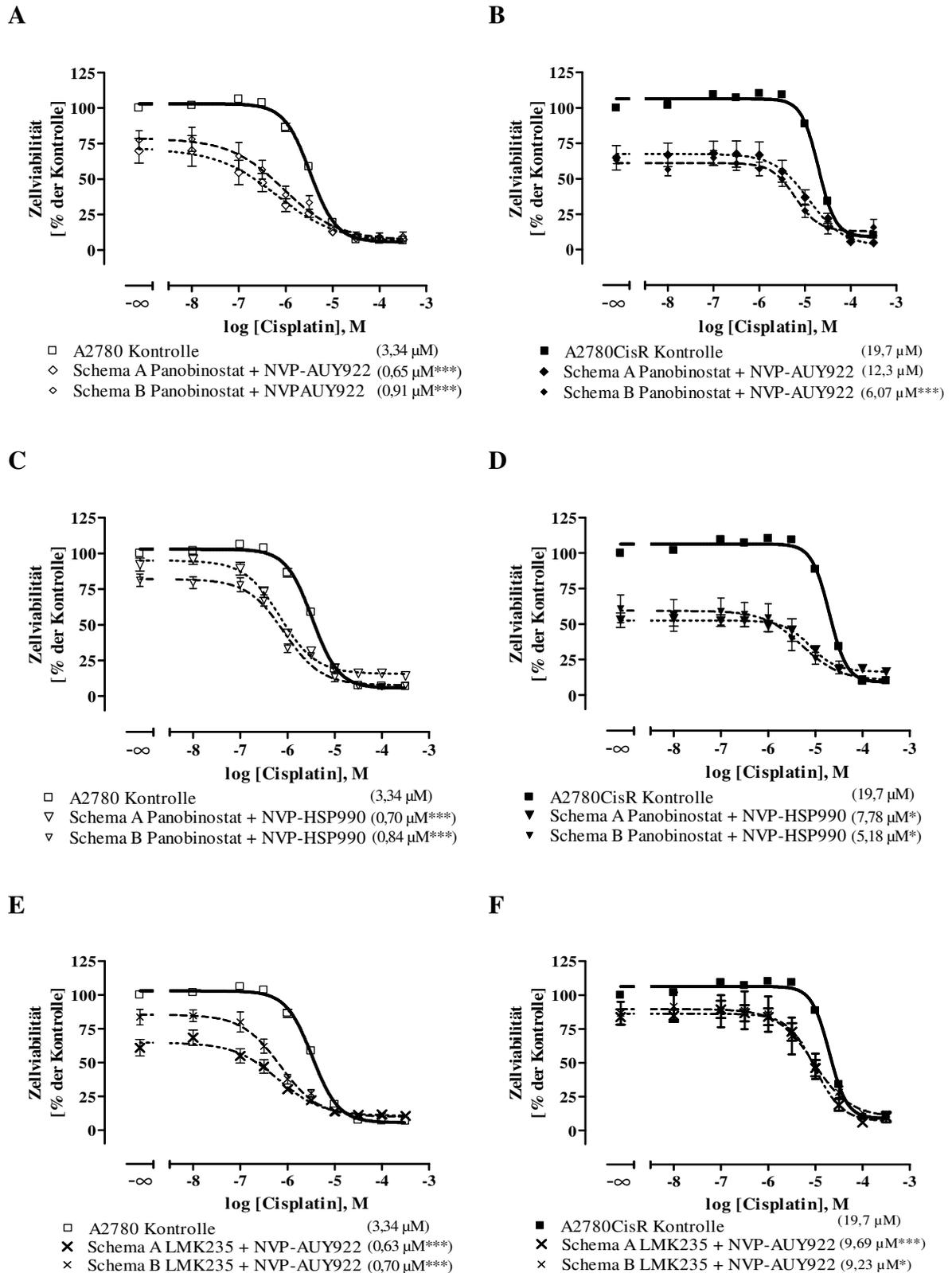
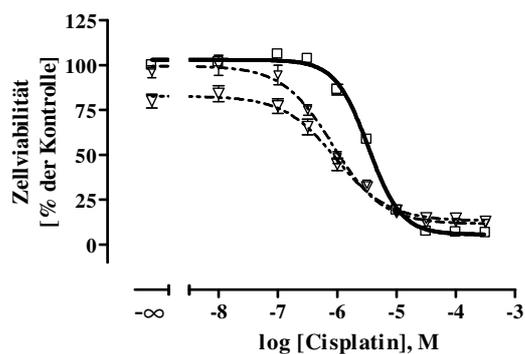


Abbildung 6.59 Erhöhung der Cisplatin sensitivität von A2780 und A2780CisR durch die Kombination von HSP90i und HDACi.

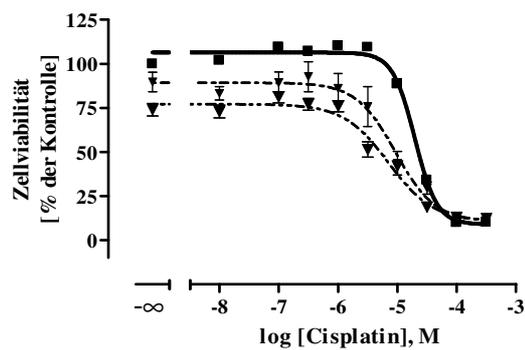
Legende siehe S. 158

G



- A2780 Kontrolle (3,34 μM)
- ▽ Schema A LMK235 + NVP-HSP990 (0,95 μM^{***})
- ▽ Schema B LMK235 + NVP-HSP990 (0,84 μM^{***})

H



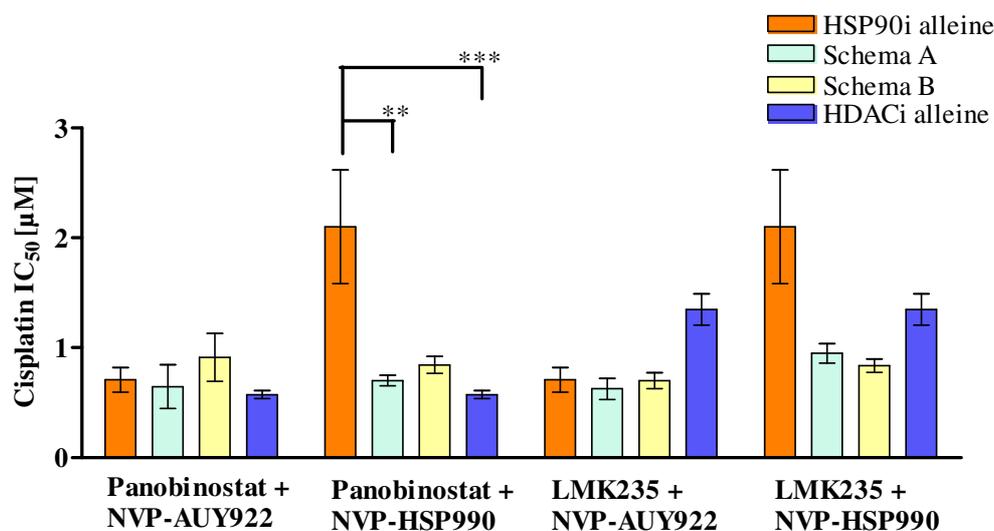
- A2780CisR Kontrolle (19,7 μM)
- ▼ Schema A LMK235 + NVP-HSP990 (7,07 μM^{***})
- ▼ Schema B LMK235 + NVP-HSP990 (9,26 μM^{**})

Abbildung 6.59 Erhöhung der Cisplatinempfindlichkeit von A2780 und A2780CisR durch die Kombination von HSP90i und HDACi.

Die HDACi und die HSP90i wurden zusammen für 48 Stunden präinkubiert (Schema A) oder die HDACi wurden alleine für 48h präinkubiert und die HSP90i gleichzeitig mit Cisplatin auf die Zellen gegeben (Schema B). Cisplatin wurde in beiden Fällen für 72h inkubiert. An den A2780 wurden 5 nM NVP-AUY922, 8 nM NVP-HSP990, 10 nM Panobinostat und 350 nM LMK235 (A, C, E, G) und an den A2780CisR 7,5 nM NVP-AUY922, 15 nM NVP-HSP990, 20 nM Panobinostat und 500 nM LMK235 (B, D, F, H) eingesetzt. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert \pm SEM von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten vermessen in Triplikaten dar. Die ermittelten IC_{50} -Werte sind in Klammern in den Abbildungen gezeigt. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$.

Generell ließ sich feststellen, dass die Effekte an den A2780 ausgeprägter waren im Vergleich zu den A2780CisR. Die gemeinsame Inkubation der HDACi und HSP90i führten an den A2780 Zellen zu den geringsten IC_{50} -Werten, außer bei der Kombination von LMK235 mit NVP-HSP990. An den A2780CisR konnte trotz der Kombination der HDACi mit den HSP90i keine vollständige Revertierung der Resistenz erreicht werden. Für beide Zelllinien konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den IC_{50} -Werten unter Schema A oder B festgestellt werden. Ebenso kam es zu keiner signifikanten Veränderung im Vergleich zur Inkubation der Inhibitoren alleine (Vergleiche Abbildung 6.1 und Abbildung 6.15). Abbildung 6.60 stellt diese IC_{50} -Werte vergleichend dar. Dabei wurde bei der alleinigen Gabe der Inhibitoren dieselbe Konzentration eingesetzt wie in der Kombinationstherapie. Es erfolgte dabei eine Verringerung der Konzentration bei A2780 auf 8 nM NVP-HSP990 und 350 nM LMK235 und bei A2780CisR auf 7,5 nM NVP-AUY922 und 500 nM LMK235 im Vergleich zu den Präinkubationen der dualen Therapie (siehe Abbildung 6.1 und Abbildung 6.15).

A



B

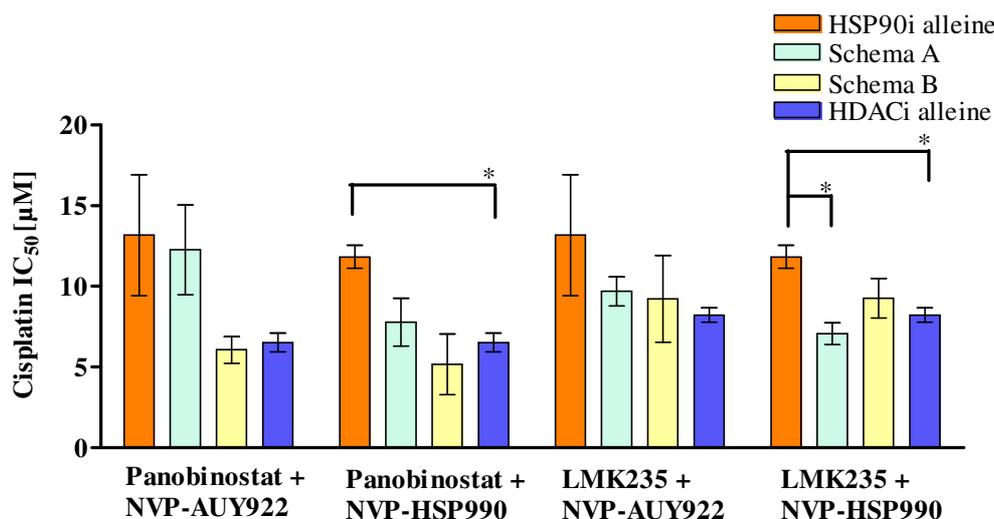


Abbildung 6.60 Effekte der Kombination von HDACi mit HSP90i auf die Cisplatin sensitivität von A2780 und A2780CisR.

A2780 (A) und A2780CisR (B) wurden mit HDACi, HSP90i oder einer Kombination bestehend aus beiden Inhibitoren in unterschiedlichen zeitlichen Schemata präinkubiert. Daran schloss sich eine 72-stündige Cisplatininkubation an. HSP90i alleine/HDACi alleine = 48-stündige Präinkubation vor der 72-stündigen Cisplatininkubation mit dem entsprechenden Inhibitor. Schema A = 48-stündige Inkubation beider Inhibitoren zusammen vor der 72-stündigen Cisplatininkubation mit den entsprechenden Inhibitoren. Schema B = 48-stündige Präinkubation mit dem HDACi gefolgt von einer 72-stündigen Inkubation von Cisplatin mit dem HSP90i und dem HDACi (siehe Abbildung 6.59). Dargestellt sind IC_{50} -Werte von Cisplatin \pm SEM. Signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlich Inkubationsschemata sind gekennzeichnet mit * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$.

Beim Vergleich wurde deutlich, dass die duale Therapie, d.h. Präinkubation mit HDACi oder HSP90i alleine, bereits den geringsten IC_{50} -Wert zeigt (Shiftfaktor mit 48 Stunden Präinkubation mit 10 nM Panobinostat: 5,8 und Shiftfaktor mit 48 Stunden Präinkubation mit 5 nM NVP-AUY922 4,7). Bei A2780CisR zeigten bereits die HDACi alleine eine

starke Cisplatin sensitivierung. Die zusätzliche Inkubation mit einem HSP90i führte zu keiner signifikanten Änderung im Vergleich zur Inkubation mit dem HDACi alleine. Der höchste Shiftfaktor lag bei 3,8 durch eine Inkubation nach Schema B mit 20 nM Panobinostat und 15 nM NVP-HSP990.

Die Kombination der HDACi mit den HSP90i wurde ebenfalls auf die Apoptoseinduktion in Anwesenheit von Cisplatin untersucht. Dabei wurden die Inhibitoren zusammen für 48 Stunden präinkubiert, gefolgt von einer 6-stündigen Behandlung mit dem IC₅₀-Wert von Cisplatin. Bei der folgenden 24-stündigen Auswaschphase befanden sich ebenfalls beide Inhibitoren auf den Zellen. Abbildung 6.61 zeigt die Ergebnisse.

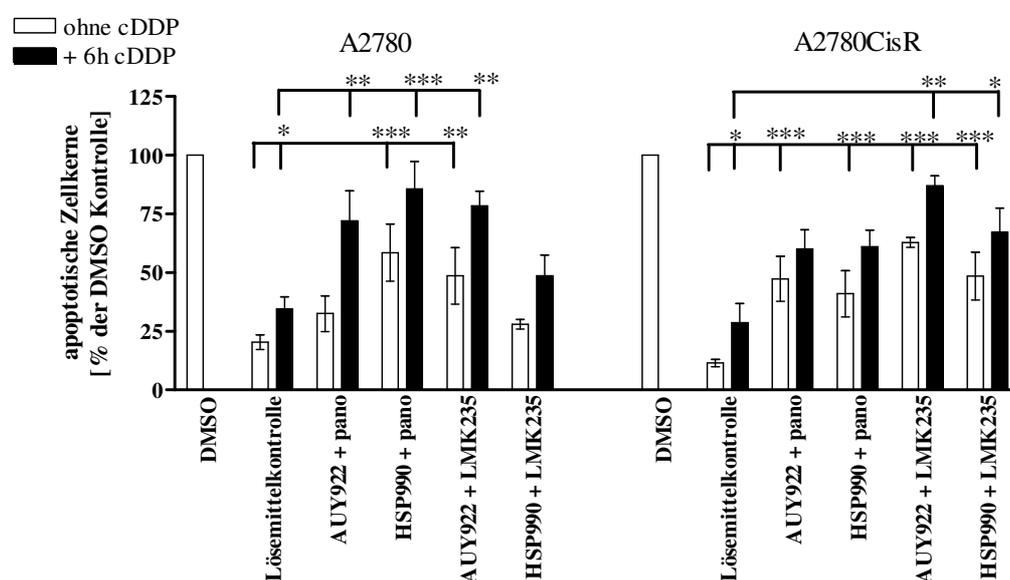


Abbildung 6.61 Apoptoseinduktion durch die Kombination von HDACi mit HSP90i an den A2780 und A2780CisR Zellen.

Die Zellen wurden entweder für insgesamt 78h mit dem HSP90i und HDACi inkubiert (ohne cDDP) oder 48h mit den HSP90i und HDACi präinkubiert, für 6h mit dem IC₅₀-Wert von Cisplatin inkubiert und anschließend für 24h in Anwesenheit der Inhibitoren weiterkultiviert (+6h cDDP). Eingesetzte Konzentrationen waren an den A2780 5 nM NVP-AUY922, 8 nM NVP-HSP990, 10 nM Panobinostat und 350 nM LMK235, an den A2780CisR 7,5 nM NVP-AUY922, 15 nM NVP-HSP990, 25 nM Panobinostat und 500 nM LMK235. 10% DMSO für 24 Stunden wurde zum Auslösen von Apoptose verwendet und auf diese Apoptoseinduktion die restlichen Werte bezogen. Daten entsprechen dem Mittelwert \pm SEM von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede sind mit * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$ gekennzeichnet.

Die Kombination der beiden Inhibitoren war in der Lage, Apoptose zu induzieren. Durch die Kombination mit Cisplatin kam es an A2780 zu einer additiven Steigerung der Apoptoseinduktion. Beim Vergleich mit dem alleinigen Einsatz der Inhibitoren bei der Apoptoseinduktion (Abbildung 6.3 und Abbildung 6.17), schienen die HSP90i zu einer Senkung der Apoptoseinduktion der HDACi zu führen (A2780 + 48h 10 nM Panobinostat $45,86 \pm 13,0\%$ vs. A2780 + 48h 5 nM NVP-AUY922 $32,17 \pm 4,7\%$ vs. A2780 + 48h

10 nM Panobinostat +5 nM NVPAUY922 $32,51 \pm 7,7\%$). Es kam bei der Kombination der HDACi mit den HSP90i nicht zu einer generellen Steigerung der Apoptoseinduktion im Vergleich zum Einsatz der HDACi alleine.

Um die sequentielle Gabe der beiden Inhibitorclassen genauer zu untersuchen, wurde Schema C (siehe Abbildung 6.58) gewählt. Hierbei wurde zunächst für 48 Stunden mit dem HDACi inkubiert, gefolgt von einer 24-stündigen Kombination der HDACi mit HSP90i. Erst danach wurde Cisplatin für weitere 48 Stunden zu den Zellen gegeben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.62 zu sehen.

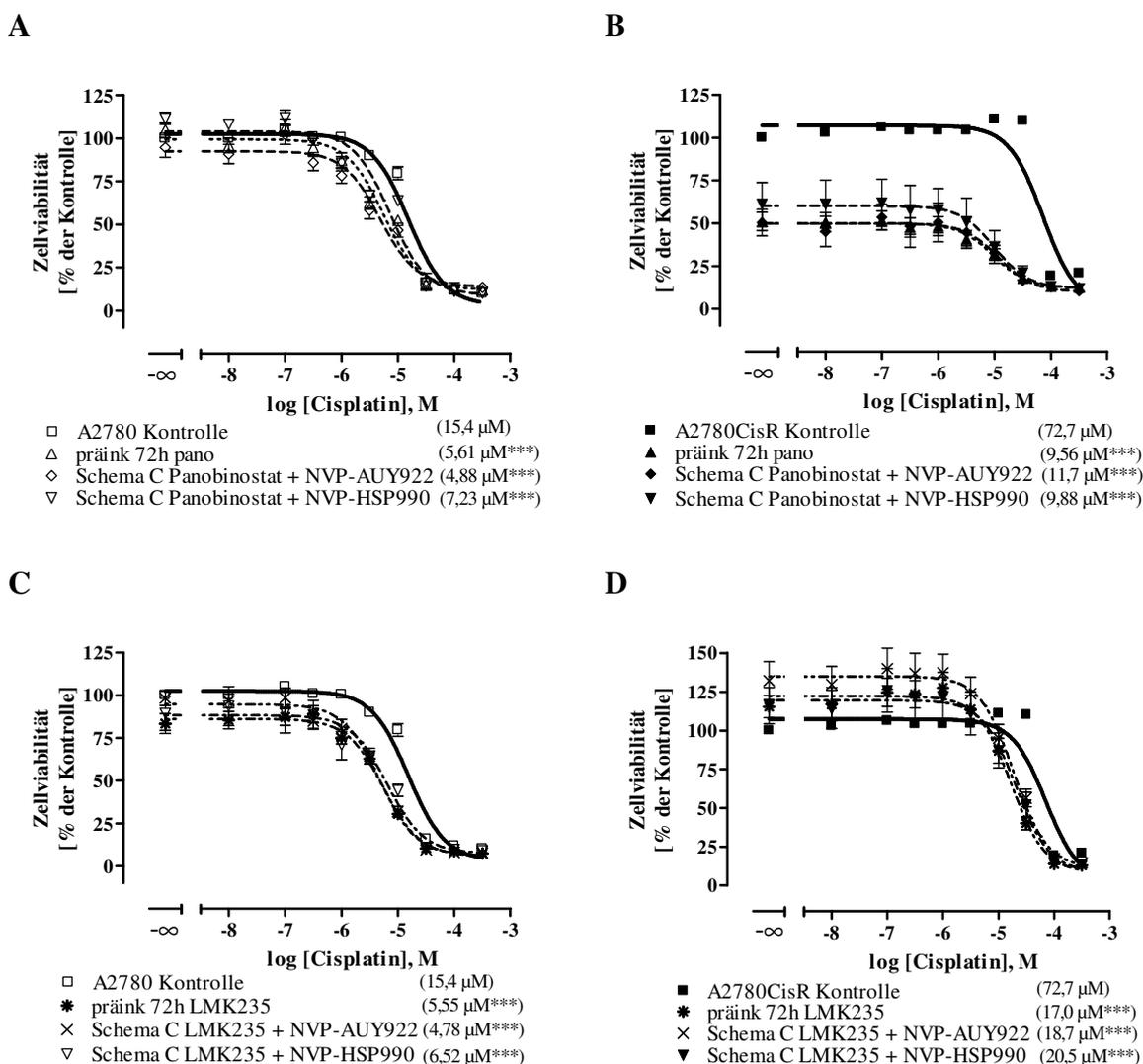


Abbildung 6.62 Erhöhung der Cisplatin sensitivität bei Schema C (vgl. Abbildung 6.58).

Die HDACi wurden für 48 Stunden präinkubiert, gefolgt von einer 24-stündigen Inkubation zusammen mit den HSP90i. Im Folgenden wurde Cisplatin für 48h hinzugegeben (Schema C). Eingesetzte Konzentrationen waren an den A2780 5 nM NVP-AUY922, 8 nM NVP-HSP990, 10 nM Panobinostat und 350 nM LMK235 (A, C), an den A2780CisR 7,5 nM NVP-AUY922, 15 nM NVP-HSP990, 20 nM Panobinostat und 500 nM LMK235 (B, D). Die Datenpunkte stellen den Mittelwert \pm SEM von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten vermessen in Triplikaten dar. Die ermittelten IC_{50} -Werte sind in Klammern in den Abbildungen gezeigt. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit *** für $p < 0,001$.

Auch hier wurde deutlich, dass die alleinige Präinkubation mit einem HDACi zu einer gleich starken Erhöhung der Cisplatinempfindlichkeit führte wie die Präinkubation mit der Kombination aus HDACi und HSP90i. An den A2780CisR Zellen war der Effekt auf die Cisplatinempfindlichkeit bei Panobinostat stärker ausgeprägt als bei LMK235. Zusätzlich kam es durch die Verlängerung der Inkubationszeit von Panobinostat auf 72 Stunden zur vollständigen Revertierung der Cisplatinresistenz bei A2780CisR. Es wurde ein geringerer IC_{50} -Wert als bei den A2780 Zellen erzielt (A2780 Kontrolle 15,4 μ M, $pIC_{50} = 4,81 \pm 0,03$ vs. A2780CisR Kontrolle 72,7 μ M, $pIC_{50} = 4,14 \pm 0,04$ vs. A2780CisR + 72h 20 nM Panobinostat 9,56 μ M, $pIC_{50} = 5,02 \pm 0,14$). Abbildung 6.63 fasst die IC_{50} -Werte unter Schema C zusammen.

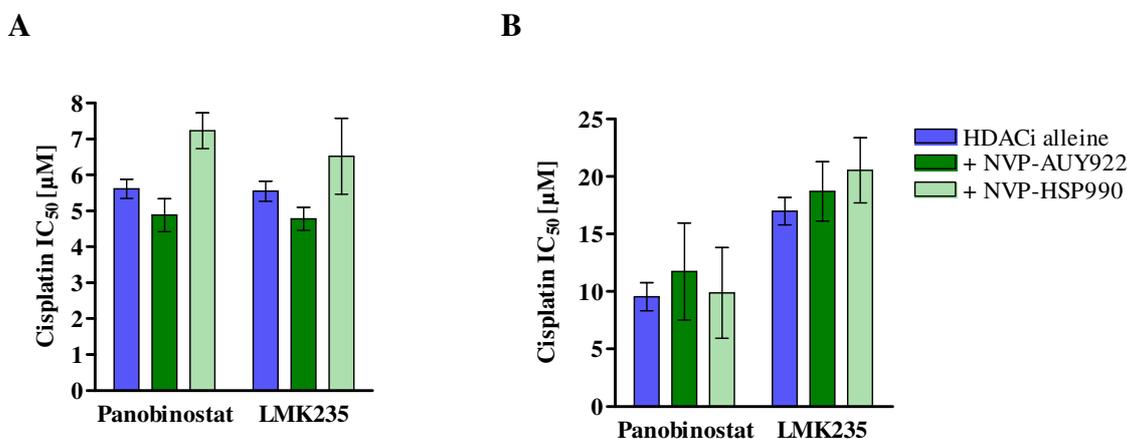
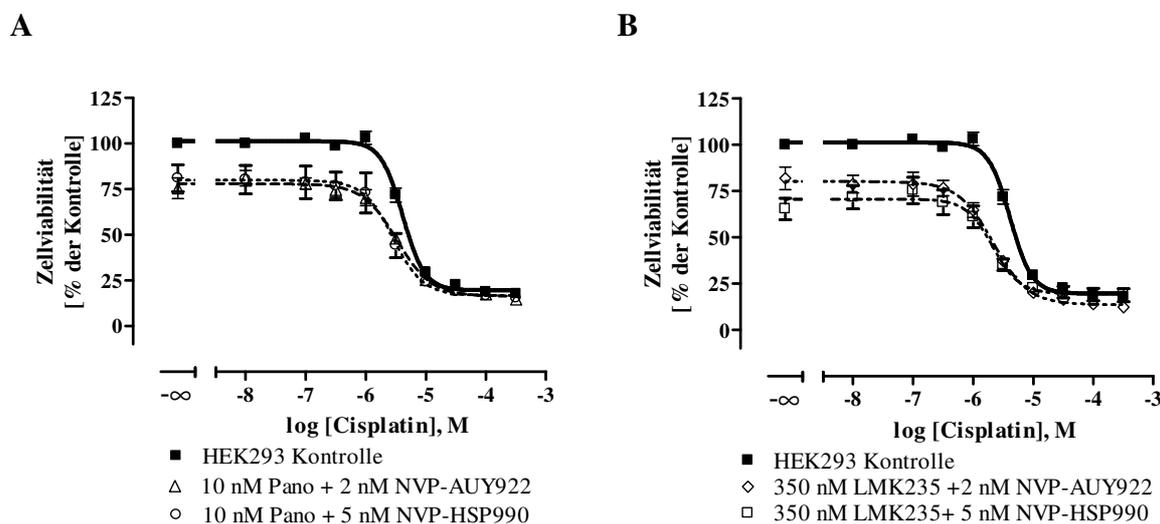


Abbildung 6.63 Effekte einer 72-stündigen Präinkubation von HDACi und HSP90i auf die Cisplatinempfindlichkeit von A2780 und A2780CisR bei einer 48-stündigen Cisplatininkubation.

A2780 (A) und A2780CisR (B) wurden für 72h mit den HDACi Panobinostat oder LMK235 vor der 48-stündigen Cisplatininkubation präinkubiert (blau) oder zunächst für 48 Stunden mit dem HDACi präinkubiert, gefolgt von einer 24-stündigen Inkubation mit dem HDACi und dem HSP90i NVP-AUY922 (dunkelgrün) oder NVP-HSP990 (hellgrün) gefolgt von einer 48-stündigen Cisplatininkubation mit den beiden Inhibitoren. Dargestellt sind IC_{50} -Werte \pm SEM. Es bestand kein signifikanter Unterschied in den IC_{50} -Werten der unterschiedlichen Behandlungen.

An A2780 gab es beim alleinigen Einsatz des HDACi oder der Kombination von HDACi mit HSP90i keine signifikanten Unterschiede in den IC_{50} -Werten. Es kam unter dem Inkubationsschema C an A2780 zu maximalen Shiftfaktoren von 3,2 (Schema C mit 350 nM LMK235 und 5 nM NVP-AUY922), die geringer sind als unter den anderen getesteten Schemata (siehe Abbildung 6.60). An A2780CisR wurden durch den Einsatz von Panobinostat geringere IC_{50} -Werte als durch den Einsatz von LMK235 erzielt. Ferner wurden bei A2780CisR durch die verlängerten Präinkubationszeiten deutlich höhere Shiftfaktoren als mit den anderen Schemata erzielt (siehe Abbildung 6.60). So wurde durch die 72-stündige Präinkubation mit 20 nM Panobinostat ein Shiftfaktor von 7,6 erzielt.

Die HDACi und die HSP90i lösten alleine eingesetzt keine signifikante Änderung der Cisplatinsensitivität an den HEK293 Zellen aus (siehe Abbildung 6.6 und Abbildung 6.23). Die Kombination der beiden Inhibitorklassen sollte zusätzlich an HEK293 getestet werden. Abbildung 6.64 zeigt die Ergebnisse.



C

Bedingung	HEK293		
	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf
Kontrolle	3,17	5,50 ± 0,02	-
Panobinostat + NVP-AUY922	3,30	5,48 ± 0,06	1,0
Panobinostat + NVP-HSP990	2,83	5,55 ± 0,10	1,1
LMK235 + NVP-AUY922	2,16	5,67 ± 0,07	1,5
LMK235 + NVP-HSP990	2,10	5,68 ± 0,09	1,5

Abbildung 6.64 Beeinflussung der Cisplatinsensitivität der HEK293 Zellen durch die Kombination von HDACi und HSP90i.

Panobinostat (A) oder LMK235 (B) und die HSP90i wurden an den HEK293 zusammen für 48 Stunden präinkubiert und anschließend Cisplatin für 72h inkubiert. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert ± SEM von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten vermessen in Triplikaten dar. C IC₅₀-Werte sowie pIC₅₀ ± SEM von den in A und B gezeigten Kurven. Sf ist der Shiftfaktor berechnet als Quotient aus dem Kontroll-IC₅₀-Wert der unbehandelten Zelllinie und der behandelten Zelllinie.

Auch die Kombination der HDACi mit den HSP90i zeigte keine Beeinflussung der Cisplatinsensitivität der Nicht-Tumorzelllinie HEK293.

6.4.3.3 Beeinflussung der funktionellen Aktivität von HSP90 durch die Kombination von HDACi und HSP90i

Da HDACi in der Lage sind, den Acetylierungsstatus von HSP90 zu verändern und dieser einen Einfluss auf die Funktionalität des HSP90-Proteins aufweisen soll, wurde dies mit dem Luciferase-Rückfaltungs-Assay untersucht. Dafür wurden die Kyse510 Zellen vor der Zellyse für 48 Stunden mit steigenden Konzentrationen an Panobinostat inkubiert und anschließend eine Konzentrations-Effekt-Kurve von NVP-HSP990 oder NVP-AUY922 vermessen. Dafür wurden 10, 20 und 31,6 nM Panobinostat eingesetzt. Abbildung 6.65 zeigt das Ergebnis.

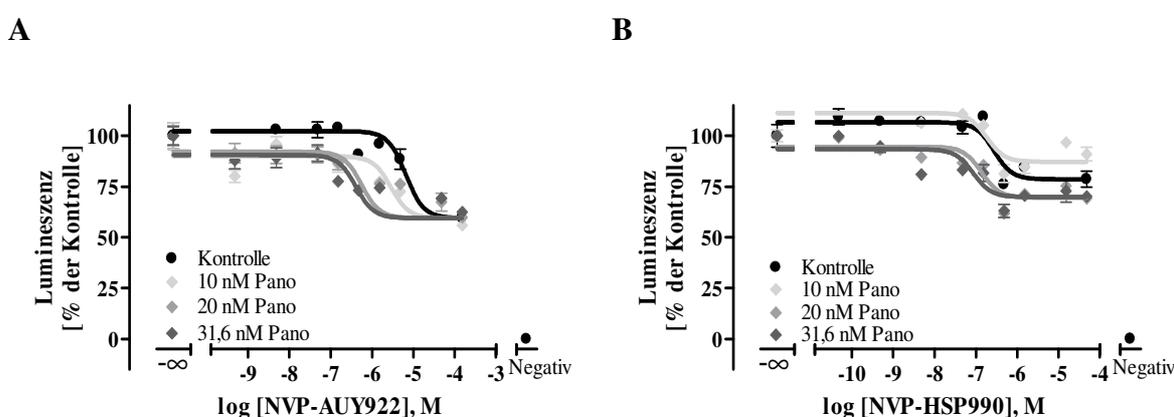


Abbildung 6.65 Beeinflussung der inhibitorischen Aktivität der HSP90i an der HSP90-Maschinerie durch den Einsatz von HDACi.

Die inhibitorische Aktivität der N-terminalen HSP90i NVP-AUY922 (**A**) und NVP-HSP990 (**B**) wurde mittels Luciferase-Rückfaltungs-Assay bestimmt. Als HSP90-Quelle diente Kyse510-Zellysat. Vor Gewinnung des Zellysats wurden die Kyse510 Zellen für 48 Stunden mit 10, 20 oder 31,6 nM Panobinostat inkubiert. Negativ definiert die ablaufende Reaktion ohne HSP90-Quelle. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM eines Experimentes in Duplikaten vermessen.

Die Inkubation mit den HDACi zeigte bei beiden HSP90i einen Einfluss auf die Aktivität des HSP90-Proteins. Bei NVP-AUY922 führte die Steigerung der Panobinostatkonzentration zu einer Senkung des IC_{50} -Wertes, das am Linksshift der Kurven zu erkennen ist. Ein ähnliches Bild zeigte sich beim Vermessen der Konzentrations-Effekt-Kurve von NVP-HSP990. Die Kurvenverläufe zeigten, dass durch 20 und 31,6 nM Panobinostat das BottomPlateau gesenkt wurde. Abbildung 6.66 stellt die ermittelten IC_{50} -Werte dar.

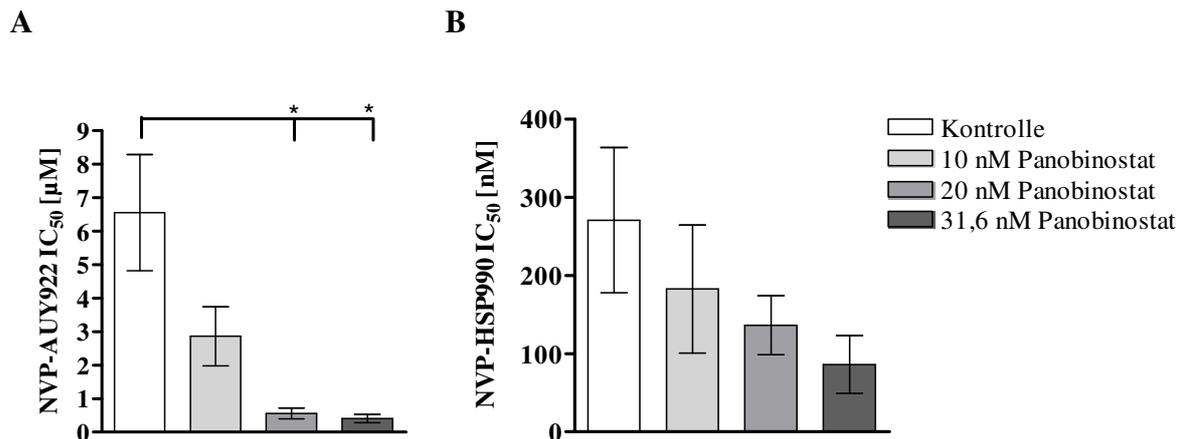


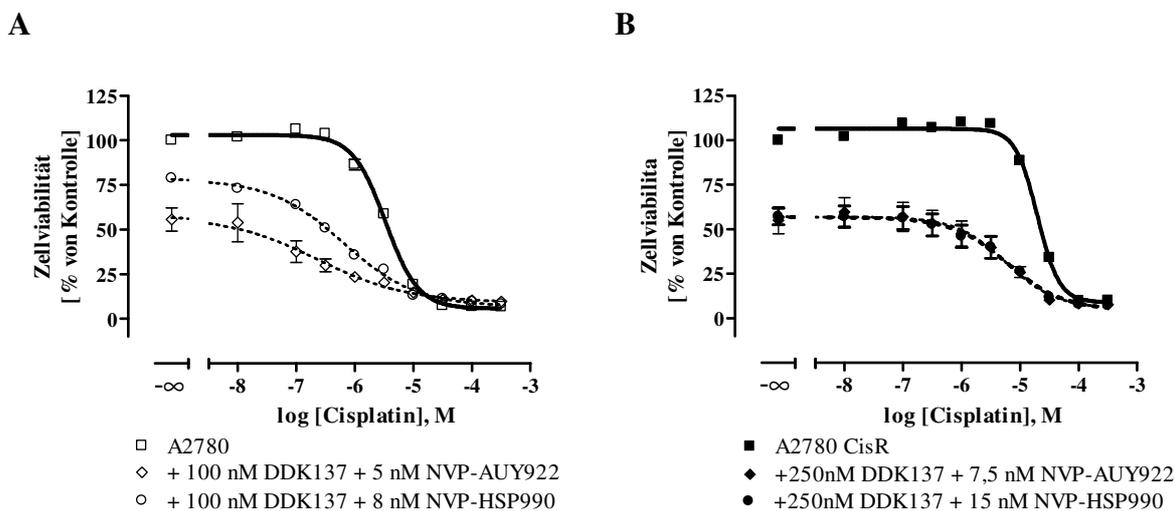
Abbildung 6.66 Effekte einer Inkubation mit Panobinostat auf die HSP90-Funktionalität.

Dargestellt sind die IC₅₀-Werte von NVP-AUY922 (A) und NVP-HSP990 (B) der in Abbildung 6.65 gezeigten Kurvenverläufe der HSP90i im Luciferase-Rückfaltungs-Assay.

Die ermittelten IC₅₀-Werte der HSP90i stimmten nicht mit den zuvor ermittelten IC₅₀-Werten überein (siehe Abbildung 6.30). Vermutlich lag dies an der Präinkubation mit dem HDACi und der somit anderen Behandlung des Zelllysates. Bei NVP-HSP990 war die Senkung des IC₅₀-Wertes nicht signifikant. Bei NVP-AUY922 führten die beiden höheren Konzentrationen von Panobinostat zu einer signifikanten Verringerung der IC₅₀-Werte. Durch den Einsatz eines HDACi kommt es zu einer Hyperacetylierung des HSP90-Proteins [Kovacs et al., 2005]. Hyperacetyliertes HSP90 weist seinerseits eine verringerte Funktionalität auf, teilweise durch verminderte ATP Affinität [Kovacs et al., 2005]. Diese verminderte Funktionalität könnte ein besseres Ansprechen auf HSP90i erklären, die im Folgenden niedrigere IC₅₀-Werte aufweisen. Dies wurde beim Vermessen der NVP-AUY922 und NVP-HSP990 Konzentrations-Effekt-Kurven im Luciferase-Rückfaltungs-Assay (Abbildung 6.65) sichtbar. Auch auf funktioneller Ebene war also eine Beeinflussung der HSP90i durch den Einsatz der HDACi zu sehen.

6.4.3.4 HSP90i in Kombination mit DDK137

Da der HDACi DDK137 zu einer erhöhten Cisplatinempfindlichkeit führte (siehe Abbildung 6.12), wurde DDK137 auch zusammen mit den bekannten HSP90i NVP-AUY922 und NVP-HSP990 zur Beeinflussung der Cisplatinempfindlichkeit getestet. Abbildung 6.67 zeigt die Ergebnisse.



C

Bedingung	A2780				A2780CisR			
	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	Sf	Sig
Kontrolle	3,34	5,48 ± 0,02	-	-	19,7	4,71 ± 0,02	-	-
NVP-AUY922	0,23	6,63 ± 0,14	14,5	***	5,79	5,24 ± 0,19	3,4	**
NVP-HSP990	0,64	6,20 ± 0,05	5,2	***	6,17	5,21 ± 0,17	3,2	*

Abbildung 6.67 Erhöhung der Cisplatinempfindlichkeit durch die Kombination von DDK137 und den HSP90i.

DDK137 wurde an A2780 (A) und A2780CisR (B) gemeinsam mit den HSP90i für 48h präinkubiert, gefolgt von einer 72-stündigen Cisplatininkubation. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte ± SEM von 3 unabhängigen Experimenten in Triplikaten. C IC₅₀-Werte sowie pIC₅₀ ± SEM von den in A und B gezeigten Kurven. Sf ist der Shiftfaktor berechnet als Quotient aus dem Kontroll-IC₅₀-Wert der unbehandelten Zelllinie und der behandelten Zelllinie, sowie Signifikanzen gekennzeichnet mit * für p<0,05, ** für p<0,01 und *** für p<0,001.

Durch die Kombination der HSP90i mit DDK137 konnte in beiden Zelllinien die Sensitivität gegenüber Cisplatin nochmals erhöht werden im Vergleich zum alleinigen Einsatz von DDK137 (siehe Abbildung 6.68). Die Kombination von DDK137 mit 5 nM NVP-AUY922 steigerte an A2780 den Shiftfaktor auf 14.

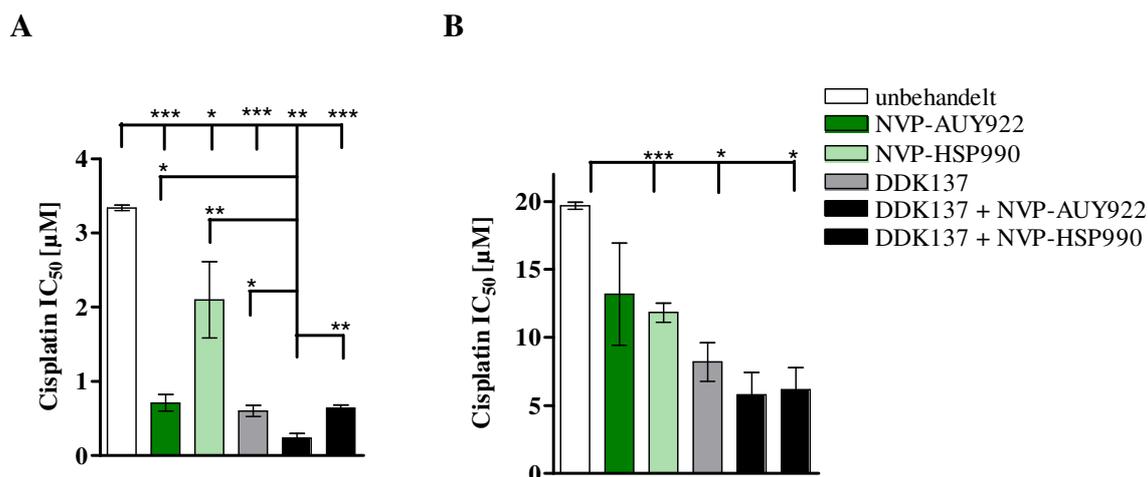


Abbildung 6.68 Effekt von DDK137 und HSP90i auf die Cisplatinempfindlichkeit von A2780 und A2780CisR.

A2780 (A) und A2780CisR (B) wurden für 48 Stunden mit DDK137 oder einer Kombination von DDK137 mit den HSP90i NVP-AUY922 oder NVP-HSP990 vor der 72-stündigen Cisplatininkubation präinkubiert. An A2780 wurden 100 nM DDK137, 5 nM NVP-AUY922 und 8 nM NVP-HSP990 eingesetzt, an A2780CisR 250 nM DDK137, 7,5 nM NVP-AUY922 und 15 nM NVP-HSP990. Dargestellt sind IC₅₀-Werte von Cisplatin ± SEM. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit * für $p > 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$.

Die Kombination des HDACi DDK137 mit dem HSP90i NVP-AUY922 steigerte die Sensitivität gegenüber Cisplatin verglichen mit alleinigem Einsatz von DDK137 bei A2780 signifikant. Ansonsten ergab die Tripeltherapie bestehend aus DDK137, HSP90i und Cisplatin keine Sensitivitätssteigerung gegenüber Cisplatin verglichen mit der alleinigen Gabe von DDK137. Ein Vorteil der Tripeltherapie können aber die im Vergleich zur dualen Therapie reduzierten Konzentrationen der HSP90i sein.

7 Diskussion

7.1 Beeinflussung der Cisplatinresistenz

Ovarialkarzinome zählen zu den fünf tödlichsten Tumoren der Frau [Wagner et al., 2013a]. Trotz neuer und verbesserter Therapieoptionen stellt die Resistenzentwicklung gegenüber platinhaltigen Zytostatika nach wie vor ein großes Problem dar [Galluzzi et al., 2014]. Aufgrund der multifaktoriellen Natur dieser Resistenzen und der sich daraus ergebenden heterogenen Patientenpopulation ist eine erfolgreiche Therapie der Rezidive erschwert und schwierig zu standardisieren. Gründe für die Resistenzen sind Mutationen und veränderte Genexpressionen in prominenten Signaltransduktionswegen, die unter anderem Veränderungen im *mismatch repair* System, in der DNA-Methylierung und der Histon-Acetylierung verursachen und über eine negative Beeinflussung der Apoptoseinduktion zu einem Therapieversagen führen können [Balch et al., 2004, Galluzzi et al., 2012]. Ebenso können aktivierte Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, wie beispielsweise IGF-1R, ErbB2 oder EGFR eine Resistenzausbildung bedingen [Hynes and Lane, 2005, Eckstein et al., 2009]. Unter diesem Aspekt könnte eine Modulation dieser Signalwege durch den Einsatz von spezifischen Inhibitoren in Kombination mit dem Zytostatikum zu einer Verbesserung der Ansprechrate der Zytostatika führen.

Beeinflussung der Cisplatinsensitivität durch die Inhibition bekannter Targets

Eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges induziert über nachgeschaltete Proteine eine erhöhte Zellproliferation und Zelldifferenzierung. Wachstumsfaktoren wie EGF oder IGF-1 sind ebenfalls in der Lage, über diesen Signaltransduktionsweg die Zellproliferation zu beeinflussen [Serra et al., 2008]. In Ovarialkarzinomen kann eine erhöhte Zellproliferation bei gleichzeitig verminderter Apoptoserate mit einer erhöhten Aktivität des PI3K/Akt-Weges korreliert werden [Li et al., 2014]. In A2780, A2780CisR und CaOV3 konnte jedoch durch den Einsatz des IGF-1R-Inhibitors NVP-AEW541 im Rahmen dieser Arbeit keine Beeinflussung der Cisplatinsensitivität erzielt werden (siehe Abbildung 6.48), obwohl der IGF-1R in A2780CisR aktiviert [Eckstein et al., 2009] und Akt deutlich phosphoryliert war (siehe Abbildung 6.19). Ebenfalls zeigte die Kombination bestehend aus dem IGF-1R-Inhibitor NVP-AEW541 und den HSP90i NVP-AUY922 oder NVP-HSP990 keinen Effekt im Hinblick auf die Cisplatinsensitivität von A2780 und A2780CisR (siehe Abbildung 6.49). Eckstein et al. konnten für die Resistenzentwicklung

von A2780 einen Zusammenhang zwischen der Entwicklung einer Cisplatinresistenz und einer Erhöhung der IGF-1R-Expression nachweisen [Eckstein et al., 2009]. Daher wurde untersucht, ob sich durch einen frühen und permanenten Einsatz eines IGF-1R-Inhibitors die Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin verhindert ließ. Diese These konnte durch eine wöchentliche Behandlung von A2780 mit Cisplatin in Gegenwart von NVP-AEW541 über einen Zeitraum von 36 Wochen nicht bestätigt werden (siehe Abbildung 6.50). Es wurde eine Subzelllinie erhalten, die einen Resistenzfaktor von 4,7 aufwies und damit in der Größenordnung der A2780CisR_{neu} lag (siehe Abbildung 7.3). Somit scheint der IGF-1R nicht alleinig für die Ausbildung der Cisplatinresistenz in A2780 verantwortlich zu sein, was den multifaktoriellen Charakter der Resistenzentwicklung unterstreicht. Dies wurde ebenfalls in unserem Arbeitskreis gezeigt, da in A2780CisR auch eine erhöhte Phosphorylierung von ErbB3 festgestellt wurde [Engelke et al., 2016].

Nach Aktivierung des IGF-1 Rezeptors spielen PI3-Kinasen und mTOR als zentrale Bestandteile eine essentielle Rolle für die weitere Signaltransduktion. Der Einsatz von mTOR-Inhibitoren zeigte jedoch eine geringere Wirksamkeit als erwartet, die durch einen negativen Feedbackmechanismus zu erklären sind. Nach Einsatz von mTOR-Inhibitoren wurde eine verminderte Inhibition von S6K auf PI3K festgestellt, welches im Folgenden durch eine erhöhte Aktivität von Akt, Erk und NFκB zu einer vermehrten Zellproliferation führte [Lang et al., 2009]. Durch die Kombination eines mTOR-Inhibitors mit einem HSP90i könnte der negative Feedbackmechanismus über Herunterregulierung der Akt-Aktivität verhindert werden und die Wirksamkeit der mTOR-Inhibitoren wieder hergestellt werden. Durch den alleinigen Einsatz des dualen PI3K- und mTOR-Inhibitors NVP-BEZ235 ließ sich jedoch keine relevante Steigerung der Cisplatinempfindlichkeit an A2780 und CaOV3 sowie deren Cisplatin-resistenten Subklonen erzielen (siehe Abbildung 6.51). Ebenso führte die Kombination aus NVP-BEZ235 und HSP90i zu keiner Steigerung der Cisplatinempfindlichkeit (siehe Tabelle 6.13). An A2780CisR wurde mit dieser Kombination jedoch eine Beeinflussung der Zytotoxizität des jeweiligen HSP90i beobachtet. Die Zytotoxizität von NVP-AUY922 konnte durch eine Präinkubation mit NVP-BEZ235 um das 3,2-fache und von NVP-HSP990 um das 2,3-fache gesteigert werden (siehe Abbildung 6.52). Dieser Effekt konnte in der Ursprungszelllinie A2780 aber nicht bestätigt werden.

Erhöhung der Cisplatinsensitivität durch die Inhibition mehrerer Signalwege durch duale Kombinationen

Durch den Einsatz des IGF-1R- und PI3K/mTOR-Inhibitors konnten entgegen der Erwartungen nur moderate Effekte im Hinblick auf die Cisplatinsensitivität von A2780 und A2780CisR erzielt werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass mit den Inhibitoren jeweils nur ein spezifisches Target zu adressieren ist. Im Rahmen der epigenetischen Modulation ist eine gleichzeitige Beeinflussung von Zielproteinen in verschiedenen Signalwegen möglich. Dies kann einer Hemmung der Zellproliferation, zu einer vermehrten Apoptoseauslösung und damit zu einem besseren Ansprechen der Zytostatika führen [Khabele, 2014, Marek et al., 2013]. Unter diesen Aspekten stellen Inhibitoren der Histondeacetylasen (HDACi) eine interessante Option zur Kombination mit Cisplatin dar. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher der bereits zugelassene pan-HDACi Panobinostat sowie der präferentielle HDAC IIa Inhibitor LMK235 (HDAC 4 und 5) aus dem Arbeitskreis von Prof. Kurz im Hinblick auf deren Einfluss auf die Cisplatinsensitivität von Ovarialkarzinomen analysiert werden. Als Modellsystem für diese Tumorentität kamen die Zelllinien A2780, CaOV3 und OVCAR3 sowie deren Cisplatin-resistente Subklone zum Einsatz. In allen drei Ovarialkarzinomzelllinien induzierten die HDACi eine erhöhte Cisplatinsensitivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (siehe Abbildung 6.1 und Tabelle 6.4). Die Cisplatinsensitivität konnte durch eine Verlängerung der Inkubationszeit des jeweiligen HDACi erhöht werden. In allen drei Zelllinien war eine 48-stündige Präinkubation einer Koinkubation oder einer 6-stündigen Präinkubation überlegen (siehe Abbildung 6.1 und Tabelle 6.4). Es konnte ferner gezeigt werden, dass eine weitere Verlängerung der Inkubationszeit von Panobinostat auf 72 Stunden an A2780CisR zu einer vollständigen Revertierung der Cisplatinresistenz mit einem korrespondierenden Shiftfaktor von 7,6 führte (siehe Abbildung 6.62). Obwohl in diesem Inkubationsmodus (Schema C) Cisplatin nur für 48 Stunden inkubiert wurde, war der IC_{50} -Wert der A2780CisR in derselben Größenordnung wie bei einer 72-stündigen Cisplatininkubation. Es konnte durch die HDACi eine Beeinflussung der sensitiven wie auch der resistenten Subklone festgestellt werden, allerdings in unterschiedlich starker Ausprägung. Bei CaOV3 und OVCAR3 war der Effekt an den Cisplatin-resistenten Zellen ausgeprägter, bei A2780 an den Cisplatin-sensitiven Zellen. An CaOV3CisR konnte durch eine 48-stündige Präinkubation mit 10 nM Panobinostat sogar eine vollständige Revertierung der Resistenz erreicht werden. Es wurde ein IC_{50} -Wert von 1,38 μ M ($p < 0,01$)

gegen CaOV3CisR mit einem IC_{50} -Wert von $5,41 \mu\text{M}$ für Cisplatin) erhalten, so dass ein Shiftfaktor von 4,1 aus dieser Behandlung resultierte. Die Steigerung der Cisplatinempfindlichkeit konnte auf eine Erhöhung der Apoptoseinduktion zurückgeführt werden (siehe Abbildung 6.3). Cisplatin und LMK235 interagierten in A2780 und A2780CisR in einer synergistischen Art und Weise (siehe Tabelle 6.5). HDACi-induzierte Veränderungen des Zellzyklus wurden nicht festgestellt (siehe Abbildung 6.4). Die HDACi-induzierte Beeinflussung der Cisplatinempfindlichkeit wurde bereits an unterschiedlichen Tumorentitäten in unserem als auch in anderen Arbeitskreisen gezeigt [Marek et al., 2013, Diedrich et al., 2016a, Ozaki et al., 2008] und konnte somit an Ovarialkarzinomzelllinien bestätigt werden.

Neben den HDACi bieten sich auch Inhibitoren des HSP90-Proteins (HSP90i) zur Modulation mehrerer Proteine an. Dies basiert auf ihren Eigenschaften zum multiplen Eingriff in die Zellhomöostase, da für das HSP90-Protein über 280 Klientproteine bekannt sind. So werden durch die Inhibition dieses Proteins die Zellviabilität und die Zellproliferation gehemmt [Tatokoro et al., 2015]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch den Einsatz der beiden N-terminalen HSP90i NVP-AUY922 und NVP-HSP990 eine Erhöhung der Cisplatinempfindlichkeit erzielt werden (siehe Abbildung 6.15 und Tabelle 6.8). An A2780 ergaben sich dabei größere Effekte als in A2780CisR. Auch hier zeigte sich analog zu den HDACi eine längere Inkubationszeit als vorteilhafter zur Beeinflussung der Cisplatinempfindlichkeit. Sowohl beim Einsatz der HDACi als auch beim Einsatz der HSP90i kann dies durch die benötigte Verdopplungszeit der Zellpopulation und die Zeit zum Durchlaufen eines kompletten Zellzyklus begründet sein (siehe Abbildung 6.2 und Abbildung 6.16), damit die Inhibitoren auf jede Zellzyklusphase einwirken können. An den anderen verwendeten Ovarialkarzinomzelllinien (CaOV3 und OVCAR3) ergaben sich nur moderate Steigerungen der Cisplatinempfindlichkeit durch den Einsatz der HSP90i (siehe Tabelle 6.8). Die HSP90i konnten die Cisplatinresistenz nicht vollständig revertieren. Die Erhöhung der Chemosensitivität durch den Einsatz eines HSP90i, die auch in anderen Arbeitsgruppen gesehen wird [Solar et al., 2007, Zhang et al., 2015], konnte somit ebenfalls an Ovarialkarzinomzellen bestätigt werden.

Erhöhung der Cisplatin sensitivität durch die Inhibition mehrerer Signalwege durch eine Tripelkombination aus HDACi, HSP90i und Cisplatin

Durch die Kombination unterschiedlicher Inhibitor Klassen könnte auf verschiedenen Ebenen auf denselben Signalweg eingegriffen werden. Somit wären additive oder synergistische Effekte beider Inhibitor Klassen denkbar [Bukowska et al., 2015]. Die Kombination von HDACi mit HSP90i führen unter anderem über eine gemeinsame Hemmung des PI3K/Akt-Signalweges zu einem verminderten Zellwachstum. Der Einsatz eines HDACi bewirkt zusätzlich eine erhöhte Acetylierung des HSP90-Proteins, das eine verminderte HSP90-Aktivität aufweist [Kovacs et al., 2005]. Außerdem führen HDACi zu einer verminderten Zellproliferation, aber auch zu einer erhöhten Transkription unterschiedlicher Gene, die zu einer erhöhten Apoptoseinduktion führen [New et al., 2012]. Abbildung 7.1 zeigt ein vereinfachtes Schema des Einflusses der HSP90i in Zusammenspiel mit den HDACi in unterschiedlichen Signalwegen.

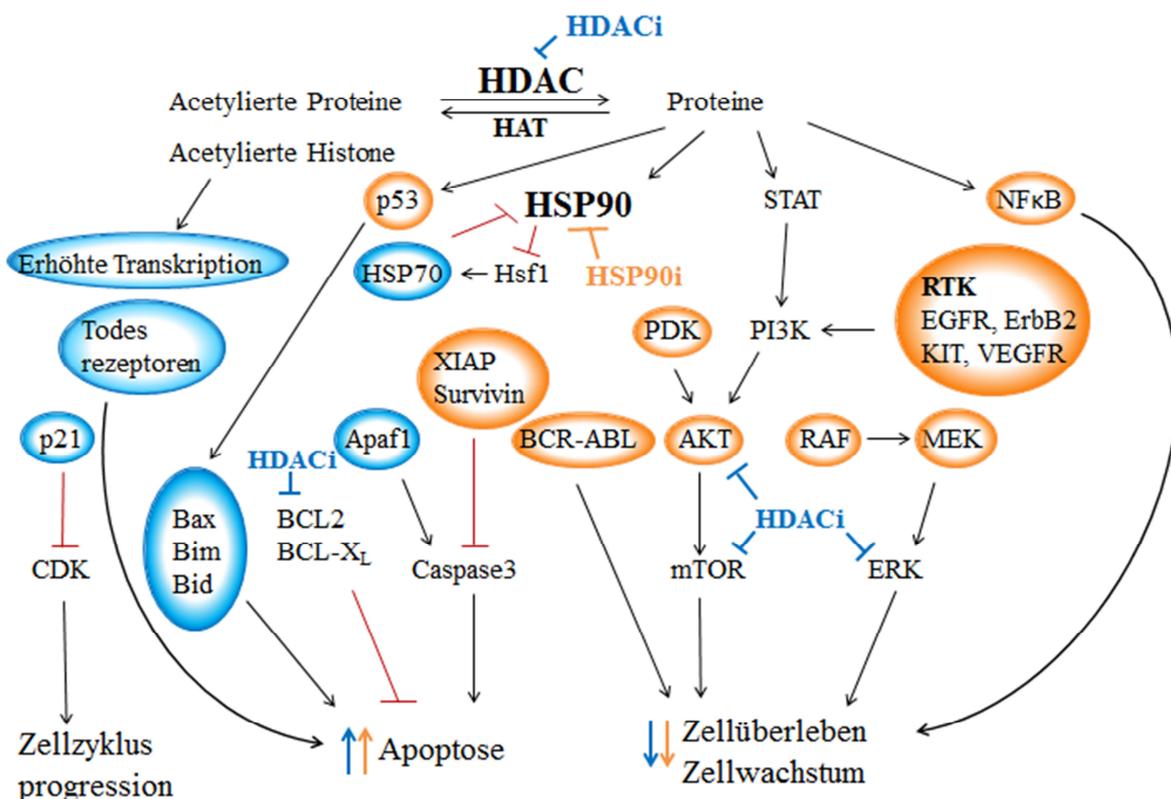


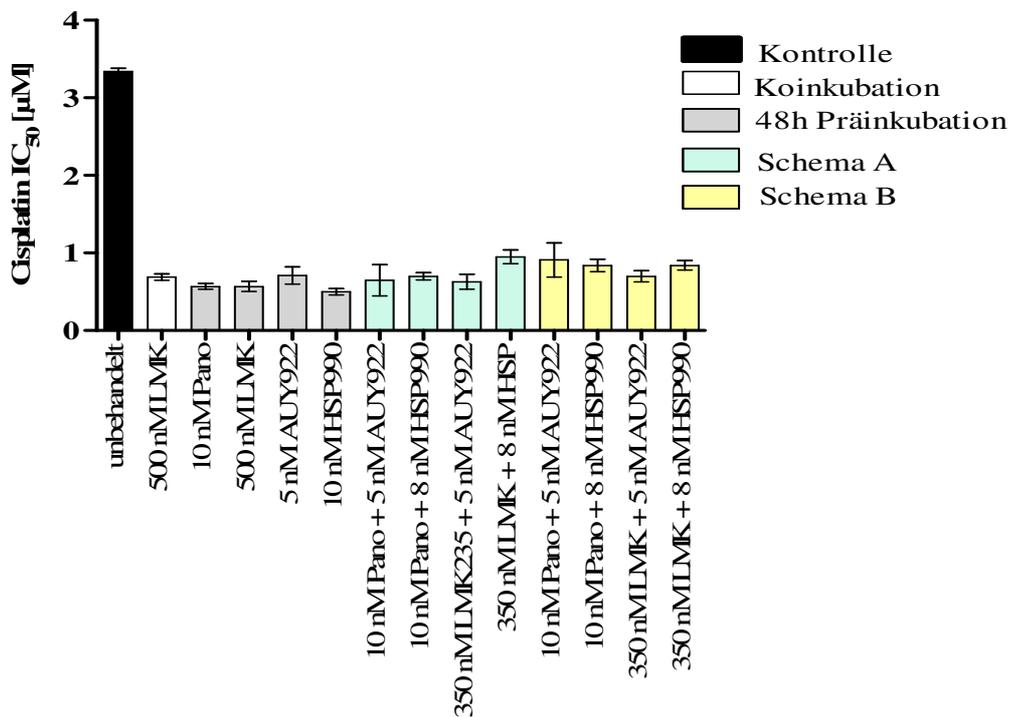
Abbildung 7.1 Beeinflussung prominenter Signaltransduktionswege durch HDACi und HSP90i.

Blau zeigt eine Induktion durch den Einsatz eines HDACi, orange zeigt eine Beeinflussung durch den Einsatz eines HSP90i. Letztendlich führen sowohl der Einsatz eines HDACi als auch der Einsatz eines HSP90i zu einer Hemmung des Zellwachstums, bei gleichzeitiger Apoptoseinduktion. Nach [Schwartz et al., 2015, Anne et al., 2013, Mimura et al., 2015, Kurundkar et al., 2013].

Letztendlich führen beide Inhibitor Klassen über unterschiedliche Wege zu einer Erhöhung der Apoptoseinduktion sowie zu einer verringerten Zellproliferation. Es kommt auch zu

Überschneidungen im Wirkmechanismus, so dass synergistische Effekte theoretisch denkbar sind. An den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Ovarialkarzinomzelllinien führte die Kombination eines HDACi mit einem HSP90i zu einer Erhöhung der Sensitivität gegenüber Cisplatin (siehe Abbildung 6.59). Die in der Tripelkombination aus HDACi, HSP90i und Cisplatin erzielbaren Effekte auf die Cisplatinsensitivität waren jedoch einer dualen Kombination von HDACi mit Cisplatin oder HSP90i mit Cisplatin nicht überlegen (siehe Abbildung 6.59). Abbildung 7.2 fasst die IC₅₀-Werte durch die unterschiedlichen Inkubationsschemata zusammen. Berücksichtigt wurden Kombinationen mit denen an A2780 Cisplatin-IC₅₀-Werte kleiner als 1 µM und an A2780CisR Cisplatin-IC₅₀-Werte kleiner 10 µM erzielt wurden.

A



B

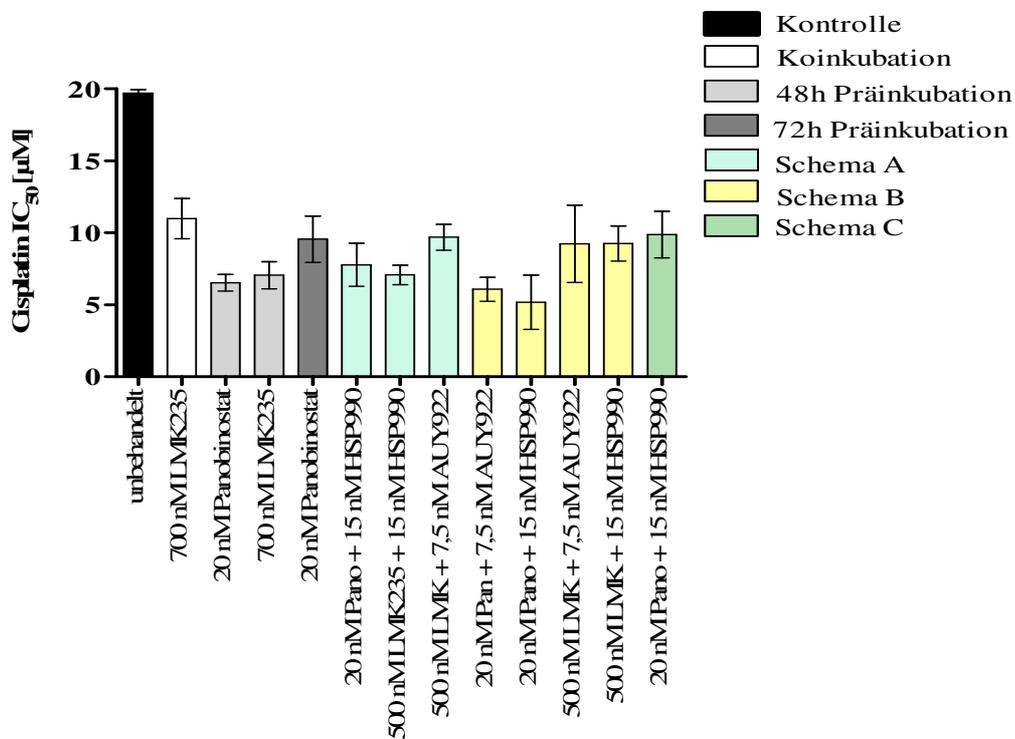


Abbildung 7.2 Effekte von HDACi und HSP90i auf die Cisplatin sensitivität von A2780 und A2780CisR.

Legende siehe S. 175

Abbildung 7.2 Effekte von HDACi und HSP90i auf die Cisplatinempfindlichkeit von A2780 und A2780CisR.

A2780 (A) und A2780CisR (B) wurden mit HDACi, HSP90i oder einer Kombination bestehend aus beiden Inhibitoren in unterschiedlichen zeitlichen Schemata präinkubiert. Daran schloss sich eine 72-stündige oder 48-stündige Cisplatininkubation an. Koinkubation = gleichzeitige Gabe mit Cisplatin für 72 Stunden. 48h Präinkubation = 48-stündige Präinkubation vor der 72-stündigen Cisplatininkubation mit dem entsprechenden Inhibitor. 72h Präinkubation = 72-stündige Präinkubation vor der 48-stündigen Cisplatininkubation mit dem entsprechenden Inhibitor. Schema A = 48-stündige Inkubation beider Inhibitoren zusammen vor der 72-stündigen Cisplatininkubation mit den entsprechenden Inhibitoren. Schema B = 48-stündige Präinkubation mit dem HDACi gefolgt von einer 72-stündigen Inkubation von Cisplatin mit dem HSP90i und dem HDACi. Schema C = 48-stündige Präinkubation mit dem HDACi, gefolgt von einer 24-stündigen Inkubation mit dem HDACi und dem HSP90i und anschließender 48-stündiger Inkubation beider Inhibitoren mit Cisplatin (siehe Abbildung 6.58). Dargestellt sind IC_{50} -Werte \pm SEM. Die gezeigten IC_{50} -Werte unterscheiden sich alle signifikant von der gezeigten unbehandelten Kontrolle. Es bestand kein signifikanter Unterschied in den IC_{50} -Werten der unterschiedlichen Behandlungen.

An A2780 wurde kein signifikanter Unterschied in den IC_{50} -Werten in Abhängigkeit von dem angewendeten Inkubationsschema oder den Kombinationen erzielt. Hervorzuheben ist allerdings das Ergebnis, das durch eine Koinkubation von 500 nM LMK235 mit Cisplatin für 72 Stunden erhalten wurde. Hier lag der IC_{50} -Wert in derselben Größenordnung, die mit den anderen Inhibitoren erst nach einer 48-stündigen Präinkubation erzielt wurde. Somit verfügt LMK235 bereits zu Beginn der Inkubation über einen ausgeprägt sensitivierenden Effekt, der im Gegensatz zu den anderen verwendeten Inhibitoren unabhängig von der Verdopplungszeit und dem Durchlaufen des Zellzyklus zu sein scheint. Eine Inkubation mit Cisplatin führt zu einem Zellzyklusarrest, so dass die gleichzeitige Gabe von LMK235 und Cisplatin dem HDACi keine Möglichkeit zum Eingriff in unterschiedliche Zellzyklusphasen gibt. An A2780CisR führte der Einsatz der HDACi im Vergleich zu den HSP90i zu einer stärkeren Absenkung des IC_{50} -Wertes für Cisplatin. Durch die alleinige Inkubation mit einem HSP90i wurde kein Cisplatin IC_{50} -Wert kleiner als 10 μ M an den A2780CisR erhalten. Eine 48-stündige Präinkubation mit einem HDACi vor der Applikation des HSP90i zusammen mit Cisplatin allerdings resultierte in allen Kombinationen (Schema B) in IC_{50} -Werten kleiner als 10 μ M. Durch eine Verlängerung der Inkubationszeit von Panobinostat von 48 auf 72 Stunden und der dadurch bedingten Verringerung der Cisplatininkubation auf 48 Stunden konnten ebenfalls IC_{50} -Werte unter 10 μ M erzielt werden. Unter dieser Inkubationsbedingung konnte eine vollständige Revertierung der Cisplatinresistenz an den A2780CisR erzielt werden, mit IC_{50} -Werten in der Größenordnung der A2780 (siehe Abbildung 6.62). Die geringen IC_{50} -Werte wurden sowohl beim Einsatz von Panobinostat alleine als auch in Kombination mit NVP-HSP900 erzielt. HDACi wiesen an A2780 und A2780CisR eine ähnlich starke Erhöhung der Cisplatinempfindlichkeit auf, während HSP90i in A2780 eine stärkere Beeinflussung der Cisplatinempfindlichkeit als in A2780CisR hervorriefen.

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass durch eine Präinkubation mit einem HDACi der zytotoxische Effekt der nachfolgend inkubierten HSP90i verstärkt werden konnte. Bei umgekehrter Inkubations-Reihenfolge wurde dies nicht beobachtet (siehe Abbildung 6.54 und Abbildung 6.55). Das epigenetische Priming mit einem HDACi zeigte einen starken Einfluss auf den Effekt der HSP90i. Dies könnte vor allem auf die Hyperacetylierung des HSP90-Proteins durch den HDACi zurückzuführen sein. Eine Hyperacetylierung führt zu einer verringerten Aktivität des HSP90-Proteins, wodurch der Einsatz eines HSP90i eine stärkere Wirksamkeit aufweist. Dies konnte ebenfalls durch eine erhöhte Apoptoseinduktion bei der Präinkubation mit dem HDACi gefolgt von der HSP90i-Inkubation beobachtet werden (siehe Abbildung 6.56). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Studien am Multiplen Myelom und Schilddrüsenkarzinomen [Kaiser et al., 2010, Kim et al., 2015]. Ein weiterer positiver Effekt der Kombination aus HDACi und HSP90i war die Möglichkeit zur Verringerung der eingesetzten Konzentrationen bedingt durch synergistische zytotoxische Effekte. Dies würde bedeuten, dass in der Klinik der Einsatz einer geringeren Konzentration womöglich mit einem verbesserten Nebenwirkungsprofil einhergehen könnte [Sidera and Patsavoudi, 2014]. Bei den eingesetzten Inhibitoren wurden in dieser Arbeit Konzentrationen zur Effektauslösung verwendet, die unter den maximal tolerierten Plasmakonzentrationen in der Klinik lagen. Für den HDACi Panobinostat lag die Plasmakonzentration der maximal tolerierten Dosierung bei 721 nM [Sharma et al., 2013]. Die höchste eingesetzte Konzentration von Panobinostat in dieser Arbeit lag bei 25 nM. Bei den HSP90i lagen die maximal tolerierten Plasmakonzentration bei 2,4 µM für NVP-AUY922 [Johnson et al., 2015] und 1,3 µM für NVP-HSP990 [Spreafico et al., 2015]. Auch hier lagen die maximal eingesetzten Konzentrationen mit 10 nM NVP-AUY922 und 15 nM NVP-HSP990 weit unter den gemessenen Plasmakonzentrationen. Obwohl bereits Konzentrationen weit unter den maximal tolerierten Plasmakonzentrationen eingesetzt wurden, konnten diese durch die Kombination der HDACi mit den HSP90i noch weiter gesenkt werden. In Kombinationsstudien wurden die Konzentrationen je nach Zelllinie auf 20 nM Panobinostat, 350 nM LMK235, 7,5 nM NVP-AUY922 und 8 nM NVP-HSP990 gesenkt.

Prävention einer Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin

Die beobachtete Hypersensitivierung der Ursprungszelllinie A2780 gegenüber Cisplatin nach einer Präinkubation mit HDACi bzw. HSP90i, führte zu der Überlegung, ob sich die Ausbildung einer Cisplatinresistenz durch eine permanente Kombination mit einem dieser

Inhibitoren verhindern ließe. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden daher Kinetiken mit wöchentlicher Cisplatingabe in permanenter Anwesenheit der HDACi Panobinostat und LMK235 sowie des HSP90i NVP-AUY922 durchgeführt. A2780 ohne Inhibitor-Zusatz diente als Kontrolle. Die vorliegenden Daten zur Resistenzentwicklung an A2780 waren nach dem D`Agostino-Pearson-Test normalverteilt, so dass zur Untersuchung der Signifikanz der Mittelwert der Resistenzfaktoren verwendet wurde. Durch einen frühen Einsatz eines HDACi während einer Cisplatinbehandlung von A2780, konnte die Ausbildung der Resistenz verhindert werden (siehe Abbildung 6.7). Dies wurde sowohl mit Panobinostat als auch mit LMK235 an A2780 erreicht. Für die Kinetiken in Gegenwart der HDACi wurden Effektstärken nach Cohen [Cohen, 1988] im Vergleich zu A2780CisR_{neu} berechnet, die größer als 0,8 waren und somit für einen starken Effekt sprechen. Es war kein signifikanter Unterschied zur unbehandelten A2780 festzustellen. Durch den Einsatz von NVP-AUY922 kam es zu einer moderateren Resistenzausbildung im Vergleich zu A2780CisR_{neu} (siehe Abbildung 6.24). Beim Einsatz von NVP-AUY922 ergab sich eine Effektstärke nach Cohen im Vergleich zu A2780CisR_{neu} von 0,73, was für einen mittleren Effekt spricht. Der Einsatz des IGF-1R-Inhibitors NVP-AEW541 führte, wie bereits oben erwähnt, im Gegensatz zu den HDACi und HSP90i zu keinem relevanten Effekt auf die Resistenzausbildung. Abbildung 7.3 fasst die finalen Resistenzfaktoren der durchgeführten Kinetiken zusammen.

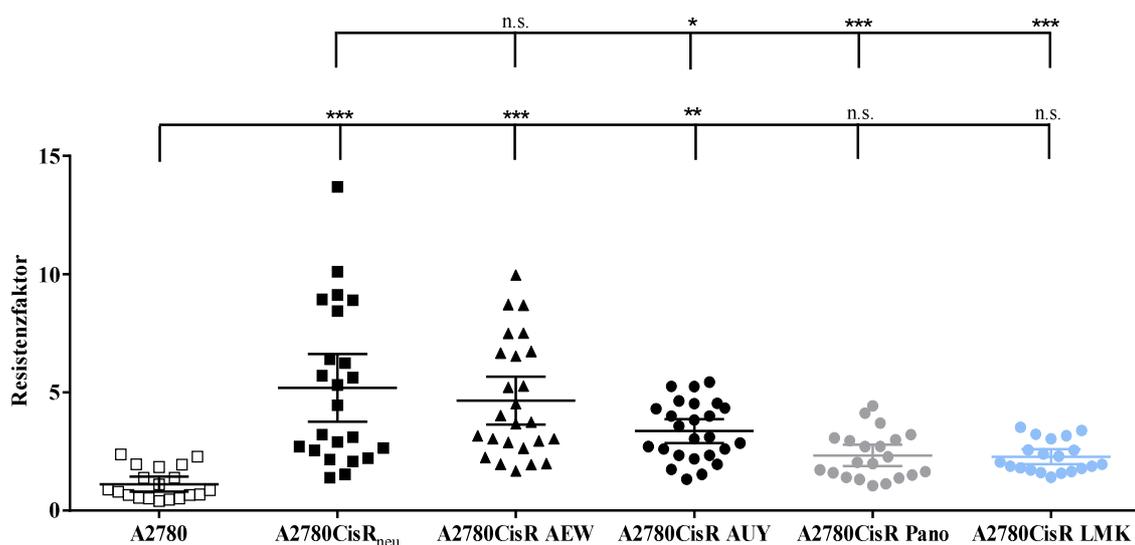


Abbildung 7.3 Generierung Cisplatin-resistenter A2780 in Anwesenheit unterschiedlicher Inhibitoren.

Legende s. S. 178

Abbildung 7.4 Generierung Cisplatin-resistenter A2780 in Anwesenheit unterschiedlicher Inhibitoren.

Gruppierung der Resistenzfaktoren ab der 22. Behandlungswoche der unterschiedlich behandelten Kinetiken. A2780 zeigt die unbehandelte Kontrolle. A2780CisR_{neu} stellt die Resistenzfaktoren in Abwesenheit eines Modulators dar. A2780CisR AEW wurde dauerhaft mit 1 μ M NVP-AEW541 während der Resistenzentwicklung kultiviert. Bei A2780CisR AUY wurden 3 nM NVP-AUY922, bei A2780CisR Pano 5 nM Panobinostat und bei A2780CisR LMK 200 nM LMK235 eingesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM der Resistenzfaktoren. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit * für $p < 0,05$, ** für $p > 0,01$ und *** für $p < 0,001$, nicht signifikante Unterschiede mit n.s.. Alle Datensätze sind normalverteilt (D'Agostino & Pearson normality test, Graph Pad Prism).

Interessanterweise konnte im Laufe der Kinetik mit den HDACi eine Toleranzentwicklung gegenüber dem eingesetzten HDACi beobachtet werden (siehe Abbildung 6.8, Abbildung 6.9 und Abbildung 6.10). Der IC₅₀-Wert für Panobinostat stieg von 28,1 nM an unbehandelten A2780 auf einen finalen Wert nach 53 Wochen permanenter Inkubation mit Panobinostat auf 466 nM. Erstaunlicherweise konnte die Cisplatinempfindlichkeit während dieser Zeit mit einer Konzentration von 5 nM Panobinostat aufrechterhalten werden (siehe Abbildung 6.8). Ähnliches wurde ebenfalls bei dem Einsatz von LMK235 beobachtet. Resistenzen gegenüber HDACi spielen vermutlich eine Rolle, wenn in der Klinik geringe Effekte mit den HDACi gesehen werden, da intrinsische Resistenzen gegenüber den HDACi bekannt sind [Fantin and Richon, 2007]. Dedes et al. zeigten, dass der Einsatz von Vorinostat über 7 Wochen an der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 zu einer 14-fachen Erhöhung des Vorinostat IC₅₀-Wertes führte [Dedes et al., 2009]. Ebenfalls bildeten akute myeloische Leukämiezellen eine Resistenz gegenüber dem eingesetzten HDACi Dacinostat aus [Fiskus et al., 2008]. Es sind sogar Kreuzresistenzen zu anderen HDACi bekannt [Dedes et al., 2009]. Dies könnte an den neu generierten HDACi-resistenten Zellen A2780CisR Pano und A2780CisR LMK zukünftig untersucht werden. Ebenso berichteten Fiskus et al. von einer verminderten HDAC6-Expression in HDACi-resistenten Zellen. Dies führte zu einer Hyperacetylierung des HSP90-Proteins und sogar zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber dem HSP90i 17-AAG [Fiskus et al., 2008]. Eine Testung von HSP90i an den neu generierten Zelllinien wäre ebenfalls denkbar, um die Theorie von Fiskus et al. zu bestätigen. Für die Behandlung des Ovarialkarzinoms ist jedoch festzustellen, dass eine Kombinationstherapie bestehend aus Cisplatin und einem HDACi eine Resistenzentwicklung gegen das Zytostatikum verhindern bzw. das Ausmaß der Resistenz verringern kann. Bei Ausbildung einer Resistenz gegenüber dem HDACi im Laufe der Therapie wird die Cisplatinempfindlichkeit nicht negativ beeinflusst, so dass sich die Kombinationstherapie als eine neue Behandlungsoption empfiehlt.

7.2 Charakterisierung neuer Wirkstoffe

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben den etablierten Inhibitoren auch neu entwickelte Substanzen auf ihre HSP90-inhibierenden bzw. Cisplatin-sensitivierenden Effekte untersucht.

Trispyrimidonamide als potentielle C-terminale HSP90i

Die Aktivierung des HSR-Systems durch einen HSP90i-Einsatz führt zu einer Hochregulierung von HSP70 und vermindert somit die Wirkung der HSP90i. Bislang zeigen C-terminale Inhibitoren keine Hochregulierung des HSP70-Proteins. Dies würde in der Klinik für einen besseren Effekt der HSP90-Hemmung sprechen [Donnelly and Blagg, 2008]. Die LSK-Substanzen (siehe Abbildung 6.31) wurden konzipiert und synthetisiert, um zwischen den α -Helices des C-Terminus des HSP90-Proteins zu binden und somit die Protein-Protein-Interaktion während der Dimerisierung zu stören [Ciglia et al., 2014, Spanier et al., 2014]. Es handelt sich dabei um Trispyrimidonamide, die eine $i, i + 4, i + 8$ Konformation annehmen können. Durch Energieberechnungen zur Vorhersage von Protein-Ligand-Interaktionen mit der MM-GB/SA Methode wurden im C-Terminus des HSP90-Proteins L-Leucin, L-Tyrosin und L-Isoleucin als sogenannte Hotspots für die Dimerisierung identifiziert [Ciglia et al., 2014]. Diese wurden durch Isopropyl-, Isobutyl-, sec-Butyl- und 4-Hydroxybenzylsubstituenten in den Seitenketten der LSK-Substanzen adressiert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die LSK-Substanzen in der Lage sind, die HSP90-vermittelte Luciferase-Rückfaltung zu verhindern. Dafür wurde ein Assay etabliert, der als HSP90-Quelle ein Zelllysate von Kyse510 verwendet. Der Assay zeigte unterschiedliche Kurvenverläufe für die Art der Inhibition auf. Der C-terminale Inhibitor Novobiocin war in der Lage, die ablaufende Reaktion vollständig zu hemmen, während die N-terminalen Inhibitoren NVP-AUY922 und NVP-HSP990 die Luciferase-bedingte Lumineszenz lediglich zu etwa 50% inhibierten. Daher ließ sich der Luciferase-Rückfaltungs-Assay verwenden, um einen Hinweis auf die Art der Inhibition zu erhalten. Die Ergebnisse bestätigen publizierte Daten von Sadikot et al., die ebenfalls eine unterschiedliche Inhibition je nach Inhibitionsart aufzeigten [Sadikot et al., 2013]. Dafür verwendeten Sadikot et al. stabil transfizierte Zellen mit dem Luc2/Cherry Gen, die anschließend hitzedenaturiert wurden. Durch die Zugabe des Assaypuffers mit Luciferin wurde die ablaufende Reaktion gestartet. Zur Testung der N-terminalen HSP90i wurden NVP-AUY922, 17-AAG und BIIB021 eingesetzt, als C-terminale HSP90i wurden Novobiocin und einige Analoga verwendet. Sadikot et al. berichten über IC_{50} -Werte von

NVP-AUY922 zwischen 60-500 nM in Abhängigkeit der verwendeten Zelllinie. Der im Rahmen dieser Arbeit etablierte Assay ermittelte IC_{50} -Wert für NVP-AUY922 lag mit 200 nM in der Größenordnung der publizierten Werte. Der etablierte Assay konnte folglich zur Detektion der inhibitorischen Aktivität gegenüber der HSP90-Maschinerie verwendet werden und Hinweise auf die Art der Inhibition geben. Beim Vergleich der sich ergebenden Konzentrations-Effekt-Kurven der LSK-Substanzen wurde ein Kurvenverlauf ermittelt, der auf C-terminale Inhibitoren hindeutet (siehe Abbildung 6.30, Abbildung 6.37). Dies war der erste Hinweis, dass die LSK-Substanzen den C-Terminus inhibieren. Es ergaben sich jedoch im Vergleich zu den N-terminalen Inhibitoren hohe IC_{50} -Werte für die Hemmung des HSP90-Proteins. Die potenteste Substanz LSK082 erzielte einen IC_{50} -Wert von 125 μ M (siehe Abbildung 6.37E). Ebenso konnte gezeigt werden, dass LSK082 in der Lage war, die Dimerisierung des HSP90-Proteins zu hemmen (siehe Abbildung 6.38). Yin et al., die mit dem reinen HSP90-Protein arbeiteten, sahen bei der Analyse des HSP90-Komplexes nicht nur Dimere, sondern auch Tetramere. Durch den Einsatz von Epigallocatechin wurde die Bildung der Di- und Tetramere vermindert [Yin et al., 2009]. Durch die Testung im Zelllysats in dieser Arbeit ergaben sich Oligomerbanden im höheren kDa-Bereich, die durch die Anwesenheit der Cochaperone der HSP90-Maschinerie erklärt werden können (siehe Abbildung 6.38). Dies lässt keine direkten Rückschlüsse auf die Hemmung der Dimerisierung zu. Jedoch konnte eine Reduzierung der Oligomerisierung festgestellt werden. Die beiden Assays lieferten Hinweise darauf, dass eine Hemmung des C-Terminus wahrscheinlich ist. Als abschließenden Beweis für die Interaktion der LSK-Substanzen am C-Terminus des HSP90-Proteins könnte der Dimerisierungsassay vergleichend mit dem reinen HSP90-Protein und der C-terminalen Domäne des HSP90-Proteins durchgeführt werden. Eine verminderte Dimerisierung unter beiden Bedingungen würde für eine Interaktion am C-Terminus sprechen. In anderen Arbeitskreisen wurden die LSK-Substanzen ebenfalls untersucht. Vorläufige, nicht publizierte Ergebnisse lassen darauf deuten, dass auch hier Hinweise für eine C-Terminus vermittelte Inhibition erhalten wurden [Bopp et al., 2016]. Es wurden auch andere mögliche Wirkmechanismen an den LSK-Substanzen getestet, jedoch konnte kein signifikanter Einfluss auf die Membranintegrität und nur mit hohen Konzentrationen eine Senkung des Mitochondrienpotential festgestellt werden (siehe Abbildung 6.40 und Abbildung 6.41). Der potentielle HSP90i LSK082 führte zu einer 2,4-fachen Erhöhung der Cisplatinsensitivität in A2780 (siehe Abbildung 6.32). Zudem induzierte LSK082 eine Abnahme der Akt-Expression (siehe Abbildung 6.39), wie es auch bei den bekannten N-

terminalen HSP90i zu sehen war. Mehrere Studien zeigen bereits, dass durch den Einsatz von C-terminalen HSP90i der Feedbackmechanismus über das Hsf1-Protein verhindert wird, mit der Folge eines verbesserten Ansprechens auf HSP90i [Donnelly and Blagg, 2008]. Diese Arbeit unterstützt die These, dass HSP90i unabhängig davon ob N- oder C-terminale Inhibitoren vorliegen, ein Potential bei Kombinationsbehandlungen in der Therapie von Ovarialkarzinomen besitzen.

α -Aminoxyoligopeptide als HSP90i mit membranolytischen Effekten

Hexamere und dekamere α -Aminoxyoligopeptide (siehe Abbildung 6.42) zeigten nur eine mäßige Hemmung der HSP90-vermittelten Luciferase-Rückfaltung (siehe Abbildung 6.45). Es war zwar wie bei LSK082 eine C-terminale Hemmung aus den Kurvenverläufen zu erkennen, jedoch korrelierten die ermittelten zytotoxischen IC_{50} -Werte nicht mit denen der HSP90-Hemmung. Es wurde auch keine verminderte Dimerisierung des HSP90-Proteins gesehen (siehe Abbildung 6.46). Daher wurde ein anderer Wirkmechanismus vermutet. Auffällig war, dass die Dekamere deutlich zytotoxischer als die Hexamere waren (siehe Tabelle 6.11). Die Kristallstruktur des Hexamers DDK38Phth zeigte eine 2_8 -helikale Struktur des α -Aminoxyoligopeptids. Über den Vergleich der CD-Spektren konnte eine 2_8 -helikale Struktur auch für die Dekamere bestätigt werden [Diedrich et al., 2016b]. Gavenonis et al. zeigten, dass eine helikale Peptidstruktur in der Lage ist membranolytische Effekte auszulösen [Gavenonis et al., 2014]. Daher wurde die Beeinflussung der Membranintegrität durch die α -Aminoxyoligopeptide untersucht. Im Gegensatz zu den Hexameren zeigten die Dekamere eine Membranschädigung (siehe Abbildung 6.47). Durch CD-Spektroskopie in Anwesenheit von Liposomen zur Simulation einer Membran wurde festgestellt, dass die Neigung zur Ausbildung einer 2_8 -helikalen Konformation bei den Dekameren ausgeprägter war als bei den Hexameren [Diedrich et al., 2016b]. Dies erklärt, warum nur die Dekamere eine Schädigung der Membranintegrität aufwiesen und damit im Vergleich zu den Hexameren eine deutlich höhere Zytotoxizität aufwiesen (siehe Abbildung 6.47 und Tabelle 6.11). Eine Beeinflussung der Cisplatinempfindlichkeit konnte durch den Einsatz der DDK-Substanzen nicht festgestellt werden (siehe Abbildung 6.43). Ausbleibend sind weitere Untersuchungen, die die Wirkung der Hexamere aufklären. Da auch einige Hexamere zytotoxische IC_{50} -Werte im einstelligen μ M-Bereich aufwiesen (siehe Tabelle 6.11), ist es wahrscheinlich, dass zusätzlich zur schwachen Hemmung des HSP90-Proteins weitere Wirkmechanismen eine Rolle spielen.

DDK137 zur Erhöhung der Cisplatinsensitivität

DDK137 war der einzige neue HDACi, der im Zuge dieser Arbeit getestet wurde. Er besaß an den Nicht-Tumorzellen HEK293 die höchste Zytotoxizität, ohne jedoch in Kombination mit Cisplatin dessen Sensitivität zu beeinflussen. Außerdem wies DDK137 im Gegensatz zu den anderen getesteten HDACi eine höhere Zytotoxizität an A2780 Zellen im Vergleich zu den A2780CisR auf. Es stellte sich heraus, dass dieser HDACi in der Lage war, die Sensitivität gegenüber Cisplatin an A2780 und A2780CisR deutlich zu erhöhen (siehe Abbildung 6.12). Darüber hinaus konnte die Steigerung der Cisplatinsensitivität durch die Kombination mit dem HSP90i NVP-AUY922 an A2780 erhöht werden (siehe Abbildung 6.67 und Abbildung 6.68). Eine vollständige Revertierung der Cisplatinresistenz in Analogie zu Panobinostat an CaOV3 war mit DDK137 nicht möglich. Erste Analysen ergaben für DDK137 eine Apoptoseinduktion alleine als auch in Kombination mit Cisplatin (siehe Abbildung 6.13). Es kam hier wiederum zu keiner Beeinflussung der Zellzyklusverteilung. DDK137 könnte ein potentieller neuer HDACi sein, der sich im Rahmen von Kombinationstherapien einsetzen läßt.

Literaturverzeichnis

- Ali, M. M., Roe, S. M., Vaughan, C. K., Meyer, P., Panaretou, B., Piper, P. W., Prodromou, C. & Pearl, L. H. **2006**. Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature*, 440, 1013-1017.
- Allan, R. K., Mok, D., Ward, B. K. & Ratajczak, T. **2006**. Modulation of chaperone function and cochaperone interaction by novobiocin in the C-terminal domain of Hsp90: evidence that coumarin antibiotics disrupt Hsp90 dimerization. *J Biol Chem*, 281, 7161-7171.
- Anne, M., Sammartino, D., Barginear, M. F. & Budman, D. **2013**. Profile of panobinostat and its potential for treatment in solid tumors: an update. *Oncotargets Ther*, 6, 1613-1624.
- Balch, C., Huang, T. H., Brown, R. & Nephew, K. P. **2004**. The epigenetics of ovarian cancer drug resistance and resensitization. *Am J Obstet Gynecol*, 191, 1552-1572.
- Bali, P., Pranpat, M., Bradner, J., Balasis, M., Fiskus, W., Guo, F., Rocha, K., Kumaraswamy, S., Boyapalle, S., Atadja, P., Seto, E. & Bhalla, K. **2005**. Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem*, 280, 26729-26734.
- Banerji, U., Sain, N., Sharp, S. Y., Valenti, M., Asad, Y., Ruddle, R., Raynaud, F., Walton, M., Eccles, S. A., Judson, I., Jackman, A. L. & Workman, P. **2008**. An in vitro and in vivo study of the combination of the heat shock protein inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin and carboplatin in human ovarian cancer models. *Cancer Chemother Pharmacol*, 62, 769-778.
- Bolden, J. E., Peart, M. J. & Johnstone, R. W. **2006**. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 5, 769-784.
- Bopp, B., Ciglia, E., Ouald-Chaib, A., Groth, G., Gohlke, H. & Jose, J. **2016**. Design and biological testing of peptidic dimerization inhibitors of human Hsp90 that target the C-terminal domain. *Biochim Biophys Acta*, 1860, 1043-1055.
- Bukowska, B., Gajek, A. & Marczak, A. **2015**. Two drugs are better than one. A short history of combined therapy of ovarian cancer. *Contemp Oncol (Pozn)*, 19, 350-353.
- Burger, H., Loos, W. J., Eechoute, K., Verweij, J., Mathijssen, R. H. & Wiemer, E. A. **2011**. Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. *Drug Resist Updat*, 14, 22-34.

- Butler, K. V., Kalin, J., Brochier, C., Vistoli, G., Langley, B. & Kozikowski, A. P. **2010**. Rational design and simple chemistry yield a superior, neuroprotective HDAC6 inhibitor, tubastatin A. *J Am Chem Soc*, 132, 10842-10846.
- Butler, L. M., Ferraldeschi, R., Armstrong, H. K., Centenera, M. M. & Workman, P. **2015**. Maximizing the Therapeutic Potential of HSP90 Inhibitors. *Mol Cancer Res*, 13, 1445-1451.
- Cannistra, S. A. **2004**. Cancer of the ovary. *N Engl J Med*, 351, 2519-2529.
- Chen, H. H. & Kuo, M. T. **2010**. Role of glutathione in the regulation of Cisplatin resistance in cancer chemotherapy. *Met Based Drugs*, 2010, 1-7.
- Chou, T. C. **2010**. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res*, 70, 440-446.
- Chuang, D. M., Leng, Y., Marinova, Z., Kim, H. J. & Chiu, C. T. **2009**. Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. *Trends Neurosci*, 32, 591-601.
- Ciglia, E., Vergin, J., Reimann, S., Smits, S. H., Schmitt, L., Groth, G. & Gohlke, H. **2014**. Resolving hot spots in the C-terminal dimerization domain that determine the stability of the molecular chaperone Hsp90. *PLoS One*, 9, 1-12.
- Cohen, J. **1988**. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*, Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates.
- Dabholkar, M., Bostick-Bruton, F., Weber, C., Bohr, V. A., Egwuagu, C. & Reed, E. **1992**. ERCC1 and ERCC2 expression in malignant tissues from ovarian cancer patients. *J Natl Cancer Inst*, 84, 1512-1517.
- Darzynkiewicz, Z. & Juan, G. **2001**. Overview of nucleic acid analysis. *Curr Protoc Cytom*, Chapter 7, Unit 7.1.
- Dasari, S. & Tchounwou, P. B. **2014**. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*, 740, 364-378.
- Davis, A., Tinker, A. V. & Friedlander, M. **2014**. "Platinum resistant" ovarian cancer: what is it, who to treat and how to measure benefit? *Gynecol Oncol*, 133, 624-631.
- Dedes, K. J., Dedes, I., Imesch, P., Von Bueren, A. O., Fink, D. & Fedier, A. **2009**. Acquired vorinostat resistance shows partial cross-resistance to 'second-generation' HDAC inhibitors and correlates with loss of histone acetylation and apoptosis but not with altered HDAC and HAT activities. *Anticancer Drugs*, 20, 321-333.

- Diedrich, D., Hamacher, A., Gertzen, C. G., Alves Avelar, L. A., Reiss, G. J., Kurz, T., Gohlke, H., Kassack, M. U. & Hansen, F. K. **2016a**. Rational design and diversity-oriented synthesis of peptoid-based selective HDAC6 inhibitors. *Chem Commun (Camb)*, 52, 3219-3222.
- Diedrich, D., Moita, A. J. R., R  ther, A., Frieg, B., Reiss, G. J., Hoepfner, A., Kurz, T., Gohlke, H., Lüdeke, S., Kassack, M. U. & Hansen, F. K. **2016b**. α -Aminoxy Oligopeptides: Synthesis, Secondary Structure, and Cytotoxicity of a New Class of Anticancer Foldamers. *Chemistry – A European Journal*, 17600-17611.
- Donnelly, A. & Blagg, B. S. **2008**. Novobiocin and additional inhibitors of the Hsp90 C-terminal nucleotide-binding pocket. *Curr Med Chem*, 15, 2702-2717.
- Dowdy, S. C., Jiang, S., Zhou, X. C., Hou, X., Jin, F., Podratz, K. C. & Jiang, S. W. **2006**. Histone deacetylase inhibitors and paclitaxel cause synergistic effects on apoptosis and microtubule stabilization in papillary serous endometrial cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 5, 2767-2776.
- Eccles, S. A., Massey, A., Raynaud, F. I., Sharp, S. Y., Box, G., Valenti, M., Patterson, L., De Haven Brandon, A., Gowan, S., Boxall, F., Aherne, W., Rowlands, M., Hayes, A., Martins, V., Urban, F., Boxall, K., Prodromou, C., Pearl, L., James, K., Matthews, T. P., Cheung, K. M., Kalusa, A., Jones, K., McDonald, E., Barril, X., Brough, P. A., Cansfield, J. E., Dymock, B., Drysdale, M. J., Finch, H., Howes, R., Hubbard, R. E., Surgenor, A., Webb, P., Wood, M., Wright, L. & Workman, P. **2008**. NVP-AUY922: a novel heat shock protein 90 inhibitor active against xenograft tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Cancer Res*, 68, 2850-2860.
- Eckl, J. M. & Richter, K. **2013**. Functions of the Hsp90 chaperone system: lifting client proteins to new heights. *Int J Biochem Mol Biol*, 4, 157-165.
- Eckstein, N., Servan, K., Hildebrandt, B., Politz, A., Von Jonquieres, G., Wolf-Kummeth, S., Napierski, I., Hamacher, A., Kassack, M. U., Budczies, J., Beier, M., Dietel, M., Royer-Pokora, B., Denkert, C. & Royer, H. D. **2009**. Hyperactivation of the insulin-like growth factor receptor I signaling pathway is an essential event for cisplatin resistance of ovarian cancer cells. *Cancer Res*, 69, 2996-3003.
- Ehrenberg, B., Montana, V., Wei, M. D., Wuskell, J. P. & Loew, L. M. **1988**. Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes. *Biophys J*, 53, 785-794.
- Engelke, L. H., Hamacher, A., Proksch, P. & Kassack, M. U. **2016**. Ellagic Acid and Resveratrol Prevent the Development of Cisplatin Resistance in the Epithelial Ovarian Cancer Cell Line A2780. *J Cancer*, 7, 353-363.
- Fantin, V. R. & Richon, V. M. **2007**. Mechanisms of resistance to histone deacetylase inhibitors and their therapeutic implications. *Clin Cancer Res*, 13, 7237-7242.

- Fedier, A. & Fink, D. **2004**. Mutations in DNA mismatch repair genes: implications for DNA damage signaling and drug sensitivity (review). *Int J Oncol*, 24, 1039-1047.
- Fink, D., Aebi, S. & Howell, S. B. **1998**. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin Cancer Res*, 4, 1-6.
- Fiskus, W., Rao, R., Fernandez, P., Herger, B., Yang, Y., Chen, J., Kolhe, R., Mandawat, A., Wang, Y., Joshi, R., Eaton, K., Lee, P., Atadja, P., Peiper, S. & Bhalla, K. **2008**. Molecular and biologic characterization and drug sensitivity of pan-histone deacetylase inhibitor-resistant acute myeloid leukemia cells. *Blood*, 112, 2896-2905.
- Ford, S. R. & Leach, F. R. **1998**. Improvements in the application of firefly luciferase assays. *Methods Mol Biol*, 102, 3-20.
- Fung-Kee-Fung, M., Oliver, T., Elit, L., Oza, A., Hirte, H. W. & Bryson, P. **2007**. Optimal chemotherapy treatment for women with recurrent ovarian cancer. *Curr Oncol*, 14, 195-208.
- Galam, L., Hadden, M. K., Ma, Z., Ye, Q. Z., Yun, B. G., Blagg, B. S. & Matts, R. L. **2007**. High-throughput assay for the identification of Hsp90 inhibitors based on Hsp90-dependent refolding of firefly luciferase. *Bioorg Med Chem*, 15, 1939-1946.
- Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., Castedo, M. & Kroemer, G. **2012**. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, 31, 1869-1883.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Michels, J., Brenner, C., Szabadkai, G., Harel-Bellan, A., Castedo, M. & Kroemer, G. **2014**. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis*, 5, e1257.
- Gavenonis, J., Jonas, N. E. & Kritzer, J. A. **2014**. Potential C-terminal-domain inhibitors of heat shock protein 90 derived from a C-terminal peptide helix. *Bioorg Med Chem*, 22, 3989-3993.
- George, P., Bali, P., Annavarapu, S., Scuto, A., Fiskus, W., Guo, F., Sigua, C., Sondarva, G., Moscinski, L., Atadja, P. & Bhalla, K. **2005**. Combination of the histone deacetylase inhibitor LBH589 and the hsp90 inhibitor 17-AAG is highly active against human CML-BC cells and AML cells with activating mutation of FLT-3. *Blood*, 105, 1768-1776.
- Gloesenkamp, C., Nitzsche, B., Lim, A. R., Normant, E., Vosburgh, E., Schrader, M., Ocker, M., Scherubl, H. & Hopfner, M. **2012**. Heat shock protein 90 is a promising target for effective growth inhibition of gastrointestinal neuroendocrine tumors. *Int J Oncol*, 40, 1659-1667.

- Gosepath, E. M., Eckstein, N., Hamacher, A., Servan, K., Von Jonquieres, G., Lage, H., Gyorffy, B., Royer, H. D. & Kassack, M. U. **2008**. Acquired cisplatin resistance in the head-neck cancer cell line Cal27 is associated with decreased DKK1 expression and can partially be reversed by overexpression of DKK1. *Int J Cancer*, 123, 2013-2019.
- Haakenson, J. & Zhang, X. **2013**. HDAC6 and ovarian cancer. *Int J Mol Sci*, 14, 9514-9535.
- Heinke, R. & Sippl, W. **2010**. Entwicklung von Histon-Desacetylaseinhibitoren. Potente Wirkstoffe vor allem bei Krebserkrankungen. *Pharmazie in unserer Zeit*, 39, 183-189.
- Hentze, N., Le Breton, L., Wiesner, J., Kempf, G. & Mayer, M. P. **2016**. Molecular mechanism of thermosensory function of human heat shock transcription factor Hsf1. *Elife*, 5, 1-24.
- Huober, J., Grischke, E.-M. & Marmé, A. **2010**. *Die Onkologie*, Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Hynes, N. E. & Lane, H. A. **2005**. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 5, 341-354.
- Ishida, S., McCormick, F., Smith-Mccune, K. & Hanahan, D. **2010**. Enhancing tumor-specific uptake of the anticancer drug cisplatin with a copper chelator. *Cancer Cell*, 17, 574-583.
- Jin, K. L., Pak, J. H., Park, J.-Y., Choi, W. H., Lee, J.-Y., Kim, J.-H. & Nam, J.-H. **2008**. Expression profile of histone deacetylases 1, 2 and 3 in ovarian cancer tissues. *J Gynecol Oncol*, 19, 185-190.
- Johnson, M. L., Yu, H. A., Hart, E. M., Weitner, B. B., Rademaker, A. W., Patel, J. D., Kris, M. G. & Riely, G. J. **2015**. Phase I/II Study of HSP90 Inhibitor AUY922 and Erlotinib for EGFR-Mutant Lung Cancer With Acquired Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors. *J Clin Oncol*, 33, 1666-1673.
- Juengel, E., Makarevic, J., Tsauro, I., Bartsch, G., Nelson, K., Haferkamp, A. & Blaheta, R. A. **2013**. Resistance after chronic application of the HDAC-inhibitor valproic acid is associated with elevated Akt activation in renal cell carcinoma in vivo. *PLoS One*, 8, 1-6.

- Kaatsch, P., Spix, C., Hentschel, S., Katalinic, A., Luttmann, S., Stegmaier, C., Caspritz, S., Cernaj, J., Ernst, A., Folkerts, J., Hansmann, J., Kranzhöfer, K., Krieghoff-Henning, E., Kunz, B., Penzkofer, A., Treml, K., Wittenberg, K., Baras, N., Barnes, B., Bertz, J., Buttman-Schweiger, N., Dahm, S., Franke, M., Haberland, J., Kraywinkel, K., Wienecke, A. & Wolf, U. **2015**. Krebs in Deutschland 2011/2012, 10. Ausgabe. *Robert-Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.*, 90-94.
- Kaiser, M., Lamottke, B., Mieth, M., Jensen, M. R., Quadt, C., Garcia-Echeverria, C., Atadja, P., Heider, U., Von Metzler, I., Turkmen, S. & Sezer, O. **2010**. Synergistic action of the novel HSP90 inhibitor NVP-AUY922 with histone deacetylase inhibitors, melphalan, or doxorubicin in multiple myeloma. *Eur J Haematol*, 84, 337-344.
- Kalin, J. H. & Bergman, J. A. **2013**. Development and therapeutic implications of selective histone deacetylase 6 inhibitors. *J Med Chem*, 56, 6297-6313.
- Kamal, A., Thao, L., Sensintaffar, J., Zhang, L., Boehm, M. F., Fritz, L. C. & Burrows, F. J. **2003**. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature*, 425, 407-410.
- Kelland, L. **2007**. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, 7, 573-584.
- Khabele, D. **2014**. The therapeutic potential of class I selective histone deacetylase inhibitors in ovarian cancer. *Front Oncol*, 4, 1-8.
- Khabele, D., Son, D. S., Parl, A. K., Goldberg, G. L., Augenlicht, L. H., Mariadason, J. M. & Rice, V. M. **2007**. Drug-induced inactivation or gene silencing of class I histone deacetylases suppresses ovarian cancer cell growth: implications for therapy. *Cancer Biol Ther*, 6, 795-801.
- Khan, N., Jeffers, M., Kumar, S., Hackett, C., Boldog, F., Khramtsov, N., Qian, X., Mills, E., Berghs, S. C., Carey, N., Finn, P. W., Collins, L. S., Tumber, A., Ritchie, J. W., Jensen, P. B., Lichenstein, H. S. & Sehested, M. **2008**. Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. *Biochem J*, 409, 581-589.
- Kim, S. H., Kang, J. G., Kim, C. S., Ihm, S. H., Choi, M. G., Yoo, H. J. & Lee, S. J. **2015**. Novel heat shock protein 90 inhibitor NVP-AUY922 synergizes with the histone deacetylase inhibitor PXD101 in induction of death of anaplastic thyroid carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 100, E253-261.
- Kim, S. H., Kang, J. G., Kim, C. S., Ihm, S. H., Choi, M. G., Yoo, H. J. & Lee, S. J. **2016**. The heat shock protein 90 inhibitor SNX5422 has a synergistic activity with histone deacetylase inhibitors in induction of death of anaplastic thyroid carcinoma cells. *Endocrine*, 51, 274-282.

- Kovacs, J. J., Murphy, P. J., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J. T., Nicchitta, C. V., Yoshida, M., Toft, D. O., Pratt, W. B. & Yao, T. P. **2005**. HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell*, 18, 601-607.
- Kramer, O. H., Mahboobi, S. & Sellmer, A. **2014**. Drugging the HDAC6-HSP90 interplay in malignant cells. *Trends Pharmacol Sci*, 35, 501-509.
- Kurman, R. J. & Shih Ie, M. **2011**. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Hum Pathol*, 42, 918-931.
- Kurundkar, D., Srivastava, R. K., Chaudhary, S. C., Ballestas, M. E., Kopelovich, L., Elmets, C. A. & Athar, M. **2013**. Vorinostat, an HDAC inhibitor attenuates epidermoid squamous cell carcinoma growth by dampening mTOR signaling pathway in a human xenograft murine model. *Toxicol Appl Pharmacol*, 266, 233-244.
- Lang, S. A., Moser, C., Fichnter-Feigl, S., Schachtschneider, P., Hellerbrand, C., Schmitz, V., Schlitt, H. J., Geissler, E. K. & Stoeltzing, O. **2009**. Targeting heat-shock protein 90 improves efficacy of rapamycin in a model of hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology*, 49, 523-532.
- Lee, J. H., Choy, M. L. & Marks, P. A. **2012**. Mechanisms of resistance to histone deacetylase inhibitors. *Adv Cancer Res*, 116, 39-86.
- Lee, M. J., Kim, Y. S., Kummar, S., Giaccone, G. & Trepel, J. B. **2008**. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Curr Opin Oncol*, 20, 639-649.
- Lee, S. C., Min, H. Y., Jung, H. J., Park, K. H., Hyun, S. Y., Cho, J., Woo, J. K., Kwon, S. J., Lee, H. J., Johnson, F. M. & Lee, H. Y. **2016**. Essential role of insulin-like growth factor 2 in resistance to histone deacetylase inhibitors. *Oncogene*, 35, 5515-5526.
- Li, H., Zeng, J. & Shen, K. **2014**. PI3K/AKT/mTOR signaling pathway as a therapeutic target for ovarian cancer. *Arch Gynecol Obstet*, 290, 1067-1078.
- Li, J., Sun, L., Xu, C., Yu, F., Zhou, H., Zhao, Y., Zhang, J., Cai, J., Mao, C., Tang, L., Xu, Y. & He, J. **2012**. Structure insights into mechanisms of ATP hydrolysis and the activation of human heat-shock protein 90. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 44, 300-306.
- Liu, H., Xiao, F., Serebriiskii, I. G., O'brien, S. W., Maglaty, M. A., Astsaturon, I., Litwin, S., Martin, L. P., Proia, D. A., Golemis, E. A. & Connolly, D. C. **2013**. Network analysis identifies an HSP90-central hub susceptible in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 19, 5053-5067.

- Lu, X., Xiao, L., Wang, L. & Ruden, D. M. **2012**. Hsp90 inhibitors and drug resistance in cancer: the potential benefits of combination therapies of Hsp90 inhibitors and other anti-cancer drugs. *Biochem Pharmacol*, 83, 995-1004.
- Mahalingam, D., Swords, R., Carew, J. S., Nawrocki, S. T., Bhalla, K. & Giles, F. J. **2009**. Targeting HSP90 for cancer therapy. *Br J Cancer*, 100, 1523-1529.
- Maloney, A., Clarke, P. A., Naaby-Hansen, S., Stein, R., Koopman, J. O., Akpan, A., Yang, A., Zvelebil, M., Cramer, R., Stimson, L., Aherne, W., Banerji, U., Judson, I., Sharp, S., Powers, M., Debilly, E., Salmons, J., Walton, M., Burlingame, A., Waterfield, M. & Workman, P. **2007**. Gene and protein expression profiling of human ovarian cancer cells treated with the heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Cancer Res*, 67, 3239-3253.
- Manal, M., Chandrasekar, M. J., Gomathi Priya, J. & Nanjan, M. J. **2016**. Inhibitors of histone deacetylase as antitumor agents: A critical review. *Bioorg Chem*, 67, 18-42.
- Mansouri, A., Ridgway, L. D., Korapati, A. L., Zhang, Q., Tian, L., Wang, Y., Siddik, Z. H., Mills, G. B. & Claret, F. X. **2003**. Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem*, 278, 19245-19256.
- Maolanon, A. R., Madsen, A. S. & Olsen, C. A. **2016**. Innovative Strategies for Selective Inhibition of Histone Deacetylases. *Cell Chem Biol*, 23, 759-768.
- Marek, L., Hamacher, A., Hansen, F. K., Kuna, K., Gohlke, H., Kassack, M. U. & Kurz, T. **2013**. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors with a novel connecting unit linker region reveal a selectivity profile for HDAC4 and HDAC5 with improved activity against chemoresistant cancer cells. *J Med Chem*, 56, 427-436.
- Marsh, D. J., Shah, J. S. & Cole, A. J. **2014**. Histones and their modifications in ovarian cancer - drivers of disease and therapeutic targets. *Front Oncol*, 4, 1-12.
- Matthews, S. B., Vielhauer, G. A., Manthe, C. A., Chaguturu, V. K., Szabla, K., Matts, R. L., Donnelly, A. C., Blagg, B. S. & Holzbeierlein, J. M. **2010**. Characterization of a novel novobiocin analogue as a putative C-terminal inhibitor of heat shock protein 90 in prostate cancer cells. *Prostate*, 70, 27-36.
- Mcguire, W. P., Hoskins, W. J., Brady, M. F., Kucera, P. R., Partridge, E. E., Look, K. Y., Clarke-Pearson, D. L. & Davidson, M. **1996**. Cyclophosphamide and cisplatin versus paclitaxel and cisplatin: a phase III randomized trial in patients with suboptimal stage III/IV ovarian cancer (from the Gynecologic Oncology Group). *Semin Oncol*, 23, 40-47.

- Mimura, N., Hideshima, T. & Anderson, K. C. **2015**. Novel therapeutic strategies for multiple myeloma. *Exp Hematol*, 43, 732-741.
- Mithraprabhu, S., Khong, T. & Spencer, A. **2014**. Overcoming inherent resistance to histone deacetylase inhibitors in multiple myeloma cells by targeting pathways integral to the actin cytoskeleton. *Cell Death Dis*, 5, 1-12.
- Morgan, D. O. **1997**. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13, 261-291.
- Moses, M. A., Henry, E. C., Ricke, W. A. & Gasiewicz, T. A. **2015**. The heat shock protein 90 inhibitor, (-)-epigallocatechin gallate, has anticancer activity in a novel human prostate cancer progression model. *Cancer Prev Res (Phila)*, 8, 249-257.
- Mottamal, M., Zheng, S., Huang, T. L. & Wang, G. **2015**. Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. *Molecules*, 20, 3898-3941.
- Nakayama, K., Kanzaki, A., Ogawa, K., Miyazaki, K., Neamati, N. & Takebayashi, Y. **2002**. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a cisplatin based chemoresistance marker in ovarian carcinoma: comparative analysis with expression of MDR1, MRP1, MRP2, LRP and BCRP. *Int J Cancer*, 101, 488-495.
- New, M., Olzscha, H. & La Thangue, N. B. **2012**. HDAC inhibitor-based therapies: can we interpret the code? *Mol Oncol*, 6, 637-656.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F. & Riccardi, C. **1991**. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, 139, 271-279.
- Noureen, N., Rashid, H. & Kalsoom, S. **2010**. Identification of type-specific anticancer histone deacetylase inhibitors: road to success. *Cancer Chemother Pharmacol*, 66, 625-633.
- Ong, P. S., Wang, X. Q., Lin, H. S., Chan, S. Y. & Ho, P. C. **2012**. Synergistic effects of suberoylanilide hydroxamic acid combined with cisplatin causing cell cycle arrest independent apoptosis in platinum-resistant ovarian cancer cells. *Int J Oncol*, 40, 1705-1713.
- Ott, I. & Gust, R. **2006**. Medizinische Chemie der Platinkomplexe: Besonderheiten anorganischer Zytostatika. *Pharmazie in unserer Zeit*, 35, 124-133.
- Ozaki, K., Kishikawa, F., Tanaka, M., Sakamoto, T., Tanimura, S. & Kohno, M. **2008**. Histone deacetylase inhibitors enhance the chemosensitivity of tumor cells with cross-resistance to a wide range of DNA-damaging drugs. *Cancer Sci*, 99, 376-84.

- Ozols, R. F., Bundy, B. N., Greer, B. E., Fowler, J. M., Clarke-Pearson, D., Burger, R. A., Mannel, R. S., Degeest, K., Hartenbach, E. M. & Baergen, R. **2003**. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol*, 21, 3194-3200.
- Pchejetski, D., Alfraidi, A., Sacco, K., Alshaker, H., Muhammad, A. & Monzon, L. **2016**. Histone deacetylases as new therapy targets for platinum-resistant epithelial ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 142, 1659-1671.
- Pearl, L. H. & Prodromou, C. **2006**. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem*, 75, 271-294.
- Picard, D. **2016**. HSP90 Interactors. Available: <https://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf> [Accessed 18.12.2016].
- Porter, J. R., Fritz, C. C. & Depew, K. M. **2010**. Discovery and development of Hsp90 inhibitors: a promising pathway for cancer therapy. *Curr Opin Chem Biol*, 14, 412-420.
- Prodromou, C. **2016**. Mechanisms of Hsp90 regulation. *Biochem J*, 473, 2439-2452.
- Ratzke, C., Mickler, M., Hellenkamp, B., Buchner, J. & Hugel, T. **2010**. Dynamics of heat shock protein 90 C-terminal dimerization is an important part of its conformational cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 16101-16106.
- Riccardi, C. & Nicoletti, I. **2006**. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc*, 1, 1458-1461.
- Richter, K., Hendershot, L. M. & Freeman, B. C. **2007**. The cellular world according to Hsp90. *Nat Struct Mol Biol*, 14, 90-94.
- Richter, K., Walter, S. & Buchner, J. **2004**. The Co-chaperone Sba1 connects the ATPase reaction of Hsp90 to the progression of the chaperone cycle. *J Mol Biol*, 342, 1403-1413.
- Robey, R. W., Chakraborty, A. R., Basseville, A., Luchenko, V., Bahr, J., Zhan, Z. & Bates, S. E. **2011**. Histone deacetylase inhibitors: emerging mechanisms of resistance. *Mol Pharm*, 8, 2021-2031.
- Roche, J. & Bertrand, P. **2016**. Inside HDACs with more selective HDAC inhibitors. *Eur J Med Chem*, 121, 451-483.
- Roe, S. M., Prodromou, C., O'brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W. & Pearl, L. H. **1999**. Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J Med Chem*, 42, 260-266.

- Rosato, R. R., Maggio, S. C., Almenara, J. A., Payne, S. G., Atadja, P., Spiegel, S., Dent, P. & Grant, S. **2006**. The histone deacetylase inhibitor LAQ824 induces human leukemia cell death through a process involving XIAP down-regulation, oxidative injury, and the acid sphingomyelinase-dependent generation of ceramide. *Mol Pharmacol*, 69, 216-225.
- Sadikot, T., Swink, M., Eskew, J. D., Brown, D., Zhao, H., Kusuma, B. R., Rajewski, R. A., Blagg, B. S., Matts, R. L., Holzbeierlein, J. M. & Vielhauer, G. A. **2013**. Development of a high-throughput screening cancer cell-based luciferase refolding assay for identifying Hsp90 inhibitors. *Assay Drug Dev Technol*, 11, 478-488.
- Sato, S., Fujita, N. & Tsuruo, T. **2000**. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 10832-10837.
- Schwartz, H., Scroggins, B., Zuehlke, A., Kijima, T., Beebe, K., Mishra, A., Neckers, L. & Prince, T. **2015**. Combined HSP90 and kinase inhibitor therapy: Insights from The Cancer Genome Atlas. *Cell Stress Chaperones*, 20, 729-741.
- Serra, V., Markman, B., Scaltriti, M., Eichhorn, P. J., Valero, V., Guzman, M., Botero, M. L., Llonch, E., Atzori, F., Di Cosimo, S., Maira, M., Garcia-Echeverria, C., Parra, J. L., Arribas, J. & Baselga, J. **2008**. NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer Res*, 68, 8022-8030.
- Sharma, S., Beck, J., Mita, M., Paul, S., Woo, M. M., Squier, M., Gadbow, B. & Prince, H. M. **2013**. A phase I dose-escalation study of intravenous panobinostat in patients with lymphoma and solid tumors. *Invest New Drugs*, 31, 974-985.
- Sidera, K. & Patsavoudi, E. **2014**. HSP90 inhibitors: current development and potential in cancer therapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 9, 1-20.
- Siwak, D. R., Carey, M., Hennessy, B. T., Nguyen, C. T., Mcgahren Murray, M. J., Nolden, L. & Mills, G. B. **2010**. Targeting the epidermal growth factor receptor in epithelial ovarian cancer: current knowledge and future challenges. *J Oncol*, 2010, 568938-568958.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. **1985**. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150, 76-85.
- Solar, P., Horvath, V., Kleban, J., Koval, J., Solarova, Z., Kozubik, A. & Fedorocko, P. **2007**. Hsp90 inhibitor geldanamycin increases the sensitivity of resistant ovarian adenocarcinoma cell line A2780cis to cisplatin. *Neoplasma*, 54, 127-130.

- Soti, C., Vermes, A., Haystead, T. A. & Csermely, P. **2003**. Comparative analysis of the ATP-binding sites of Hsp90 by nucleotide affinity cleavage: a distinct nucleotide specificity of the C-terminal ATP-binding site. *Eur J Biochem*, 270, 2421-2428.
- Spanier, L. **2014**. *Trispyrimidonamide als neuartige alpha-Helixmimetika: Design, Synthese und biologische Evaluierung*. Heinrich Heine Universität, Düsseldorf.
- Spanier, L., Ciglia, E., Hansen, F. K., Kuna, K., Frank, W., Gohlke, H. & Kurz, T. **2014**. Design, synthesis, and conformational analysis of trispyrimidonamides as alpha-helix mimetics. *J Org Chem*, 79, 1582-1593.
- Spreafico, A., Delord, J. P., De Mattos-Arruda, L., Berge, Y., Rodon, J., Cottura, E., Bedard, P. L., Akimov, M., Lu, H., Pain, S., Kaag, A., Siu, L. L. & Cortes, J. **2015**. A first-in-human phase I, dose-escalation, multicentre study of HSP990 administered orally in adult patients with advanced solid malignancies. *Br J Cancer*, 112, 650-659.
- Taipale, M., Jarosz, D. F. & Lindquist, S. **2010**. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 515-528.
- Takai, N., Kawamata, N., Gui, D., Said, J. W., Miyakawa, I. & Koeffler, H. P. **2004**. Human ovarian carcinoma cells: histone deacetylase inhibitors exhibit antiproliferative activity and potentially induce apoptosis. *Cancer*, 101, 2760-2770.
- Taldone, T., Gozman, A., Maharaj, R. & Chiosis, G. **2008**. Targeting Hsp90: small-molecule inhibitors and their clinical development. *Curr Opin Pharmacol*, 8, 370-374.
- Tatokoro, M., Koga, F., Yoshida, S. & Kihara, K. **2015**. Heat shock protein 90 targeting therapy: state of the art and future perspective. *Excli j*, 14, 48-58.
- Thurn, K. T., Thomas, S., Moore, A. & Munster, P. N. **2011**. Rational therapeutic combinations with histone deacetylase inhibitors for the treatment of cancer. *Future Oncol*, 7, 263-283.
- Tothill, R. W., Tinker, A. V., George, J., Brown, R., Fox, S. B., Lade, S., Johnson, D. S., Trivett, M. K., Etemadmoghadam, D., Locandro, B., Traficante, N., Fereday, S., Hung, J. A., Chiew, Y.-E., Haviv, I., Gertig, D., Defazio, A. & Bowtell, D. D. L. **2008**. Novel Molecular Subtypes of Serous and Endometrioid Ovarian Cancer Linked to Clinical Outcome. *Clinical Cancer Research*, 14, 5198-5208.
- Verdin, E., Dequiedt, F. & Kasler, H. G. **2003**. Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet*, 19, 286-293.

- Virta, M., Tauriainen, S. & Karp, M. **1998**. Bioluminescence-Based Metal Detectors. *In*: Larossa, R. A. (ed.) *Bioluminescence Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press.
- Voigt, W., Dietrich, A. & Schmoll, H.-J. **2006**. Cisplatin und seine Analoga: Übersicht über den Entwicklungsstatus und klinischen Einsatz. *Pharmazie in unserer Zeit*, *35*, 134-143.
- Wagner, U., Harter, P., Hilpert, F., Mahner, S., Reuß, A., Du Bois, A., Petru, E., Meier, W., Ortner, P., König, K., Lindel, K., Grab, D., Piso, P., Ortmann, O., Runnebaum, I., Pfisterer, J., Lüftner, D., Frickhofen, N., Grünwald, F., Maier, B. O., Diebold, J., Hauptmann, S., Kommos, F., Emons, G., Radeleff, B., Gebhardt, M., Arnold, N., Calaminus, G., Weisse, I., Weis, J., Sehouli, J., Fink, D., Burges, A. & Hasenburg, A. **2013a**. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 1.0.
- Wagner, U., Harter, P., Hilpert, F., Mahner, S., Reuß, A., Du Bois, A., Petru, E., Meier, W., Ortner, P., König, K., Lindel, K., Grab, D., Piso, P., Ortmann, O., Runnebaum, I., Pfisterer, J., Lüftner, D., Frickhofen, N., Grünwald, F., Maier, B. O., Diebold, J., Hauptmann, S., Kommos, F., Emons, G., Radeleff, B., Gebhardt, M., Arnold, N., Calaminus, G., Weisse, I., Weis, J., Sehouli, J., Fink, D., Burges, A., Hasenburg, A. & Eggert, C. **2013b**. S3-Guideline on Diagnostics, Therapy and Follow-up of Malignant Ovarian Tumours: Long version 1.0 – AWMF registration number: 032/035OL, June 2013. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, *73*, 874-889.
- Wang, X., Khaleque, M. A., Zhao, M. J., Zhong, R., Gaestel, M. & Calderwood, S. K. **2006**. Phosphorylation of HSF1 by MAPK-activated protein kinase 2 on serine 121, inhibits transcriptional activity and promotes HSP90 binding. *J Biol Chem*, *281*, 782-791.
- Wang, Y. & Mcalpine, S. R. **2015**. Combining an Hsp70 inhibitor with either an N- or C-terminal Hsp90 inhibitor produces mechanistically distinct phenotypes. *Org Biomol Chem*, *13*, 3691-3698.
- Whitesell, L. & Lindquist, S. L. **2005**. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer*, *5*, 761-772.
- Whitesell, L., Sutphin, P. D., Pulcini, E. J., Martinez, J. D. & Cook, P. H. **1998**. The physical association of multiple molecular chaperone proteins with mutant p53 is altered by geldanamycin, an hsp90-binding agent. *Mol Cell Biol*, *18*, 1517-1524.
- Williams, J., Lucas, P. C., Griffith, K. A., Choi, M., Fogoros, S., Hu, Y. Y. & Liu, J. R. **2005**. Expression of Bcl-xL in ovarian carcinoma is associated with chemoresistance and recurrent disease. *Gynecol Oncol*, *96*, 287-295.
- Xu, W. S., Parmigiani, R. B. & Marks, P. A. **2007**. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*, *26*, 5541-5552.

- Yi, T. Z., Li, J., Han, X., Guo, J., Qu, Q., Guo, L., Sun, H. D. & Tan, W. H. **2012**. DNMT inhibitors and HDAC inhibitors regulate E-cadherin and Bcl-2 expression in endometrial carcinoma in vitro and in vivo. *Chemotherapy*, 58, 19-29.
- Yin, Z., Henry, E. C. & Gasiewicz, T. A. **2009**. (-)-Epigallocatechin-3-gallate is a novel Hsp90 inhibitor. *Biochemistry*, 48, 336-345.
- Ying, W., Du, Z., Sun, L., Foley, K. P., Proia, D. A., Blackman, R. K., Zhou, D., Inoue, T., Tatsuta, N., Sang, J., Ye, S., Acquaviva, J., Ogawa, L. S., Wada, Y., Barsoum, J. & Koya, K. **2012**. Ganetespib, a unique triazolone-containing Hsp90 inhibitor, exhibits potent antitumor activity and a superior safety profile for cancer therapy. *Mol Cancer Ther*, 11, 475-484.
- Yu, K. H., Levine, D. A., Zhang, H., Chan, D. W., Zhang, Z. & Snyder, M. **2016**. Predicting Ovarian Cancer Patients' Clinical Response to Platinum-Based Chemotherapy by Their Tumor Proteomic Signatures. *J Proteome Res*, 15, 2455-2465.
- Zhang, Z., Xie, Z., Sun, G., Yang, P., Li, J., Yang, H., Xiao, S., Liu, Y., Qiu, H., Qin, L., Zhang, C., Zhang, F. & Shan, B. **2015**. Reversing drug resistance of cisplatin by hsp90 inhibitors in human ovarian cancer cells. *Int J Clin Exp Med*, 8, 6687-6701.
- Zismanov, V., Drucker, L. & Gottfried, M. **2013**. ER homeostasis and motility of NSCLC cell lines can be therapeutically targeted with combined Hsp90 and HDAC inhibitors. *Pulm Pharmacol Ther*, 26, 388-394.
- Zitzmann, K., Ailer, G., Vlotides, G., Spoettl, G., Maurer, J., Goke, B., Beuschlein, F. & Auernhammer, C. J. **2013**. Potent antitumor activity of the novel HSP90 inhibitors AUY922 and HSP990 in neuroendocrine carcinoid cells. *Int J Oncol*, 43, 1824-1832.

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Matthias U. Kassack auf das Herzlichste für die Überlassung des interessanten Themas, für die Möglichkeit im Zelllabor zu arbeiten, für die Anregungen während der Promotion und für die konstruktive Kritik und Hilfe während der Korrekturphase. Bedanken möchte ich mich auch für die gelassenen Freiheiten bei meinen wissenschaftlichen Arbeiten.

Herrn Prof. Dr. Holger Gohlke danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferats und seine stets aufheiternden Worte.

Für die Überlassung der neuen Substanzen zum Testen möchte ich dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Thomas Kurz danken. Mein besonderer Dank gilt JProf. Dr. Finn Hansen, Dr. Lukas Spanier sowie Daniela Diedrich, deren Substanzen einen neuen Fokus in meine Arbeit gebracht haben.

Dr. Emanuele Ciglia und Janina Vergin danke ich für den regen Austausch zum HSP90-Projekt, Mareike Kessenbrock danke ich für die Unterstützung bei Messungen am NanoTemper.

Ich danke meinen Arbeitskollegen Katharina (Hüppe) Gohr, David Müller, Chenyin Wang, Parichat Sureechatchaiyan, Laura Engelke, Nicole Brockmann, Michaela Linden und Christian Schrenk für die stets gute Zusammenarbeit, die unkomplizierten Absprachen bei Arbeiten im Zelllabor, die lustigen Momente, den regen Austausch jeglicher Art, sei es auf wissenschaftlicher oder spaßiger Art und für die Versorgung des „Fresssackes“. Meiner Kollegin Magdalena Matyja danke ich nicht nur für die Hilfe bei der Generierung der Kinetiken, sondern vor allem für alles, was sie mir bezüglich des Arbeitens im Labor, der Vorgänge an der Universität und der lustigen Seite des universitären Lebens gezeigt hat. Christian Schrenk gilt zusätzlich mein Dank für das Korrekturlesen. Vor allem Katharina Gohr und David Müller danke ich für die Unterstützung, die Unternehmungen außerhalb der Universität und das viele Lachen. Auch die vielen nicht-wissenschaftlichen und motivierenden Gespräche haben meine Arbeit und meinen Alltag unterstützt. Es entstehen Freundschaften, die, wenn man Glück hat, auch schwere Zeiten und ein ganzes Leben aushalten. Ihr werdet außerdem alles großartig meistern!

And for the international readers: 感谢您的帮助 and ขอบคุณ.

Anuseema Bhadauriya, Dr. Emanuele Ciglia, Katharina Gohr, Dr. Alexandra Hamacher, David Müller und Stephan Schwedt danke ich für unvergessliche Momente während der studentischen Betreuung im Praktikum der Medizinischen Chemie und Arzneimittelanalytik und für die Bändigung des Pitbulls in mir.

Meinen Freunden, meiner und Daniels Familie und dem Team der Ewaldi Apotheke danke ich für die immerwährende Unterstützung und das Verständnis für seltenere Besuche, Treffen und Telefonate während der letzten Phase meiner Promotion. Danke für aufmunternde Nachrichten, für „Fresskörbchen“ und das Relativieren von schlechten Zeiten. Dr. Christian Hanke, Dr. Christopher Pfleger und Giulia Pagani danke ich zusätzlich fürs Festhalten und Nicht-Fallen-Lassen. Ein besonderer Dank gilt Dr. Christian Hanke für die Motivation und Hilfestellungen vor allem beim Erstellen der Abbildungen während der letzten Phase dieser Arbeit.

Für meine Eltern:

Aos meus pais, que sempre me apoiaram, acreditaram em mim e não me deixaram desistir deste projecto. Estou vos grata por tudo o que sempre fizestes por mim, pela educação que me destes, as possibilidades que me abristes e a vista que me destes sobre o mundo: sempre aberta, com alegria e tudo se há-de de resolver. Obrigada!

Ein unbezahlbarer und von Herzen kommender Dank gilt Frau Dr. Alexandra Hamacher. Nicht nur ihre kompetente und stets konstruktive, offene und ehrliche Kritik sowie fachliche Ratschläge haben mich zum Abschluss dieser Promotion gebracht, sondern auch die stete und kontinuierliche Motivation vom ersten bis zum letzten Tag. Es gibt nichts, was sie nicht weiß und kein Problem, wozu sie keine Lösung hat, sei es auf wissenschaftlicher oder persönlicher Ebene. Danke auch für die Unterweisung in alle angewandten Techniken im Labor sowie für unzählige Hilfestellungen beim wissenschaftlichen Arbeiten und vor allem bei der von mir nicht als selbstverständlich gesehene, unermüdliche und professionelle Korrektur der vorliegenden Arbeit. Aber vor allem bin ich Frau Dr. Alexandra Hamacher dankbar für das Lachen, die Freude und die positive Energie, die sie auch in schlechten Zeiten immer in sich hat und mit allen teilt. Danke auch für die wundervollen Karnevalskostüme, die leckeren Rezepte, die unvergesslichen Ausflüge zusammen mit Katharina Gohr und die liebevolle Fürsorge. Ohne dich wäre der Wahnsinn, der an jeder Ecke lauert, vermutlich nicht überstanden worden.

5 Jahre sind eine lange Zeit und können Menschen verändern. Ich danke Daniel, dass er auch während dieser Lebensphase immer bei mir geblieben ist, mich unterstützt hat und meine Launen, mein Jammern und Klagen ausgehalten hat. Dankbar bin ich auch für die alltäglichen Dinge, die er mir abgenommen hat. Wenn ich mit dem Kopf nicht zu Hause ankam und nicht abschalten konnte, schaffte er es, mich wachzurütteln, um mir zu zeigen, wo ich bin und was mein Ziel ist. Du weißt, ich stehe jeder Zeit für die Revanche bereit.

Meiner Schwester Alexandra gilt ein besonders großer Dank, nicht nur für alles, was sie schon immer für mich getan hat, sondern vor allem für die Unterstützung und Hilfe in der letzten Phase der Promotion. Du hast mich nicht aufgeben lassen, unermüdlich Korrektur gelesen und mich immer wieder motiviert. Ohne dich wäre ich nicht ich und ohne dich hätte ich es nicht geschafft, Danke!

Und ohne es zu wissen, war er meine größte Energiequelle in der finalen Phase, mein Ruhepol, mein Lichtblick: Rafael! Das werde ich dir nie vergessen und immer für dich da sein.